

# **DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

**Imre Alexandra**

***A *Saccharomyces cerevisiae* var. 'boulardii'*  
probiotikus élesztő eredetű fungémia okainak felderítése a  
gomba virulencia faktorainak vizsgálatán keresztül**

**DEBRECENI EGYETEM**

**LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA**

**Debrecen, 2022**

# DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

*A Saccharomyces cerevisiae var. 'boulardii'*  
probiotikus élesztő eredetű fungémia okainak felderítése a  
gomba virulencia faktorainak vizsgálatán keresztül

**Imre Alexandra**

**Témavezetők:**

**Prof. Dr. Pócsi István  
Dr. Pfliegler Valter Péter**



**DEBRECENI EGYETEM  
LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA  
Debrecen, 2022**

## TARTALOMJEGYZÉK

<b>RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE .....</b>	<b>4</b>
2.1 A humán mikrobiom és jelentősége.....	9
2.2 Probiotikumok jelentősége és klinikai felhasználása.....	13
2.3 A <i>S. 'boulardii'</i> probiotikum eredete és taxonómiája.....	14
2.4 A <i>S. 'boulardii'</i> egyedi genom variációi és fenotípusa.....	15
2.5 <i>S. 'boulardii'</i> egészségügyi hatásai, hatásmechanizmusai.....	16
2.5.2 Immunmodulációs és trofikus hatások .....	18
2.6 A <i>S. 'boulardii'</i> , mint a fungémia kórokozója .....	19
2.6.1 A probiotikus élesztő potenciális virulencia faktorai .....	20
2.6.2 Immunválasz az invazív gombás megbetegedések esetén.....	22
2.7 A vas szerepe a humán patogének túlélésében.....	23
<b>3. CÉLKITŰZÉS.....</b>	<b>27</b>
<b>4. METODIKÁK.....</b>	<b>28</b>
4.1 Felhasznált izolátumok és törzsek, törzsfenntartás.....	28
4.2 Genetikai módszerek.....	32
4.2.1 DNS izolálás, Multilocus Sequence Typing (MLST) .....	32
4.2.2 PCR-fingerprinting.....	33
4.2.3 Mikroszatellita tipizálás.....	33
4.2.4 Multiplex PCR .....	34
4.3 Genomikai módszerek.....	35
4.3.1 Teljesgenom szekvenálás.....	35
4.3.2 Long Read szekvenálás, teljesgenom összeállítás és annotálás a PY0001 izolátumra .....	35
4.3.3 Térképezés a referencia genomokra .....	36
4.3.4 Lefedettségi elemzés .....	36
4.3.5 Variáns meghatározás.....	36
4.3.6 Variánsok hatásának meghatározása proteinkodoló génekre .....	37
4.3.7 Filogenomikai hálózat építése, Maximum Likelihood filogénia .....	38
4.3.8 Allél arányok meghatározása és kromoszómaszám analízis .....	38
4.3.9 ORF, mitokondriális DNS, plazmid és transzpozon kópiaszám analízis .....	39
4.4 Fenotipizálási kísérletek.....	39
4.4.1 Telepmorfológia, invazivitás és öregedés.....	39
4.4.2 "Killer" aktivitás és érzékenység .....	40
4.4.3 "Petite" teszt.....	40
4.4.4 MAT lókusztipizálás és spórázásteszt .....	41
4.4.5 Szaporodás magas hőmérsékleten.....	41
4.4.6 Pseudohifa növekedés és flokkuláció .....	41

4.4.7 Extracelluláris proteáz aktivitás, foszfolipáz aktivitás, hemolitikus aktivitás .....	42
4.4.8 Antifungális szerekekkel szembeni érzékenység.....	42
4.5 Humán epitélium modell interakciók vizsgálata .....	43
4.5.1 <i>S. 'boulardii'</i> izolátumok adhéziója Caco-2 humán gasztrointesztinális epitélium modellen	43
4.5.2 Caco-2 humán epitélium modell károsítás vizsgálatak .....	43
4.5.3 <i>S. 'boulardii'</i> izolátumok átjutásának vizsgálata Caco-2 humán epitélium modellen .....	44
4.6 Immunológiai vizsgálatok.....	45
4.6.1 Humán primer sejtek izolálása és differenciálása .....	45
4.6.2 <i>S. 'boulardii'</i> izolátumokkal együttinkubált monocita eredetű dendritikus sejtek (moDC) fagocitózis vizsgálata, valamint fenotípusos és funkcionális elemzése .....	46
4.6.3 <i>S. 'boulardii'</i> izolátumokkal együttinkubált moDC-k T-sejt aktiválási képességének vizsgálata .....	47
4.7 <i>In vivo</i> vizsgálatok .....	47
4.7.1 <i>Galleria mellonella</i> (viaszmoly) lárva infekciós kísérletek.....	47
4.7.2 Immunszuppresszált BALB/c egér infekciós kísérletek.....	48
4.8 A hem oxigenáz-1 gén ( <i>HMX1</i> ) funkciójának vizsgálata .....	48
4.8.1 Plazmidok és konstrukciók a <i>HMX1</i> gén deléciójához .....	48
4.8.2 Élesztőizolátumok transzformálása.....	51
4.8.3 Vaséhezéssel szembeni tolerancia, hemolitikus aktivitás és <i>in vivo</i> virulencia vizsgálata a <i>HMX1</i> deléciós törzsek esetében .....	51
4.9 Statisztika és adatvizualizáció .....	52
<b>5. EREDMÉNYEK.....</b>	<b>53</b>
5.1 Fajidentifikálás és MLST .....	53
5.2 PCR-fingerprinting és mikroszatellita tipizálás.....	53
5.3 Új multiplex PCR protokoll a <i>S. 'boulardii'</i> azonosítására .....	54
5.4 Genomikai eredmények: teljesgenom-összeállítás és -annotálás .....	58
5.5 Fenotípusos különbségek a kereskedelmi, mikózist okozó és mikózist nem okozó <i>S. 'boulardii'</i> izolátumok között .....	60
5.6 A kereskedelmi, mikózist okozó, és mikózist nem okozó <i>S. 'boulardii'</i> izolátumok extracelluláris virulencia faktorai (extracelluláris foszfolipáz és aszpartát proteáz termelés, hemolitikus aktivitás).....	61
5.7 Antifungális szerekekkel szembeni érzékenység .....	63
5.8 Interakció az epitéliummal (adhézió, károsítás, transzmigráció), morfológia .....	64
5.9 Immunológiai interakciók (moDC-k fagocitózisának és sejtfelszíni molekuláinak, a citokin/kemokin szint, valamint a T-sejt aktiváció vizsgálata) .....	64
5.10 <i>G. mellonella</i> lárva infekciók .....	67
5.11 Virulencia és túlélés immunszuppresszált BALB/c egérmodellben.....	68
5.12 A génkiütéses kísérletekben vizsgált probiotikus élesztők genomi hátterének összehasonlítása .....	71

5.13 A <i>HMX1</i> sikeres, CRISPR/Cas9-rendszeren alapuló deléciója.....	80
5.14 A <i>HMX1</i> deléciója csökkentette a <i>S. 'boulardii'</i> izolátumok szaporodási képességét vashiányos körülmények között .....	80
5.15 A hemolitikus aktivitást nem befolyásolta <i>HMX1</i> deléciója.....	83
5.16 A <i>HMX1</i> deléciója szignifikánsan magasabb gombaterhelést eredményezett immunszuppresszált BALB/c egerek veséjében .....	84
<b>6. DISZKUSSZIÓ.....</b>	<b>87</b>
6.1 A <i>S. 'boulardii'</i> kimutatása egy új PCR alapú módszerrel .....	87
6.2 A probiotikus élesztő interakciói a humán gazdaszervezettel.....	88
6.2.1 Nincs jelentős különbség az <i>in vitro</i> virulencia faktorok termelésében a <i>S. 'boulardii'</i> izolátumok csoportjai között .....	89
6.2.2 A <i>S. 'boulardii'</i> kiemelkedően rezisztens a flukonazollal szemben .....	90
6.2.3 Az élesztő és bélepitélium sejtek között a kimutatható kölcsönhatás elhanyagolható.....	90
6.2.4 A <i>S. 'boulardii'</i> izolátumok hasonló immunaktivizáló hatással rendelkeznek.....	91
6.2.5 Variábilis virulencia <i>in vivo</i> lárva és egérmodellben .....	91
6.2.6 A <i>S. 'boulardii'</i> fungémia kialakulásának hátterében valószínűsíthetően a betegek egészségügyi állapota fontos tényező .....	92
6.3 <i>HMX1</i> gén potenciális szerepe a probiotikus élesztő patogenitásában.....	94
6.3.1 A génkiütéshez kiválasztott izolátumok genetikai különbségei .....	94
6.3.2 A vaséhezesszel szembeni tolerancia lehetséges virulencia faktor a <i>S. 'boulardii'</i> esetében.....	95
6.3.3 A <i>S. 'boulardii'</i> hem oxigenáz-1 ( <i>HMX1</i> ) gén, mint lehetséges antivirulencia faktor .....	96
<b>ÖSSZEFOGLALÁS .....</b>	<b>98</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>99</b>
<b>FÜGGELÉK.....</b>	<b>100</b>
<b>IRODALOMJEGYZÉK .....</b>	<b>122</b>
<b>TÁRGYSZAVAK.....</b>	<b>142</b>
<b>KEYWORDS.....</b>	<b>143</b>
<b>KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....</b>	<b>144</b>

## RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

<b>AD</b>	allél lefedettségi mélysége (Allele Depth)
<b>AP-PCR</b>	véletlenszerűen indított PCR (Arbitrarily-Primed PCR)
<b>BQSR</b>	bázis minőségi érték recalibráció (Base Quality Score Recalibration)
<b>BSA</b>	szarvasmarha szérum albumin (Bovine Serum Albumin)
<b>BLAST</b>	illesztés alapján kereső algoritmus (Basic Local Alignment Search Tool)
<b>CaHmx1</b>	<i>Candida albicans</i> hem oxigenáz-1 protein
<b>CCNV</b>	kromoszóma kópiaszám variabilitás (Chromosome Copy Number Variation)
<b>CD</b>	Chron-betegség (Crohn's Disease)
<b>CFEM</b>	gyakori (domén) számos gomba extracelluláris membránfehérjében (Common in several Fungal Extracellular Membrane proteins)
<b>CFU</b>	kóloniaképző egység (Colony Forming Unit)
<b>CLR</b>	C-típusú lektin receptor (C-type Lectin Receptor)
<b>CNV</b>	kópiaszám-variabilitás (Copy Number Variation)
<b>CO</b>	szén-monoxid (Carbon monOxide)
<b>CRISPR</b>	palindrom ismétlődés egyik típusa (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)
<b>DC</b>	dendritikus sejt (Dendritic Cell)
<b>DCSIGN</b>	nonintegrinek egyik típusa (Dendritic Cells Specific Intercellular Adhesion Molecule Grabbing Nonintegrin)
<b>DMEM</b>	tápfolyadékok egyik típusa (Dulbecco's Modified Eagle Medium)
<b>EDTA</b>	etilén-diamin-tetraecetsav (EthyleneDiamineTetraacetic Acid)
<b>ELISA</b>	enzimhez kapcsolt immunoszorbens vizsgálat (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)
<b>ELISPOT</b>	enzimhez kapcsolt immunospot vizsgálat (Enzyme-Linked Immunospot Assay)
<b>ER</b>	endoplazmatikus retikulum (Endoplasmic Reticulum)
<b>ETS-szekvencia</b>	külső átírt elválasztó szekvencia (External Transcribed Spacer)
<b>EY</b>	tojássárgájás táptalaj (Egg-Yolk medium)
<b>FACS</b>	fluoreszcencia-aktivált sejtválogatás (Fluorescence-Activated Cell Sorting)
<b>FAFLP</b>	fluoreszcens amplifikált fragment hosszpolimorfizmus (Fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism)
<b>FBS</b>	szarvasmarha magzati szérum (Fetal Bovine Serum)
<b>FITC</b>	fluoreszcein-izotiocianát (Fluorescein IsoThioCyanate)
<b>FMT</b>	széklet mikrobiom transzplantáció (Fecal Microbiome Transplant)
<b>GIT</b>	gasztrointesztinális traktus (GastroIntestinal Tract)
<b>GM-CSF</b>	humán növekedési faktorok egyik típusa (Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor)
<b>GOH</b>	heterozigótáság nyerés (Gain-Of-Heterozygosity)
<b>GO Term</b>	gén ontológia címszó (Gene Ontology Term)
<b>GPI</b>	glikozilfoszfatidilinozitol (GlycosylPhosphatidyInositol)
<b>GRAS</b>	általánosan biztonságosnak tekintett (Generally Recognised As Safe)
<b>gRNS</b>	vezető RNS (Guide RNA)
<b>HI</b>	hemolitikus index (Hemolytic Index)
<b>HLA-DQ</b>	antigénprezentáló sejtek felszíni receptortípusa (Human Leukocyte Antigen DQ)
<b>HMX1</b>	hem oxigenáz-1 gén (élesztő) (Heme OXigenase-1)
<b>HO-1</b>	hem oxigenáz-1 gén (humán) (Heme Oxigenase-1)
<b>IBD</b>	gyulladásos bélbetegség (Inflammatory Bowel Disease)
<b>IBS</b>	irritábilis bélszindróma (Irritable Bowel Syndrome)
<b>IL</b>	interleukin (InterLeukin)
<b>INDEL</b>	inzerció/deléción (INsertion/DELetion)

<b>ITS</b>	belső átírt elválasztó szekvencia (Internal Transcribed Spacer)
<b>ITS-RFLP</b>	belső átírt elválasztó szekvencia restriktív fragmenthossz polimorfizmusa (Internal Transcribed Spacer Restriction Fragment Length Polymorphism)
<b>IUPAC</b>	Nemzetközi Elméleti és Alkalmazott Kémiai Szövetség (International Union of Pure and Applied Chemistry)
<b>KAc</b>	Kálium-ACetát
<b>LB</b>	táptalajtípus (Lysogeny Broth)
<b>LOH</b>	heterozigótaság vesztes (Loss-Of-Heterozygosity)
<b>LPS</b>	lipopoliszacharid (LipoPolySaccharide)
<b>LRS DAY</b>	szekvencaanalízis-szoftvercsomag élesztőkhöz (Long-Read Sequencing Data Analysis for Yeasts)
<b>LTR</b>	hosszú végálló ismétlődés (Long Terminal Repeat)
<b>MALDI-TOF</b>	Mátrix-asszisztált lézer deszorpció, ionizáció, repülési idő mérésén alapuló tömegspektrometria (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight)
<b>moDC</b>	monocita eredetű dendritikus sejt (MONocyte-derived Dendritic Cell)
<b>MIC</b>	minimális gátló koncentráció (Minimum Inhibitory Concentration)
<b>MINCLE</b>	makrofág-indukálható C-típusú lektin (Macrophage-Inducible C-type LECTin)
<b>MLS-B</b>	makrolid-linkozamid-streptogramin-B (Macrolide-Lincosamide-Streptogramin-B)
<b>MLST</b>	soklokuszus szekvencaátírási módszer (Multi-Locus Sequence Typing)
<b>MR</b>	mannóz receptor (Mannose Receptor)
<b>MSP-PCR</b>	mikroszatellitákkal kezelt PCR (MicroSatellite-Primed PCR)
<b>MTT</b>	3-(4,5-dimetilthiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid
<b>MUSCLE</b>	szekvencaösszehasonlító módszer (Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation)
<b>NCBI</b>	Biotechnológiai Információk Nemzeti Központja (National Center for Biotechnology Information)
<b>NET</b>	neutrofil extracelluláris csapda (Neutrophil Extracellular Trap)
<b>NK</b>	természetes ölősejt (Natural Killer)
<b>NTS-RFLP</b>	nem-átíró elválasztó szekvencia restriktív fragmenthossz polimorfizmusa (Non-Transcribed Spacer-Restriction Fragment Length Polymorphism)
<b>NLR</b>	NOD-szerű receptor (NOD-Like Receptor)
<b>NO</b>	nitrogén-monoxid (Nitric Oxide)
<b>NOD</b>	nukleotid-kötő oligomerizációs domén (Nucleotide-binding Oligomerization Domain)
<b>ORF</b>	nyílt leolvasási keret (Open Reading Frame)
<b>PAMP</b>	patogén asszociált molekuláris minta (Pathogen-Associated Molecular Pattern)
<b>PBMC</b>	perifériás vérminták mononukleáris sejtjei (Peripheral Blood Mononuclear Cells)
<b>PBS</b>	foszfáttal pufferelt sóoldat (Phosphate-Buffered Saline)
<b>PCR</b>	polimeráz lánreakció (Polymerase Chain Reaction)
<b>PFA</b>	paraformaldehid (ParaFormAldehyde)
<b>PFGE</b>	pulzáló erőterű gélelektroforézis (Pulsed-Field Gel Electrophoresis)
<b>PMN</b>	polimorfonukleáris leukocita (PolyMorphoNuclear Leukocyte)
<b>PRR</b>	patogén felismerő receptor (Pathogen Recognition Receptor)
<b>RADP-PCR</b>	Random amplifikált polimorf DNS polimeráz lánreakció (Randomly Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction)
<b>SD</b>	szintetikus dextróz tápközeg (Synthetic Dextrose medium)
<b>SDA</b>	Sabouraud dextróz agar (Sabouraud Dextrose Agar)
<b>SCFA</b>	rövid szénláncú zsírsav (Short-Chain Fatty Acid)
<b>SGD</b>	<i>Saccharomyces</i> Genom Adatbázis ( <i>Saccharomyces</i> Genome Database)

<b>SLAD</b>	szintetikus alacsony ammónium-tartalmú tápközeg (Synthetic Low-Ammonium Dextrose)
<b>SLG</b>	szintetikus alacsony glükóztartalmú tápközeg (Synthetic Low-Glucose)
<b>SNP</b>	egynukleotid polimorfizmus (Single Nucleotide Polymorphism)
<b>SRA</b>	a szekvenciaolvasatok hivatalos archívuma (Sequence Read Archive)
<b>TAE</b>	Tris-acetát-EDTA (Tris-Acetate-EDTA)
<b>TBE</b>	Tris-borát-EDTA (Tris-Borate-EDTA)
<b>TEER</b>	transzepiteliális elektromos ellenállás (Transepithelial Electric Resistance)
<b>TLR</b>	Toll-szerű receptor (Toll-Like Receptor)
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	tumor nekrozis faktor- $\alpha$ (Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ )
<b>ttkg</b>	testtömeg kilogramm
<b>UC</b>	colitis ulcerosa, fekélyes vastegbélgyulladás (Ulcerative Colitis)
<b>UPGMA</b>	egy agglomeratív hierarchikus klaszterezési módszer (Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Mean)
<b>WGA</b>	teljesgenom analízis (Whole Genome Analysis)
<b>WT</b>	vad típus (Wild Type)
<b>YNB</b>	élesztő nitrogén bázis (Yeast Nitrogen Base)
<b>YPD</b>	élesztőkivonat-pepton-dextróz tápközeg (Yeast extract Peptone Dextrose)

## 1. BEVEZETÉS

A *Saccharomyces cerevisiae* a leginkább kutatott élesztők közé tartozik, és az elmúlt évszázadban általa nyerhettünk betekintést az eukarióták fiziológiájába, genetikájába, sejtbiológiájába és molekuláris mechanizmusaiba [1]. Az alap kutatásokban betöltött szerepe mellett az emberiség történetének egyik legmeghatározóbb organizmusának tekinthetjük, korábban a fermentált italok és ételek, később pedig a biotechnológiában betöltött szerepe miatt [2,3]. Széleskörű felhasználása következtében a faj több ezer éves nemesítési folyamaton esett át, így a genetikai kutatások egyik modell organizmusává vált [4]. A *S. cerevisiae* volt az első eukarióta szervezet, melynek teljes genomját sikeresen megszekvenálták [5], a genomikai módszerek fejlődése következtében pedig az első eukariótává vált, melynek pángenomját is kezdjük megismerni [6]. Filogenomikai szempontból a *S. cerevisiae* nem tekinthető egységes fajnak, több alkládját is meg lehet különböztetni, melyek közül az egyik legjelentősebb az élesztő probiotikumok kládja, melyet a *Saccharomyces cerevisiae* var. '*bouardii*' (*S. 'bouardii*') altípus törzsei és izolátumai alkotnak.

Az 1950-es évek óta gyártják és forgalmazzák a *S. 'bouardii*' élesztőgombát, mely valójában a *S. cerevisiae* faj egyik altípusa, a probiotikumoknál már megszokott emésztőrendszeri panaszok (antibiotikummal összefüggő, vagy egyéb eredetű hasmenés) ellen. Ezekon felül a probiotikus élesztő a *Clostridioides difficile* fertőzés megelőzése, az irritábilis bélszindróma (IBS) tüneteinek enyhítése, valamint *Helicobacter pylori* fertőzés fennállása esetén is sikerrel alkalmazható. Az egészségre gyakorolt kedvező hatásait több, mint 80 randomizált klinikai tanulmány támasztja alá egy 2017-es összefoglaló metaanalízis alapján [7], ez a szám pedig azóta is folyamatosan nő. Alkalmazása azonban ellenjavallt az alapvetően legyengült immunrendszerű betegcsoportok (idősek, csecsemők, immunszuppressziós kezelésben részesülők, HIV fertőzöttek) számára a fungémia előfordulásának magas kockázata miatt. A kontraindikáció ellenére gyakran előfordul, hogy veszélyeztetett egészségügyi állapotban lévő páciens részesül élesztő probiotikus kezelésben, így az utóbbi években megnőtt az élesztő probiotikum eredetű fungémiás megbetegedések száma [8–11]. A szakirodalomban esettanulmányok formájában számoltak be az ilyen esetekről, azonban ezek a jelentések nagyrészt nem reprezentatívak a *S. 'bouardii*' altípus azonosításának gyakori hiánya miatt. Az altípus-szintű azonosítás elengedhetetlen ahhoz, hogy egyértelműen összefüggésbe lehessen hozni egy *Saccharomyces* fungémiát magával a probiotikus termékkel. Ezen felül elhanyagolható azoknak a tanulmányoknak a száma is, amik a fertőzés kialakulásának mechanizmusaival, illetve a probiotikus élesztő virulencia faktoraival foglalkoznak. Jelen dolgozat ezeket a hiányosságokat igyekszik a lehető legnagyobb tudományos körültekintéssel pótolni, illetve kiegészíteni.

Az eddigi kutatások felderítették, hogy a probiotikus élesztő a többi *S. cerevisiae*-hez hasonlóan viszonylag könnyen és megbízhatóan manipulálható molekuláris genetikai eszközökkel, így ígéretes jelölt a probiotikumok, illetve bioterapeutikumok új generációja számára. Várható, hogy

ezeknek a molekuláris módszereknek a térnyerésével növekedni fog azoknak a kutatásoknak a száma, melyek a probiotikumok továbbfejlesztésével foglalkoznak, egészségügyi hatásuk fokozása vagy új kedvező tulajdonságok létrehozása céljából. Ezeket az úgynevezett "designer" probiotikumokat viszont mindenképpen szükséges lesz tesztelni biztonságosság szempontjából is, amihez nélkülözhetetlen az általuk okozott fertőzések lefolyásának és a probiotikumok potenciális virulencia faktorainak részletes ismerete, melyhez az itt leírt eredmények is nagyban hozzájárulhatnak.

## 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### 2.1 A humán mikrobiom és jelentősége

A humán mikrobiom az egyes testtájakon előforduló mikroba közösségeket jelenti. Ezen mikroorganizmusok száma túlszárnyalja a szomatikus sejtek mennyiségét [12]. Legnagyobb részük a gasztrointesztinális traktusban található és számos fiziológias folyamatot befolyásolnak, így nagy hatással vannak biológiánkra, egészségünkre. A bélflórának kritikus szerepe van az immunrendszer fejlődésében [13]; gátolja a patogén mikroorganizmusok elszaporodását [14]; befolyásolja a szervezet sejtjeinek proliferációját [15] és a vaszkularizációt [16]; szabályozza az intesztinális endokrin funkciókat [17], az idegrendszer jelátviteli folyamatait [18], és a csontsűrűséget [19]; a napi energia szükségletünk egyik forrásaként is szolgál [20]; valamint részt vesz egyes vitaminok [21], neurotranszmitterek [22], és egyéb ismeretlen funkciót betöltő vegyület bioszintézisében. Szerepe van továbbá az epesavak metabolizmusában [23]; reakcióba lép gyógyszermolekulákkal, illetve módosítja azokat; és exogén toxinok eliminálásában is részt vesz [24]. A fajösszetétel eltérő a béltraktus egyes részein, a születés utáni fejlődés és az öregedés során is dinamikusan változik, valamint befolyásolja a környezetet, és az egyén genetikája is [25].

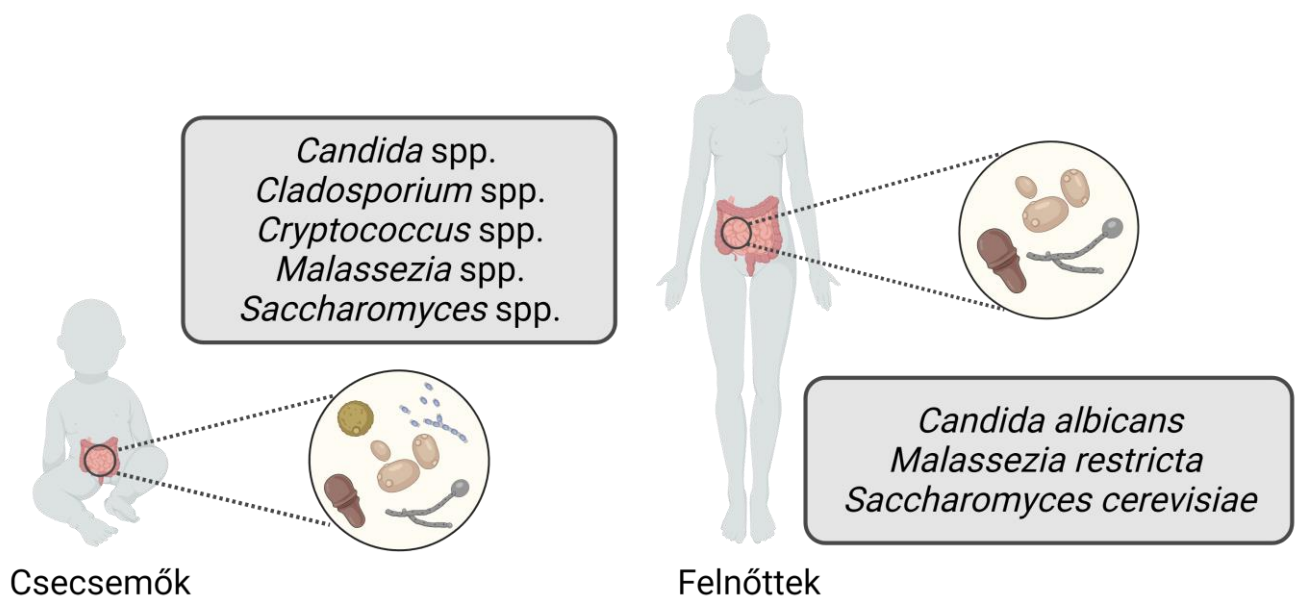
Ezeket a funkciókat a mikroorganizmusok olyan enzimatisz utvonalon keresztül töltik be, amelyek a táplálékban megtalálható szénhidrátok és fehérjék lebontását végzik. Az így keletkező kis molekulatömegű jelzőmolekulák egyaránt lehetnek káros és jótékony hatásúak a szervezetre nézve [26,27], és befolyásolják mind a szervezet, mind más mikrobák génjeinek kifejeződését. A humán metabolom több ezer mikrobiom eredetű metabolitot tartalmaz [28]. Többek között az elágazó láncú aminosavak (leucin, izoleucin, valin), és a glicin is ide tartoznak, melyek közül a legutóbbi a szervezet legfontosabb antioxidáns vegyülete, a glutation szintéziséhez szükséges. Ezen felül nagy mennyiségben termelődnek kis molekulatömegű szignalizációs molekulák is (metán, hidrogén szulfid) [27,29], valamint poliaminok, polifenolok és vitaminok (A, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>5</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>9</sub>, B<sub>12</sub>, K), amik a szervezet kromatin moduláló enzimeinek aktivitását, és a környezeti stimulusokra adott genetikai válaszokat szabályozzák [30]. Mikrobiom eredetű metabolit továbbá az acetyl-CoA (acetyl donorként funkcionál a hiszton módosításokhoz), a szerin és a metionin is (szubsztrátok a DNS metiláló és demetiláló enzimek számára; [30]. Anaerob körülmények között egyes fajok (többek között a *Bacteroides*, *Clostridiaceae*, *Lactobacillaceae* és *Bifidobacterium* fajok) [31] rövid láncú zsírsavakat (SCFA) termelnek. Ezek közé tartozik az acetát, propionát és a butirát, melyek többek közt szubsztrátként szolgálnak a glükoneogenezishez és a lipogenezishez is. Így hozzájárulnak a testtömeg-növekedéshez, illetve kulcsszerepet játszanak a nyálkahártya proliferáció és differenciáció irányításában, valamint integritásának fenntartásában [27,32,33]. Továbbá anti-inflammatorikus és immunmodulációs folyamatokban is részt vesznek [34,35].

Serdülőkor előtt az *Anaerovorax*, *Bifidobacterium*, nemzetségekhez, illetve és a Lachnospiraceae családnhoz tartozó fajok vannak többségben, ami összefüggésbe hozható a B<sub>12</sub> és folsav bioszintézis útvonalak megnövekedett működésével. Ez utóbbi különösen csecsemők esetében kifejezetten jellemző [21,36] a felnőtt egyénekkel összehasonlítva [37]. Az egészséges felnőttek bélmikrobiomjában főleg Bacteroidetes és Firmicutes (2021-ben bevezetett nevezetékben Bacteroidota ill. Bacillotes) fajok találhatóak, de kisebb mértékben Actinobacteria (Actinomycetota), Proteobacteria (Pseudomonadota) és a Verrucomicrobia (Verrucomicrobiota) képviselői is jelen vannak [38]. Továbbá metanogén archaeonokat (elsődlegesen *Methanobrevibacter smithii*), eukariótákat (főleg élesztőket) és fágokat is megfigyelhetünk a normál flóra tagjai között [39]. A csecsemőkéhez képest a felnőtt egyének mikrobiomja stabil, de bizonyos fajok és alfajok, valamint ezek arányai eltérést mutatnak [21], így valójában a mikroba összetétel személyenként egyedi. Az időseknél a bélflóra faj összetétele instabil, és kevésbé diverz, így az idős kor elérésével az immunkompetencia csökken [40].

A bél mikrobiom összetételének felborulása vagy változása kapcsolatba hozható bizonyos betegségek előfordulásával, többek között hozzájárul a bélbetegségek különböző formáinak kialakulásához. Ide tartozik az IBD két fő típusa a Crohn-betegség (CD) és a fekélyes vastagbélgyulladás (UC) is [41–46]. Előbbiben az anti-*Saccharomyces cerevisiae* antitestek jelenléte specifikusan jellemző, amit a CD szerológiai diagnosztizálásakor alkalmaznak [47,48]. Mindkét esetre az enterális baktériumok diverzitásának csökkenése jellemző [43,49]. Az irritábilis bélszindróma (IBS) esetében is megfigyelték a bakteriom, valamint a mikrobiom változásait [50,51]. Az antibiotikumok alkalmazása is képes megváltoztatni a bélflórát, illetve annak metabolomját, ami csökkentheti a szervezet védekezőképességét a toxintermelő *Clostridioides difficile* ellen, ami az antibiotikum szedéssel összefüggő vastagbélgyulladás okozója [52]. Továbbá számos más kóros állapot kialakulásában is szerepe van a bél mikrobiomban bekövetkező változásoknak. Ide tartoznak többek között az atópiás asztma [53,54], egyes viselkedészavarok (autizmus spektrum zavar, krónikus stressz) [55,56], az elhízás [57], a kettes típusú diabétesz [58], az ateroszklerózis [59], a reumás ízületi gyulladás [60], és a szklerózis multiplex [61], valamint befolyásolják egyes rák ellenes immunterápiák hatását [62,63].

A baktériumokon kívül a mikrobiomban megtalálható gombák (mikrobiom) is fontos szerepet játszanak a humán szervezet homeosztázisának fenntartásában. A bakteriommal összevetve, ami a teljes mikrobiom több mint 99%-át teszi ki fajszám tekintetében, a humán mikrobiom kevésbé diverz [64,65]. A mikrobiom fajösszetételére és a fajok számára vonatkozó adatok azonban nem feltétlenül pontosak, mivel a szekvenálási analízisekhez szükséges eszköztár nagy része baktériumokra lett kifejlesztve, így a gombák esetén a taxonok azonosítása nehézségekbe ütközik [66]. Továbbá a bél-mikrobiom fajösszetételét számos faktor befolyásolja (az életkor, a táplálkozás, az immunrendszer állapota, orvosi kezelések, genetika, a mikrobiom tagjai közötti interakciók), viszont az, hogy ezek a

tényezők milyen mértékben befolyásolják a mikrobiomot nagyrészt ismeretlen [67,68]. Végül pedig számolnunk kell azzal is, hogy vannak tiszta tenyészetbe nem vehető gombák, amik jelenlétét csak metagenom analízisekkel lehet kimutatni, illetve funkciójukat nehéz vizsgálni [69], illetve az élelmiszer eredetű gombák, amik csak tranzienesen vannak jelen a mikrobiomban. A jelenlegi kutatási eredmények alapján a csecsemők nem sokkal születésük után kolonizálódnak gombákkal, melyek főleg a *Candida*, *Saccharomyces*, *Cladosporium*, *Cryptococcus*, és *Malassezia* nemzetségekhez tartoznak [70,71]. Egészséges felnőttek esetében pedig Nash és munkatársai főleg *Saccharomyces cerevisiae*, *Malassezia restricta* és *Candida albicans* jelenlétét mutatták ki a székletminták 96,8%, 88,3% és 80,8%-ában, ami alapján feltételezhető, hogy ezek a fajok az egészséges mikrobiom legfontosabb résztvevői (1. ábra) [65]. Azonban megjegyzendő, hogy a pékélesztő részben táplálék-eredetű, így a DNS-alapú kimutatást használó tanulmányok túlbecsülhetik a *S. cerevisiae* mikrobiomban betöltött szerepét [72]. Az embert ténylegesen kolonizáló gombák korlátozott száma niche-specializációra, az egyes testtájakon megfigyelhető specifikus fajösszetétel pedig adaptációra utal. Ez egyben bizonyíték lehet egy konzervált humán mikrobiom létezésére, mely a hagyományos életmódot folytató őslakos népekben és a nyugati típusú társadalmakban is jelen van [73–75]. A bakteriom kutatásokkal ellentétben azonban kevés összefüggést találtak a mikrobiom és az egészséges egyének fiziológiás folyamatai között, ezért a gombák kolonizációjáról, illetve betegségekkel való kapcsolatokról ismereteink korlátozottak [76–78].



**1. ábra** Egészséges csecsemők és felnőttek gasztrointesztinális traktusában leggyakrabban előforduló gomba nemzetséges és fajok. Ábrakészítő alkalmazás: Biorender (<https://biorender.com/>)

Jiang és munkatársai [79] bizonyították, hogy a kommenzalista gombák, mint például a *C. albicans* vagy a *S. cerevisiae* képesek funkcionálisan helyettesíteni a baktériumokat antibiotikum kezelést követő diszbiózis esetén. Ezen felül védelmet nyújthatnak a fekélyes vastagbélgyulladás és az influenza A vírus ellen a nyálkahártya sérülések csökkentésével, valamint jelentősen befolyásolhatják

az immunválaszt. A *S. cerevisiae* sejt falában található kitin aktiválja az adaptív immunválaszt azáltal, hogy növeli tumor nekrozis faktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) és az interleukin-6 (IL-6) citokinek termelését, valamint a közvetlen antimikrobiális aktivitás által, amit a bakteriális, fungális, és toll-like receptor (TLR) ligandok általi stimuláció vált ki [80]. A gombasejtfalban megtalálható  $\beta$ -1,3-glükán esetében is hasonló mechanizmust figyeltek meg a *C. albicans*-nál [81]. A két legfontosabb fehérje, ami részt vesz a gombás fertőzésekkel szembeni védekezésben a Dectin-1 mintázatfelismerő receptor [82,83] és a CARD9 adaptor fehérje [45,84,85]; az IL-17 és az IL-22 citokinek pedig a gombák elleni nyálkahártya immunitásban vesznek részt [86–89], és serkentik az epitél sejtek antimikrobiális peptid (AMP) termelését [90–93]. A baktériumokhoz hasonlóan a gombák is termelnek metabolitokat, amik befolyásolják a szervezet homeosztázisát és élettani folyamatait [94]. A *S. cerevisiae*, *S. 'boulardii'*, és a *C. albicans* farnezolt, hosszabb szénláncú alkoholokat, tirozolt és zsírsavakat szekretálnak, melyek részt vesznek az adhézió, az élesztő-hifa tranzíció, és a biofilm képzés szabályozásában, segítve a szervezetben a kolonizációt, az inváziót és a disszeminációt [95]. Számos tanulmány egyes betegségek kialakulása szempontjából vizsgálta a mikrobiom szerepét, ezek közül a legfontosabbakat az alábbiakban részletezem.

Lewis és munkatársai [96] Crohn-betegségben szenvedő páciensek esetében nem csak a bakteriom változását figyelték meg, hanem a *Candida albicans*, *Clavispora lusitaniae*, *Cyberlindnera jadinii*, *Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomyces cerevisiae* és egyéb gomba fajok mennyisége is nőtt a bélben. Egy másik tanulmányban a *C. tropicalis* térnyerését állapították meg, valamint pozitív korrelációt írtak le a *C. tropicalis* és két baktérium, a *Serratia marcescens*, és az *E. coli* között, ami arra utal, hogy a CD kialakulásában egyes fajok közötti interakció is kiemelkedő szerepet játszik [97]. Továbbá az IBD-ben szenvedő betegek esetében a Basidiomycota/Ascomycota arány eltolódását figyelték meg, miközben egyes fajok elszaporodása (*Malassezia sympodialis*, *C. albicans*), illetve a *S. cerevisiae* mennyiségének csökkenése volt jellemző egészséges alanyokkal összehasonlítva. Ezen felül ugyanebben a tanulmányban azt is megfigyelték, hogy egyes baktériumok és gombák kölcsönhatása hozzájárulhat az IBD kialakulásához, mely egyben megerősíti a korábbi eredményeket [46]. A mikrobiom módosítása ezek alapján potenciális kezelési megoldás lehet a gyulladós bélbetegségben szenvedőknek. Ráadásul több előzetes tanulmány is beszámolt egyes gomba probiotikumok (*Saccharomycopsis fibuligera*, *Saccharomyces 'boulardii'*, *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-3856) előnyös hatásairól IBD kórképek esetén [82,98,99]. Továbbá a mikrobiomban bekövetkező változások befolyásolják a szervezet zsírmetabolizmusát [100], hozzájárulhatnak a diabétesz [101,102], az érelmeszesedés [103], egyes neurológiai betegségek [104,105], és az alkoholos májbetegség kialakulásához [106], illetve hepatitis B és HIV fertőzötteknél [107], valamint vastagbél rákban szenvedőknél [108] is megfigyelhető a mikrobiom változása. Érdekes még megemlíteni a bélfermentációs szindrómát, melynek során a bélmikrobiom egyes tagjai (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. intermedia*, *C. parapsilosis*, *K. marxianus*, *S. cerevisiae*) alkoholos

fermentáció révén a beteg véralkoholszintjének emelkedését okozzák. Kevésbé ismert, ritka betegségnek számít, így felismerése és diagnosztizálása nehézségekbe ütközik [109].

## 2.2 Probiotikumok jelentősége és klinikai felhasználása

Eiseman és munkatársai az 1950-es évek végén [110] már sikeresen alkalmazták a széklet mikrobiom transzplantációt (FMT) a *C. difficile* által okozott álhártyás vastagbélgyulladás kezelésére. Eredményeik alapján azt a következtetést vonták le, hogy a vastagbélgyulladást okozó patogének mennyisége visszaszorítható, illetve csökkenthető a bélben a normál flórában megtalálható mikroorganizmusokkal. Azóta ez az eljárás egy széleskörben elfogadott kezelési módszer a visszatérő *C. difficile* fertőzések és más mikrobiom eredetű betegségek kezelésére [111]. A csíramentes kísérleti állatok alkalmazása szintén egy mérföldkő volt a mikrobiom kutatások során [112]. Ezek a munkák alátámasztották azt, hogy a bél mikrobiom terápiás céllal tartósan megváltoztatható, ezáltal megalapozták a ma használatos probiotikum készítmények kifejlesztését.

A probiotikumok a legtöbbször olyan baktériumokat (*Lactobacillus*, *Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Enterococcus* fajok) tartalmazzák, melyek megtalálhatóak a humán gasztrointesztinális traktusban [113,114]. Azonban fontos megjegyezni, hogy a probiotikus tulajdonságok törzs-, illetve variáns-specifikusak lehetnek, azok eltérő genetikai háttere, így eltérő metabolizmusa és extracelluláris enzimeik eltérő aktivitása következtében. Ezen felül a probiotikus hatást befolyásolhatják az egyén egyedi tulajdonságai (immunitás, mikrobiom, diéta stb.) [113], valamint egyes kutatások szerint a gasztrointesztinális traktusban jelen lévő patogének is (*Helicobacter pylori*, *C. difficile*, *Borrelia* spp., *Treponema* spp., *Spirillum* spp.) [115].

A szekvenálási eljárások költséghatékonyvá válása és a tenyésztési módszerek fejlődése lehetővé tette új mikroorganizmusok izolálását és jellemzését a humán mikrobiomból, melyeket a jövőben új generációs probiotikumként lehetne alkalmazni (pl. *Akkermansia muciniphila*, *Roseburia intestinalis*, *Faecalibacterium prausnitzii*, valamint az *Eubacterium* és *Bacteroides* fajok) [116,117]. Ezek olyan bioaktív molekulákat termelnek, amiket a bifidobaktériumok vagy a laktobacillusok nem (butánsav, propionsav) [118]. Azonban nem csak baktériumok mutatnak probiotikus hatásokat, hanem a *S. cerevisiae* faj egyes törzsei is [98], de ezek közül is kiemelkedik a *S. 'boulardii'* altípus.

A *S. 'boulardii'*-t akut és krónikus gasztrointesztinális betegségek (pl. antibiotikum okozta hasmenés, IBD) esetén hatékonyan lehet alkalmazni kiegészítő kezelésként [119,120]. Probiotikus tulajdonságait több mint 80 randomizált klinikai vizsgálat igazolja a *S. 'boulardii'* CNCM I-745 törzs esetében, amit a Biocodex vállalat gyárt 1953 óta [7].

### 2.3 A *S. 'boulardii'* probiotikum eredete és taxonómiája

A jelenleg elfogadott álláspont szerint a *S. 'boulardii'*-t Henri Boulard fedezte fel 1923-ban az egykori Indokínában, ahol fermentálási folyamatokban felhasználható élesztő törzsek után kutatott. Megfigyelte, hogy azok a helyi lakosok, akik nem kapták el a kolerát egy speciális, licsi és mangosztán héjából készített teát fogyasztottak. A gyümölcsök héjáról izolált egy élesztőt, amiről feltételezte, hogy probiotikus hatása megakadályozza a kolera fertőzést, illetve csökkenti a betegség tüneteit; az élesztőt pedig *S. 'boulardii'*-nak nevezte el [7]. A *S. 'boulardii'* eredetét azonban nehéz bizonyítani. A napjainkban megjelenő cikkek is csak átveszik ezt az eredettörténetet más közleményekből, de többségük nem hivatkozik semmilyen korabeli (1920-as évekbeli) írásra, hanem általában valamilyen összefoglaló, vagy más tanulmányt használnak referenciaként. Egy francia gyógyszergyártó cég az 1950-es években kezdte el forgalmazni a *S. 'boulardii'*-t probiotikumként, és a termék honlapján sokszor szerepel utalás Henri Boulard élesztőgyűjtési tevékenységére, de az eredeti referencia itt is elmarad. A jelenleg forgalmazott *S. 'boulardii'* CNCM I-745 törzset ez a cég rakta le törzsgyűjteménybe az 1950-es években, de arról, hogy a törzset honnan szerezték eredetileg nincs pontos információ. Érdekesség, hogy McCullough és munkatársai [121] *S. 'boulardii'* probiotikum izolátumok virulenciáját vizsgáló közleményükben leírják, hogy az eredeti probiotikus élesztő még képes volt spórázni. Azonban az általuk vizsgált izolátumokra, és a napjainkban forgalmazott termékekre ez már nem jellemző. Jelenleg ezt az élesztőt árulják több, mint 80 országban probiotikumként (Európában, Észak- és Dél-Amerikában, a Középkeleten és Ázsiában) [122].

A *Saccharomyces* törzsek taxonómiája egy időben vitatott volt [121,123,124]. Az 1950-es években a *S. 'boulardii'*-t még külön fajként tartották számon, azonban a tipizálási módszerek fejlődése rávilágított arra, hogy inkább a *S. cerevisiae* variánsává kellene átsorolni. Mikroszatellita polimorfizmus és retrotranszpozon hibridizációs analízisek alapján kiderült, hogy a *S. 'boulardii'*-nak egyedi és specifikus mikroszatellita allélja van, ami különbözik a *S. cerevisiae* izolátumokétól [125,126]. Idővel a törzs besorolása megváltozott az *S. cerevisiae* Hansen Fungal Biodiversity Center (CBS) 5926-ról *S. 'boulardii'*-ra (*S. cerevisiae* var. *boulardii*) [127]. A törzset a már fentebb említett francia vállalat a Pasteur Intézet törzsgyűjteményébe rakta le Franciaországban, *S. 'boulardii'* CNCM [Collection Nationale de Cultures de microorganismes (Pasteur Institute)] I-745 néven [128]. Az *S. 'boulardii'* CNCM 1079 és az *S. cerevisiae* CNCM I-3856 törzsek hatékonyságának kiderítésére is végeztek már klinikai vizsgálatokat, és ezek is megtalálhatóak kereskedelmi forgalomban [129,130]. A *S. cerevisiae* faj filogenomikája, globális diverzitása, valamint teljesgenom evolúciója Peter és munkatársai [4] eredményei alapján lett ismeretes, melyben több mint 1000 *S. cerevisiae* genomot szekvenáltak meg, illetve elemeztek, köztük 24 *S. 'boulardii'* genomot is. A szekvenált törzsek nagy része Hennequin és munkatársai [131] törzsgyűjteményéből származtak. Eredményeik nagyságrendi előrelépést jelentettek Zhu és munkatársai [132] tanulmányához képest, melyben 132 genom került

szekvenálásra, 5 probiotikus élesztővel együtt. Peter és munkatársai [4] eredményei mutattak rá arra, hogy a *S. 'boulardii'* genomok a Wine/European élesztő kládon belül alkládot alkotnak, amelyen belül egységesen csekély változatosság tapasztalható. Ezen felül azt találták, hogy a probiotikus élesztők között nagyon kevés az aneuploid vagy poliploid törzs, és a legtöbbjük diploid, heterozigóta genommal rendelkezik. Azonban, lényeges, hogy mindkét kutatócsoport csak Illumina, short-read alapú szekvenálást végzett, long-read alapú szekvenálást nem; teljesgenom összeállítást pedig csak Peter és munkatársai [4]. A szekvenált genomok mindegyike elérhető a "Sequence Read Archive"-ban (SRA). A két kutatócsoport által megszekvenált 29 probiotikus élesztő genom közül 4 kereskedelmi izolátum, 2 gyümölcsről származó izolátum, 23 pedig klinikai izolátum (1 katéterből, 7 székletből, 9 vérből származó izolátum). Öt klinikai izolátum esetében ismeretlen, hogy melyik humán testtájrról került izolálásra.

#### **2.4 A *S. 'boulardii'* egyedi genom variációi és fenotípusa**

A *S. 'boulardii'* a *S. cerevisiae* egyes törzseinek kariotípusa hasonlít egymáshoz [133–135], de több geno- és fenotípusos vonásban eltérnek. PFGE, RADP-PCR, valamint ITS-RFLP és mikroszatellita analízisek alapján több tanulmány is kimutatta, hogy a '*S. boulardii*' törzsek egyértelműen körülhatárolható klasztert alkotnak a *S. cerevisiae* fajon belül [125,131,134,136]. Mindezen felül közeli filogenetikai rokonságban vannak a *S. cerevisiae* borélesztőkkel [4], valamint Ty1/3/4 transzpozonjaik hiányoznak [135,137] a *S. cerevisiae*-hez képest.

A probiotikus élesztőre olyan tulajdonságok jellemzőek, melyek képessé teszik a humán gasztrointesztinális traktusban való túlélésre. A *S. 'boulardii'* optimális szaporodási hőmérséklete 37 °C (humán testhőmérséklet), de a magasabb (52 °C) hőmérsékletet is jól tolerálja [136]. Ezen felül túléli a gyomorban és a duodenumban található szélsőséges körülményeket: a gyomorban a pepszin, és az erősen savas 2-3 pH, a duodenumban pedig az epesavak, a hasnyálmirigy enzimek, és a gyomorhoz képest jelentősen magasabb 7,0 pH jelent stresszkörülményt [138,139]. A *S. 'boulardii'* életképessége az emésztőrendszerben kapszulázással (zselatinnal burkolt alginát mikrogyöngy) szignifikánsan megnövelhető [140]. Az eddigi kutatások alapján a probiotikus kezelés megszakításától számítva az élesztő viszonylag gyorsan, 3–5 nap elteltével kiürül a szervezetből [141,142]. A *S. cerevisiae* és a *S. 'boulardii'* legfontosabb jellemzőit és különbségeit az 1. táblázat foglalja össze.

Génkópiaszámok tekintetében is eltérés mutatkozik, mivel a *S. 'boulardii'* esetében három kromoszómánál találhatóak kis kópiaszámú régiók a *S. cerevisiae*-hez képest. Ezek az I. kromoszóma (*PRM9*, *MST28*, *YAR047C*, *YAR050W*, *CUP1*, *YAR060W*, *YAR061W*), a VII. kromoszóma (*YGL052W*, *MST27*), és a XII. kromoszóma (*ASP3*, *YLR156W*) [143]. A nagyobb kópiaszámúban megtalálható gének főleg a fehérjeszintézisben (*RPL31A*, *RPL41A*, *RPS24B*, *RPL2B*, *RSA3*) és a

stressz válaszban (*HSP26*, *SSA3*, *SEDI*, *HSP42*, *HSP78*, *PBS2*) játszanak szerepet [143]. Egy közelmúltban megjelent tanulmány alapján az *SDHI* és *WHI2* gének kópiaszámváltozásai és szekvencia eltérései lehetnek a fokozódott ecetsav termelés genetikai okai a probiotikus élesztő esetében, mely az élesztő antibakteriális tulajdonságai közé tartozik [144]. Ezeken felül érdemes még kiemelni a pszeudohifa képzésben részt vevő gének kópiaszám eltéréseit, valamint egyes *FLO* gének (*FLO1*, *FLO8*) esetében előforduló mutációkat is [135,143]. Ezek hozzájárulhatnak a *S. 'boulardii'* gyorsabb pszeudohifa képzéséhez nitrogén éhezés esetén [143], ugyanakkor gátolják az élesztő flokkulációs és adhéziós tulajdonságait [145]. A probiotikus élesztő az alternatív szénforrások közül a galaktózt és a palatinózt nem tudja hasznosítani. Előbbit valószínűleg a *PGM2* mutációja [146], utóbbit az *IMA2*, *IMA3*, *IMA4* gének hiánya miatt [135,147].

**1. táblázat** A *S. cerevisiae* és a *S. 'boulardii'* összehasonlítása geno- és fenotípus alapján [115].

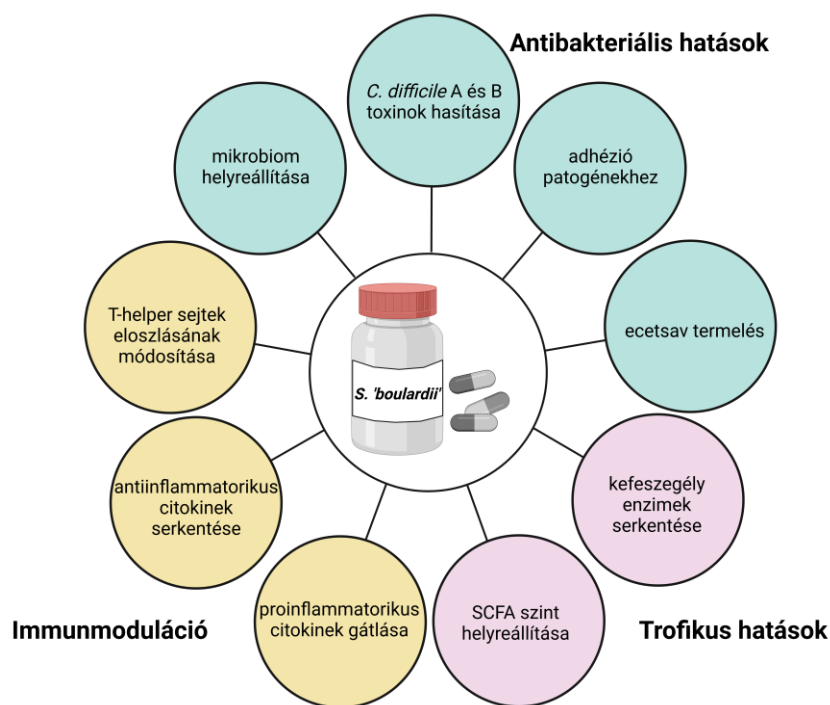
<b>Tulajdonságok</b>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. 'boulardii'</i>	
Optimális szaporodási hőmérséklet	30 °C	37 °C	
Tolerancia	magas hőmérséklet (52 °C)	45% túlélés	
	savas pH (pH = 2; egy órán keresztül)	nem–30% túlélés	65% túlélés
	lúgos pH (pH = 8)	igen	igen–75% túlélés
	epesavak (>0.3% (w/v))	nem-túlélés < 0,15% (w/v)	igen nem-túlélés < 0,10% (w/v)
Galaktóz asszimiláció	igen	nem	
Ploiditás	haploidtól poliploidig, gyakori aneuploidia	diploid, részben aneuploid	
Homotallikus/heterotallikus	homotallikus	homotallikus	
Párosodási típus	'a' és 'α'	'a' és 'α'	
Spórázás	sporogén	asporogén, utóbbi de <i>S. cerevisiae</i> -vel termékeny hibrideket tud képezni	
Pszudohifa képzés	normál	fokozott	
Retrotranszpozonok (Ty elemek)	teljes Ty elemek (általában)	nem teljes Ty1, 3 ill. 4 elemek	
Adhézió epitélium sejtekhez	Normál mikrobiom (egér és ember)	nem	nem
	Gnotobiotikus egér	ismeretlen	igen
	Ampicillinnel kezelt emberek	ismeretlen	igen

## 2.5 *S. 'boulardii'* egészségügyi hatásai, hatásmechanizmusai

### 2.5.1 Mikrobiom modifikációs és antibakteriális hatások

McFarland egyik összefoglaló közleményében [148] négy olyan cikk szerepel, melyekben önkénteseken vagy betegeken vizsgálták a *S. 'boulardii'* hatását a mikrobiomra. Zoppi és munkatársai

[149] eredményei alapján a probiotikum részben visszaállította olyan légúti fertőzésben szenvedő gyerekek eredeti mikrobiom összetételét, akik korábban ceftriaxon antibiotikum kezelésben részesültek. Két tanulmányban olyan betegeknél vizsgálták a *S. 'boulardii'* hatását, akiknél a diszbiózis nem antibiotikus kezelés, hanem egyéb ok miatt következett be. Girard-Pipau és munkatársai [150] azt találták, hogy az élesztő növelte a Gram-pozitív anaerob baktériumok, valamint három SCFA mennyiségét a bélben, Swidsinski és munkatársai [151] vizsgálatai pedig azt mutatták, hogy hasmenéses betegek esetében a *S. 'boulardii'* terápia kedvezően befolyásolta a széklet mikrobiom összetételét. Ezen felül egy 2022-ben megjelent cikkben a bél mikrobiomban előforduló antibiotikum rezisztencia gének előfordulását vizsgálták *H. pylori* eradikációs kezelésen áteső betegeknél [152]. Az eredmények azt mutatták, hogy amennyiben a betegek *S. 'boulardii'* probiotikumot szedtek, számos antibiotikummal (tetraciklin, linkozamin, valamint  $\beta$ -laktám típusú antibiotikumok) szembeni rezisztencia gén mennyisége csökkent a mikrobiomban [152]. Úgy tűnik tehát, hogy a probiotikus élesztő pozitívan befolyásolja a diszbiózissal küzdő betegek mikrobiom összetételét, azonban mindenképpen több tanulmányra lenne szükség ahhoz, hogy pontosabb képet kapjunk a *S. 'boulardii'* mikrobiom modifikációs hatásairól (2. ábra).



**2. ábra** Összefoglaló ábra a *S. 'boulardii'* probiotikum legjelentősebb egészségügyi hatásairól. Ábrakészítő alkalmazás: Biorender (<https://biorender.com/>)

A probiotikus élesztő számos antimikrobiális molekulát is termel. Többek között egyes patogének adhézióját gátló fehérjéket termel [153], valamint 54-kDa, 63-kDa és 120-kDa fehérjéket is szekretál, melyek hatásamechanizmusaival több tanulmány is foglalkozott. Az 54-kDa szerin proteáz inaktíválja a *C. difficile* A és B toxinjait, illetve gátolja azok kötődését a kefeszegély membránon lévő

receptorhoz, megakadályozva a toxinok sejtkárosító, gyulladáskeltő hatását [154,155]. A 63-kDa alkalikus foszfatáz az *Escherichia coli* felszíni lipopoliszacharid (LPS) molekuláit defoszforilálja, illetve csökkenti a TNF- $\alpha$  szintjét a szervezetben [156]. A *S. 'boulardii'* által termelt 120-kDa fehérje a kolera toxin hatásait gátolja egyrészt a cAMP szint csökkentésén (csökkenti a bélepitélium sejtek klorid szekrécióját) [157], másrészt a toxin megkötésén keresztül [158]. Mindezen felül a *S. 'boulardii'* proteázokat termel, melyek hasítják a *Bacillus anthracis* toxinjait [159], valamint egyes törzsei ecetsavat is termelnek, melynek antibakteriális hatásait *in vitro* kísérletekkel igazolták [144] (2. ábra).

A *S. 'boulardii'* sejtfalában olyan fehérjék, illetve mannán oligoszacharidok is találhatóak, melyek elősegítik az élesztő patogén baktériumokhoz [pl. *E. coli*, *Salmonella enterica* serovar. Typhimurium (*S. Typhimurium*), *Salmonella enterica* serovar. Typhi (*S. Typhi*)] való kötődését, ami meggátolhatja adhéziójukat az epitéliumhoz [160–163].

### 2.5.2 Immunmodulációs és trofikus hatások

A *S. 'boulardii'* immunmodulációs és anti-inflammatorikus hatásait több tanulmány is alátámasztja. Martins és munkatársai [163] azt találták, hogy *S. typhimurium*-mal fertőzött egerek esetében a probiotikus élesztő hatással volt a gyulladáshoz vezető folyamatokra: csökkentette az IL-8 citokin, és a MAP kinázok mennyiségét, valamint az NF- $\kappa$ B szignalizációs útvonal működését. Egy másik tanulmányban az IgA és specifikus anti-toxin A szintek növekedését írták le *C. difficile* A toxinnal kezelt egerek esetében, melyeket *S. 'boulardii'* probiotikummal kezeltek [164]. A *S. 'boulardii'* képes meggátolni a T-helper sejtek bejutását a vastagbélbe IBD esetén, így a proinflammatorikus citokinek termelődése limitált, javítva a betegség tüneteit [165]. Egyes eredmények rámutattak arra is, hogy az élesztő a gasztrointesztinális traktus különböző szakaszain (vékonybél, vastagbél) eltérő módon képes befolyásolni az immunrendszer aktivitását *S. Typhimurium* fertőzés korai fázisában [162]. A *S. 'boulardii'* fentebb említett ecetsav termelése stimulálja a regulációs T-sejtek működését és gátolja a IL-8 pro-inflammatorikus citokint, így az antimikrobiális mellett immunmodulációs hatással is bír [144] (2. ábra).

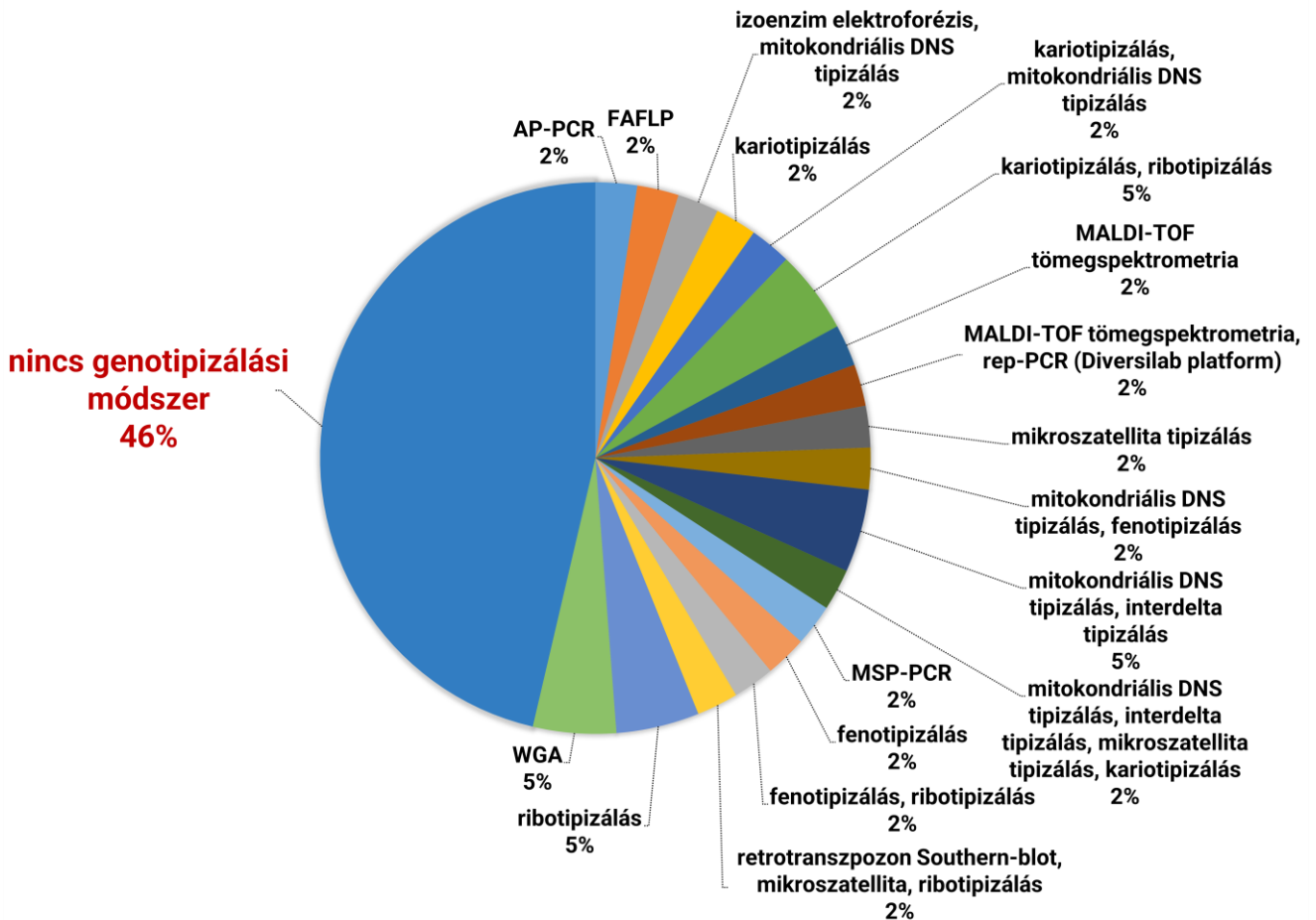
A *S. 'boulardii'* a számos kefeszegély-enzim termelődését és tápanyag transzport folyamat aktivitását serkenti. Többek között elősegíti a laktáz, maltáz és izomaltáz enzimek termelődését, serkenti a kefeszegély nátrium/glükóz kotranszporter expresszióját és nátrium függő glükóz felvételét [166–173], valamint növeli a spermin, spermidin és putreszcin szintjét patkányok éhbél nyálkahártyájában [168,170] (2. ábra).

## 2.6 A *S. 'boulardii'*, mint a fungémia kórokozója

A kórházban ápolott, kritikus állapotú betegek körében nagy a nozokomiális bakteriális, illetve gombás fertőzések kockázata. Az ilyen betegekre azonban akár a probiotikumok alkalmazása is veszélyes lehet, és ez alól a *S. 'boulardii'* sem kivétel [11,174,175]. Egy nemrég megjelent tanulmány szerint a probiotikum eredetű véráram-fertőzések több mint felét (50,6 %) a *Saccharomyces* élesztők okozzák világszerte (annak ellenére, hogy általánosságban biztonságosnak tekintett, azaz GRAS mikroorganizmusként tartjuk számon), más, bakteriális probiotikum nemzetségek (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacillus*, *Pediococcus*, *Escherichia*) okozta fertőzések mellett [11]. A legtöbb esetben a csecsemőket, valamint az immunhiányos, idős, illetve katéterezett betegeket érintik a probiotikum okozta fertőzések [11]. Az elmúlt években egyre több *Saccharomyces* fungémiáról szóló esettanulmány jelent meg [8,10,176,177]. A levegő, különböző felületek, valamint az egészségügyi dolgozók kezének probiotikus élesztővel történő kontaminációját is összefüggésbe hozták katéterezett betegek fungémiás fertőzéseivel [174]. Mindezekon felül, a *S. 'boulardii'* az egyetlen probiotikus mikroorganizmus, mely sorozatos, betegről betegre terjedő fertőzést okozott egy kórházban [178]. Egy nemrég megjelent retrospektív tanulmány szerint a *S. 'boulardii'* fungémia incidenciája magasabb volt egy amerikai kórházban, mint a *C. albicans* okozta fungémiáé (1,7 eset/10 000 betegnap, illetve 1,03 eset/10 000 betegnap), ez a szám pedig a betegek intenzív osztályra kerülésével jelentősen nőtt (0,47 eset/1000 betegnap) [179]. Mivel ezek alapján a *S. 'boulardii'*-t potenciális patogénként tarthatjuk számon, az egészségügyi kockázatok csökkentése érdekében a probiotikus élesztők mellékhatásainak és epidemiológiájának felderítése fontos kutatási terület. Több élesztőt is (ún. nem-*Candida albicans* élesztőket) azonosítottak már feltörekvő vagy potenciális patogénként és több módszer is kifejlesztésre került, melyekkel megbízhatóan lehet azonosítani ezeket a fajokat, és amiket akár a klinikai diagnosztikában is lehet alkalmazni [180,181]. Azonban az élesztő patogének fajon belüli diverzitása elhanyagolt. A *S. cerevisie*-t több tanulmány is egyenesen potenciális patogénként tartja számon [182,183] és számos kládjában azonosítottak klinikai izolátumokat is [4]. Ennek ellenére a faj ilyen jellegű diverzitását általában nem veszik figyelembe az esettanulmányokban, még akkor sem, ha a fertőzés valószínűleg probiotikus eredetű.

Összesen 41 olyan publikáció jelent meg a szubtipizálással foglalkozó publikációnk megjelenésig tartó 10 évben 1999–2019 között, melyek *S. 'boulardii'* fertőzésről számoltak be. Ezeknek majdnem felében (46%) nem alkalmaztak semmilyen genetikai módszert, hogy megállapítsák, a fertőzéseket élesztő probiotikum okozta-e vagy sem (3. ábra, F1. táblázat). A genotipizálási módszert alkalmazó tanulmányok esetében többféle, eltérő felbontással bíró módszert alkalmaztak, a szubtipizálási technikák pedig főleg interdelta elemzésen (egy fingerprinting módszer, mely a Ty transzpozonok végálló ismétlődéseit veszi figyelembe) vagy mikroszatellita analízisen (nem széleskörben elterjedt módszer) alapultak [126,131,184]. A szubtipizálás általános hiánya

akadályozza a *S. 'boulardii'* probiotikumok és a *S. cerevisiae* faj egészségügyi kockázatainak megfelelő értékelését.



**3. ábra** Tipizálási módszerek alkalmazásának százalékos megoszlása 1999-2019 között megjelent *S. 'boulardii'* fertőzésekről szóló esettanulmányokban és publikációkban (41 db).

### 2.6.1 A probiotikus élesztő potenciális virulencia faktorai

A *S. 'boulardii'* mikózisok fentebb említett magas aránya miatt [11] több kutatásban is vizsgálták a probiotikus élesztők patomechanizmusát és virulencia faktorait, gyakran más, korlátozott számú *Saccharomyces* izolátummal összehasonlítva. Anoop és munkatársai [185] patogén *Saccharomyces*-ekről szóló összefoglaló cikkükben arról írtak, hogy a *S. cerevisiae* törzsek patogenitásának felmérésekor olyan komplex megközelítés szükséges, mely során az immunrendszer, a gasztrointesztinális barrier, valamint a *S. 'boulardii'* epidemiológiája, virulencia faktorai és fiziológiája is vizsgálatra kerül. Így több fenotípus vizsgálatát is javasolják egyszerre, többek között a nagy hőmérséklettűrést [186–189], a pseudohifás [187–189] és invazív növekedést [187,189,190], az extracelluláris enzintermelést (proteáz és foszfolipáz aktivitás) [188,189], az emlőssejtekhez való adhéziót [187,191–193], a veleszületett immunrendszer aktiválását (citokintermelés, fagocitózis) [192,193], valamint az oxidatív stresszválaszt [194]. McCullogh és munkatársai [121], illetve Yáñez

és munkatársai [192] vizsgálataikban közepes mértékű virulenciát találtak a probiotikus élesztőnél egérmódelben.

Mindkét említett tanulmány nem közeli rokon, részben klinikai eredetű élesztőizolátumokhoz hasonlította a *S. 'boulardii'*-t. Klingberg és munkatársai [187] nem találtak olyan specifikus virulencia faktorokat (az invazivitás, pszeudohifa növekedés, az epitéliumhoz való adhézió, valamint az epitélium károsítási képességének vizsgálatát követően), amik megkülönböztetnék a klinikai *Saccharomyces* izolátumokat a többi *Saccharomyces* izolátumtól, beleértve három kereskedelmi *S. 'boulardii'* izolátumot. Utóbbiak nem voltak invazívak, pszeudohifa növekedést pedig csak kis nitrogén tartalmú táptalajon mutattak. de Llanos és munkatársai [195] már kétféle egérmódellet használtak, azonban csupán egyetlen kereskedelmi *S. 'boulardii'* izolátumot vizsgáltak. A munka során magasabb, közepes mértékű virulenciát tapasztaltak egy pékélesztő és a *S. 'boulardii'* esetében más *Saccharomyces* izolátumokkal összehasonlítva. Egy későbbi tanulmányban azt találták, hogy a probiotikus élesztő, más nem rokon klinikai izolátumokkal együtt, nem volt képes áthatolni a Caco-2 epitélium modellen *in vitro* [191]. Llopis és munkatársai [196] egy kereskedelmi *S. 'boulardii'* izolátumot hasonlítottak össze, más nem rokon, probiotikumban és étrendkiegészítőben megtalálható *Saccharomyces* élesztővel együtt két virulens, klinikai nem-*boulardii* izolátummal. Az eredmények azt mutatták, hogy a *S. 'boulardii'* törzs képes volt nőni 42 °C-on, és mérsékelt virulenciát mutatott néhány kísérletben (pszeudohifa növekedés, foszfolipáz szekréció) a többi élesztő izolátummal összehasonlítva.

A számos esettanulmány, összefoglaló tanulmány és kutatási eredmény ellenére, melyek összehasonlítják a probiotikus élesztők és más *S. cerevisiae* izolátumok fenotípusát, rendkívül ritkák azok a publikációk, melyekben betegből származó *S. 'boulardii'* izolátumokat hasonlítanak össze magával a kereskedelemben kapható probiotikus élesztővel. Legjobb tudomásunk szerint eddig mindösszesen két ilyen tanulmány jelent meg. Pfliegler és munkatársai [197] egy probiotikum eredetű klinikai izolátumot hasonlítottak össze egy Magyarországon is kapható probiotikus élesztőt tartalmazó termékkel. Az eredmények azt mutatták, hogy a két izolátum fenotípusos tulajdonságai nagymértékben hasonlítanak, szemben a pékélesztő eredetű klinikai izolátumokkal, melyek szembetűnő gazdaszervezetben belüli változásokon mentek keresztül. Ezen kívül Peter és munkatársai [4] vizsgálták a klinikai és kereskedelmi *S. 'boulardii'* izolátumok közötti eltéréseket. Tanulmányukban 24 *S. 'boulardii'* izolátumot soroltak fel, melyek egy al-kládot alkotnak az általuk vizsgált 1011 *S. cerevisiae* izolátum között. Habár több körülmény között is vizsgálták az élesztő izolátumok szaporodását, nem tettek összehasonlítást az egy kládon belüli kereskedelmi és klinikai törzsek fenotípusos tulajdonságai között. Így ezek alapján nem lehet megállapítani, hogy a probiotikus élesztő képes-e új tulajdonságokat kialakítani a gazdaszervezetben jelen lévő szelekciós körülmények hatására (akár kolonizálás, akár fertőzés során). Mint a faj filogéniájának ismertetésénél tárgyaltuk, a probiotikus élesztők kládja nagyon közeli rokon izolátumokat foglal magában, de ezek genetikailag

nem teljesen egyeznek meg [4], illetve még a kereskedelemben kapható élesztő probiotikumok is több, fenotípusosan eltérő szubklón sejtvonalat tartalmaznak [198]. Ez az állandóan jelen lévő genetikai és fenotípusos változékonyság a gazdaszervezeten belüli szelekcióhoz és evolúcióhoz vezethet [vö. [197]], amelyet érdemes lesz a jövőben részletesebben tanulmányozni.

## 2.6.2 Immunválasz az invazív gombás megbetegedések esetén

Az immunrendszer állapota nagy szerepet játszik a gombás megbetegedések kialakulásában, köztük az életveszélyt jelentő fungémia esetében. Emiatt a fungémia kialakulása különösen az immunhiányos pácienseket, koraszülötteket és időseket veszélyezteti. Emelt kockázatot jelent még többek között a beteg sürgősségi osztályon történő elhelyezése, a teljes parenterális táplálás, valamint a katéter alkalmazása is [199]. Az immunrendszer először az immun- [dendritikus sejtek (DC), makrofágok, polimorfonukleáris leukociták (PMN), B és T sejtek] és nem-immun sejteken (epitélium sejtek, fibroblasztok) egyaránt megtalálható patogén felismerő receptorokon (PRR) keresztül ismeri fel a gomba patogén asszociált molekuláris mintázatait (PAMP) [200]. A gombák sejtfalában megtalálható leggyakoribb PAMP-ok az  $\alpha$ - és  $\beta$ -glükán, az N-, illetve O-kapcsolt és terminális mannánok, a foszfolipomannán, a lipoproteinek, az  $\alpha$ -mannán, valamint a mannóz [200–204]. A PRR-k közül a Toll-szerű receptorok (TLR), az ún. "nucleotide-binding oligomerization domain" (NOD)-like receptorok (NLR), és C-típusú lektin receptorok (CLR) vesznek részt a patogén gombák felismerésében, illetve elősegítik az antifungális válasz kialakulását [200–204].

A PRR-k és PAMP-ok kölcsönhatása többféle immunválaszt vált ki (fagocitózis, citokinek, kemokinek és antimikrobiális peptidok termelése). Gyulladásos citokinek termelődnek például a TLR-2 és TLR-4 receptorok, valamint a mannán származékok interakciója következtében, melyek indukálják az T-sejtek Th1 és Treg sejté érését [205]. Hasonló módon gyulladásos citokinek termelődnek a dektin-1,2 CLR receptorok, valamint az  $\alpha$ -mannánok és a  $\beta$ -glükánok kölcsönhatása következtében, mely a Th1 és Th17 sejtek differenciációját segíti elő [206]. A MINCLE receptor a mannóz ligandokat felismerő receptor, mely a TNF- $\alpha$  és IL-10 citokinek termelődését indukálja [207]. A CARD-9 fehérjének jelentős szerepe van a gombás megbetegedések lefolyásában, mivel a dektin-1,2 és MINCLE receptorok is a CARD9-BCL10-MALT1 szignalizációs kaszkádon keresztül fejtik ki hatásukat. A fehérje hiánya növeli a gombás fertőzések kialakulásának kockázatát [208,209]. A mannóz receptor (MR) az IL-17 citokin [210,211], a DCSIGN pedig az IL-6 és IL-10 citokinek termelődését segíti elő [212,213]. IL-12 és kemokinek jelenlétekor a DC-k a nyirokcsomókba vándorolnak, ahol az éretlen T-sejteknek prezentálják az antigéneket, elősegítve a T-sejtek Th- és Tc-sejteké differenciálódását [204]. Ezek citokinek termelésén keresztül fejtik ki effektor funkcióikat. A Th1- és Th17-sejtek kemokinek segítségével visszamigrálnak a fertőzés helyére és aktiválják a makrofágokat és PMN-eket [204].

A veleszületett immunrendszer is részt vesz az antifungális válasz kialakításában. A makrofágok, dendritikus sejtek és a PMN-k képesek fagocitálni a patogén gombát, majd a makrofágok és PMN-k antimikrobiális peptideket, gyulladáscitokineket, és kemokineket termelnek [204]. A természetes ölüsejteket (NK-sejtek) is számos gombakomponens aktiválja, és citotoxikus molekulák termelésével közvetlenül gyakorolnak gátló hatást a gombákra [204].

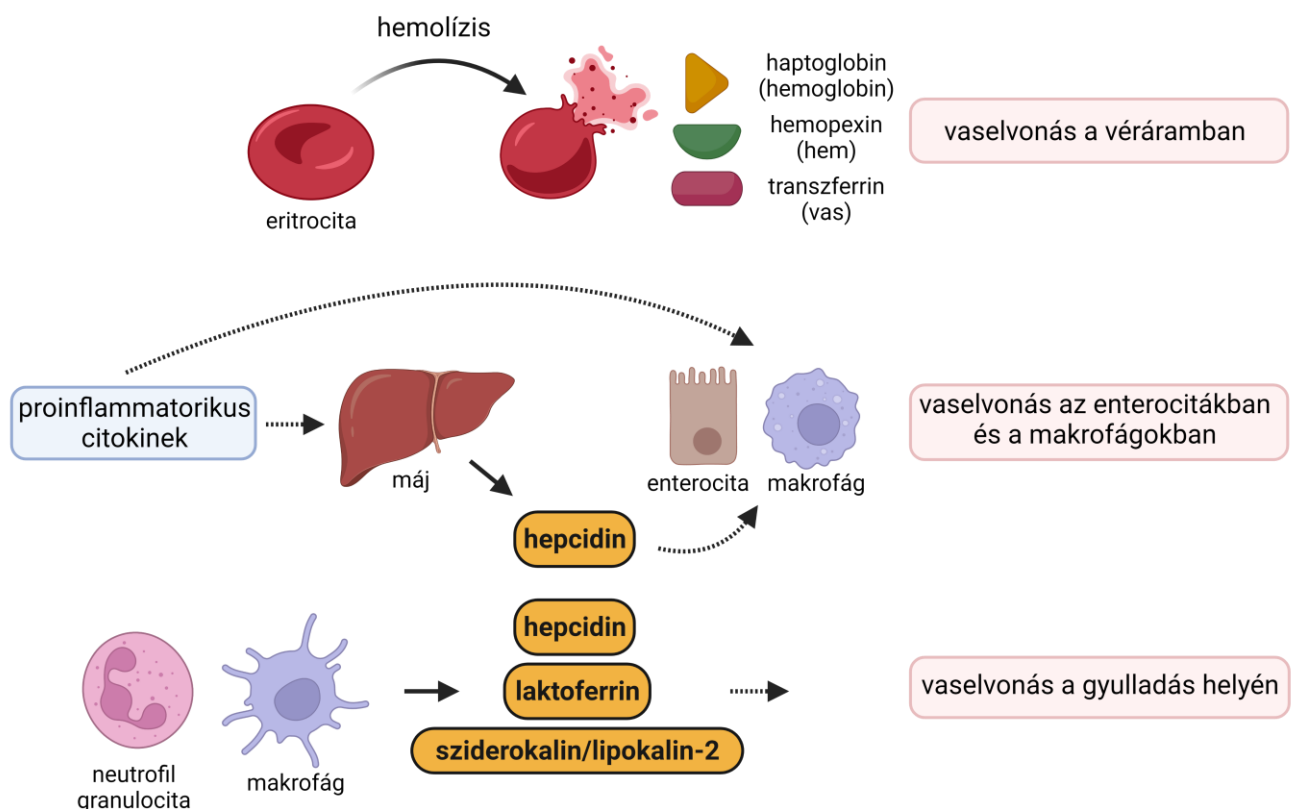
## 2.7 A vas szerepe a humán patogének túlélésében

A *S. 'boulardii'* fungémiák patomechanizmusa, a virulencia faktorok, melyek segítik a probiotikus élesztőt a véráramban való fennmaradásban, valamint az, hogy ez az élesztő hogyan kolonizálja szisztémás fertőzéskor a szerveket még mindig tisztázatlan és nem kellően kutatott tényezők. Fungémia során az élesztő számára környezetet biztosító véráramban jelen lévő faktorok a gazdaszervezetben, és az élesztő ezekre adott válaszai fontos szerepet játszanak a patogenitásban [214]. Mint minden eukarióta szervezetben, a vas kritikus szerepet játszik az emberben, és kofaktorként működik az elektrontranszport-láncban, az oxigénszállításban, a DNS szintézisben és javításban, valamint a metalloproteinek felépítésében is részt vesz [215]. Vastúlterhelés, illetve a szabad vas megjelenése esetén azonban toxikus folyamatok indulnak be a szervezetben, mivel a vas a Fenton-reakció követeztében katalizálja a hidroxilgyökök képződését, ami komoly sejtkárosodást okoz [216,217]. Ennek megelőzése érdekében a humán szervezetben szabályozó mechanizmusok fejlődtek ki, melyek csökkentik a szabad vas mennyiségét a vérben, illetve a patogének által okozott gyulladások környékén (4. ábra).

A vas döntő többsége a véráramon belül az eritrocitákban lévő hemoglobin molekulákban található meg, melyek mindegyikéhez négy hem molekula kötődik. Mindegyik eritrocita körülbelül 280 millió hemoglobin molekulát tartalmaz, így egy vörösvértestben több mint 1 milliárd vas atom található [218]. A hemoglobin elsődleges funkcióján, a légzési gázok szállításán (oxigén szállítása a szövetekhez, szén-dioxid, és szén-monoxid eltávolítása a szervezetből) kívül számos egyéb funkciót lát el: katalízisben [nitrit reductáz, nitrogén-monoxid (NO) dioxygenáz, monooxygenáz, alkilhidroxiperoxidáz, észteráz, lipoxigenáz], a NO metabolizmusban, a pH szabályzásában és a redox egyensúly fenntartásában is részt vesz [219]. Az elöregedett hemoglobin molekulákat a makrofágok bontják le a retikuloendoteliális rendszerben a hem oxigenáz-1 enzim (HO-1) segítségével. A HO-1 aktivitása révén szabad vas, szén-monoxid (CO) és biliverdin keletkezik. A vas ezt követően ferroportin csatornákon keresztül visszajut a vérbe, ahol transferrin és ferritin molekulákhoz kötődik. Tehát még a vörösvértestek elöregedésekor felszabaduló vas is fehérjéhez kötötten van jelen a vérben, megnehezítve a patogén mikroorganizmusok számára annak felvételét és hasznosítását.

Egyes patogének mechanizmusokat fejlesztettek ki a vas, illetve vastartalmú hemoglobin és hem megkötésére, hasznosítására, akár a vörösvértestek lizálásán, roncsolásán keresztül is. Azonban

az így felszabadult hemoglobint a haptoglobin, a hemet pedig a hemopexin fehérje köti, ami limitálja a patogén organizmus számára a vas elérhetőségét (4. ábra). A vasat pedig nem csak a transferrin, hanem más molekulák is képesek kötni (ugyan kisebb affinitással), mint például az albumin, a citrát és egyes aminosavak [218]. Gyulladás, illetve patogének megjelenése esetén a máj, a neutrofil granulociták, valamint a makrofágok hepcidint termelnek, ami csökkenti a szabad vas mennyiségét a fertőzés helyén, egyfajta anyagcsere által kiváltott immunitásként (angol szakirodalomban "nutritional immunity") (3. ábra) [218,220,221]. Az IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 és IL-6 citokinek pedig a hepcidintől független útvonalon akadályozzák meg a patogének vasfelvételét [222,223]. Mindezen felül a nyálkahártya szekréciójában, valamint a neutrofil granulociták granulumaiban megtalálható egy glikoprotein (laktoferrin), ami nagy affinitással köti meg a vasat, limitálva a felvehető vas mennyiségét a nyálkahártya felületeken, és a fertőzés helyén (4. ábra) [224]. Ezek a folyamatok együttesen egy vashiányos környezetet hoznak létre a patogén organizmusok környezetében (4. ábra) [216].

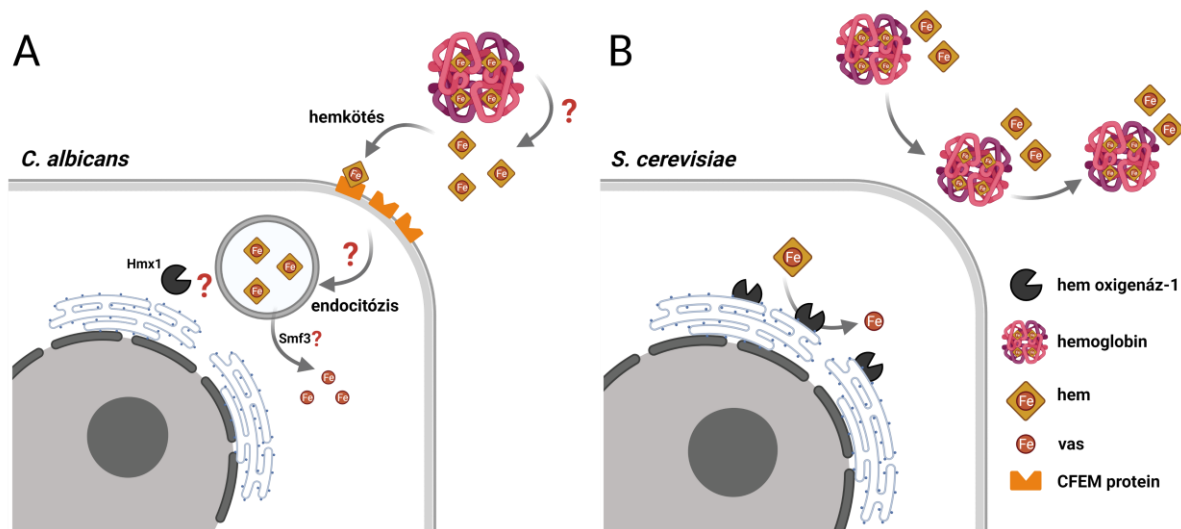


**4. ábra** A humán szervezet leggyakoribb folyamatai, melyek limitálják a szabad vas, illetve a hemoglobin és hem előfordulását a véráramban és a szervezet más részein patogének megjelenése esetén. Ábrakészítő alkalmazás: Biorender (<https://biorender.com/>)

### 2.7.1 A hem-vas hasznosítása az élesztő hem oxigenáz-1 (Hmx1) enzime által

Az elérhető szabad vas jelenléte kritikus faktor a patogén gombák túléléséhez [216] és a *Saccharomyces* fajok, ideértve a probiotikus élesztőt is, sem kivételek ez alól. Vashiány esetén az élesztő Aft1/Aft2 transzkripciós faktorai aktiválják a vas metabolizmus szabályozásáért felelős olyan géneket, melyek az extracelluláris vas felvételéért és az intracelluláris vas mobilizálásáért felelősek [225]. *Saccharomyces* élesztőkben az egyik fontos eleme ennek a rendszernek az endoplazmatikus retikulumhoz (ER) kötött vas újrahasznosító fehérje, a hem oxigenáz-1 (Hmx1), melyet a *HMX1* gén (*YLR205C*; XII. kromoszóma jobb karján) kódol (5. B ábra). Hem oxigenáz aktivitása révén a hem lebomlását idézi elő, melynek eredményeképp szén-monoxid, biliverdin és szabad vas keletkezik [226,227]. A különböző *Candida*-fajokban (*C. albicans*, *C. auris*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*) is megtalálható ortológja, és 317 aminosavból áll [226,228–230]. *C. albicans*ban a *HMX1* jelentősen hozzájárul a gomba patogenitásához [231]. Ez közvetlenül összefügghet a gazdaszervezet hemből és hemfehérjékből, például a hemoglobinnal származó vas felhasználásával [231]. Ugyanakkor a közelmúltban kiderült, hogy a CaHmx1-nek inkább a hem által okozott toxicitás elkerülésében van szerepe a *C. albicans* élesztőfajban [232]. A CaHmx1 sejten belüli lokalizációja még nem tisztázott, valamint a szabad hem és a hemoglobin hem felhasználásában szerepet játszó egyéb enzimek sincsenek még meghatározva (5. A ábra) [232–234]. A *Candida*-fajoknál a hemből és hemoglobinnal található vas megkötése és felvétele az Rbt5, Rbt51/Pga10, Pga7 és Csa2 extracelluláris membrán fehérjéken (CFEM) keresztül, a CFEM hem transzfer kaskád segítségével történik [233–235]. Az eddigi genetikai és biokémiai adatok alapján a hem extrakciója extracellulárisan történik a hemoglobinnal, majd a CFEM fehérje kaskád segítségével az endocitotikus rendszerbe továbbítódik. Ennek eredményeként a hem endoszómába kerül, ahol a vas felszabadul, és feltehetően az Smf3 transzporter fehérje által a citoszolba exportálódik (5. A ábra) [30].

Bár a *S. cerevisiae* Hmx1 enzimének hem lebontó aktivitása régóta ismert, funkcióját még nem hozták összefüggésbe az élesztő patogenitásával. Más *S. cerevisiae*-hez hasonlóan a *S. 'boulardii'* is hordozza a *HMX1* gént, és korábbi vizsgálatunk szerint a probiotikus élesztőben egy extra szerin aminosavval hosszabb fehérjét kódol az S288c referenciagénhez képest [176].



**5. ábra** A *C. albicans* és *S. cerevisiae* szabad hem és hemoglobin hem felhasználásának sematikus ábrázolása. A) A *C. albicans* glikozilfoszfatidilinozitol (GPI) kapcsolt CFEM sejt felszíni fehérjékkel rendelkezik, melyekkel lehetséges az extracelluláris hem endocitózissal történő felvétele. A CaHmx1 képes a hem lebontására azonban a hem vas hasznosításának több lépése nem tisztázott még (kérdőjelekkel jelölve)[232–235]. B) A *S. cerevisiae* sejt falán nincsenek hemet kötő proteinek, így nem képes a sejten kívüli szabad hemet, illetve hemoglobin hemet hasznosítani [225]. A Hmx1 ebben az esetben ER-hez kötött, így csak a sejten belül található hemet képes lebontani. Ábrakészítő alkalmazás: Biorender (<https://biorender.com/>)

### 2.7.2 A *S. cerevisiae* hemolitikus aktivitása

A *C. albicans* feltételezett hemolizin termelése jelentősen hozzájárul a hemoglobin hem felvételéhez azáltal, hogy a vörösvértestek hemolízisével hemoglobin kerül a véráramba [236–238]. Bár a *S. cerevisiae* Hmx1 hem lebontó aktivitása régóta ismert, funkcióját még nem hozták összefüggésbe az élesztő patogenitásával. A *S. cerevisiae*-hez hasonlóan a *S. 'boulardii'* is hordozza a *HMX1* gént [135].

A *S. cerevisiae*-ben ritka a mikrobiológiai *in vitro* módszerekkel (véres agaron) kimutatható hemolitikus képesség, habár korábbi tanulmányok szerint az alkohol okozta stressz hidrogén peroxid és lítikus lipidek felszabadulását idézi elő, ami hozzájárulhat a vörösvértestek károsodásához agarlemezen is [239,240]. A *S. cerevisiae*-nek nincsenek hem-kötő proteinjei, így nem képes a hem vagy a hemoglobin felvételére és a bennük lévő vas hasznosítására (5. B ábra) [225]. A *S. 'boulardii'* esetében nem írtak még le hemolitikus aktivitást, azonban fontos megjegyezni, hogy az ezt vizsgáló tanulmányokban tripton-szója vagy Columbia agar alapú véresagart használtak, melyek elsődlegesen baktériumok tenyésztésére alkalmas táptalajok [239,241,242]. Ilyen táptalaj használata élesztőknél az optimálistól eltérő szaporodást és metabolikus aktivitást okozhat, mely torzíthatja a hemolízis vizsgálatánál kapott eredményeket, ezért használatukat az említett tanulmányokban metodikai hibának tartjuk.

### 3. CÉLKITŰZÉS

Munkánk fő célja a *S. 'boulardii'* probiotikus élesztő fungémia kialakulási mechanizmusának tanulmányozása volt, *in vitro* és *in vivo* modellek, valamint a CRISPR/Cas9 genom szerkesztési módszer alkalmazásával. A törzsgyűjteményünkben kereskedelmi és klinikai izolátumok (vérizolátumok is) egyaránt rendelkezésünkre álltak, így lehetőségünk volt összehasonlításokat végezni a különböző forrásból származó élesztők között.

Ezt alapul véve az alábbi célkitűzéseket fogalmaztuk meg:

1. Egy olyan megbízható diagnosztikai módszer kifejlesztése és optimalizálása, mellyel egyértelműen el lehet különíteni a *S. 'boulardii'* probiotikum eredetű klinikai izolátumokat más *Saccharomyces* vagy akár más élesztő fajoktól.
2. A *S. 'boulardii'* kereskedelmi és klinikai izolátumok virulencia faktorainak *in vitro* (alkalikus foszfatáz termelés, proteáz termelés, hemolitikus aktivitás) és *in vivo* (*Galleria melonella* lárva, és immunszuppresszált BALB/c egér modell) vizsgálata az élesztő fertőzési képességének felmérése céljából.
3. A probiotikus élesztőizolátumok genomikai analízise az egyik kereskedelmi törzs long-read (Oxford Nanopore Technologies; MinION készülék) teljesgenom szekvenálását és genomjának összeállítását és annotálását követően.
4. A szakirodalom alapján a hipotézisünk az volt, hogy az élesztő hem oxigenáz génje (*HMX1*) virulencia faktor lehet, ami elősegíti az élesztő túlélését emlős gazdaszervezetben. Tervünk a *HMX1* gén szerepének felderítése volt az élesztő vérben való túlélésében és virulenciájában, CRISPR/Cas9 módszerrel történő gendeléción és a deléciós törzsek jellemzésén keresztül.

## 4. METODIKÁK

### 4.1 Felhasznált izolátumok és törzsek, törzsfenntartás

A kísérletekben 14 magyarországi *S. boulardii* izolátumot használtunk fel. Ezek közül négy izolátum kereskedelmi (*S. 'boulardii'* CNCM I-745), tíz izolátum pedig klinikai volt (2. táblázat) [214]. A kereskedelmi izolátumok két magyarországon kapható termékből kerültek izolálásra Tanszékünkön. Azért, hogy figyelembe vegyünk a klonális heterogenitást, mindegyik termékből két-két izolátumot vizsgáltunk. A klinikai izolátumok a Debreceni és a Szegedi Egyetem Klinikai Központjának gyűjteményéből származtak, és eredetükről részletes betegadatok álltak rendelkezésre (2. táblázat) [214]. A termék helytelen kórházi alkalmazását (a termék kinyitása a páciensek közvetlen közelében) nem tartottuk valószínűnek, így a kontamináció esélyét elenyészőnek vettük. A betegek adatait az EU, az állami és a helyi előírásoknak megfelelően kezeltük, a Debreceni Regionális és Intézményi Kutatásetikai Tanács klinikai vizsgálati etikai jóváhagyásával (DE RKEB/IKEB 5194-2019). Hat izolátumból homozigóta hem oxigenáz-1 (*HMXI*) deléciós mutáns törzset hoztunk létre a CRISPR/Cas9 genom editálási technológia segítségével, ezeket egyedi törzsazonosítóval láttuk el (2. táblázat). Az izolátumokat és törzseket három csoportba osztottuk eredetük alapján, melyek a következők voltak: kereskedelmi (C; PY0001, PY0002, PY0003, PY0004), mikózist nem okozó (NM; DE27020, DE3912, DE42533, DE42807, DE45866, 465/2018, 551/2018, 2251/2018), és mikózist okozó izolátumok (M; DE6507, DE35762). A *HMXI* deléciós törzseket is hasonlóképpen osztottuk csoportokba:  $\Delta\Delta$ kereskedelmi (AI0001, AI0003),  $\Delta\Delta$ mikózist nem okozó (AI0005, AI0007), és  $\Delta\Delta$ mikózist okozó (AI0009, AI0011) törzsek (2. táblázat).

Az izolátumok első faji identifikálása MALDI-TOF eljárással történt a Debreceni Egyetem Orvosi Mikrobiológia Intézetében, illetve a Szegedi Egyetem Klinika központjában. A tömegspektrumok Microflex Biotyper-rel lettek előállítva (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA) a gyártó szabványos beállításait használva. A tömegspektrometriai profilok a flexControl 3.0-s verziójú szoftverrel (Bruker Daltonics) lettek felvéve, és 2000 és 20 000 Da közötti tömegtartományban kerültek elemzésre. Az így kapott eredmények a Bruker Daltonics adatbázissal vetették össze az Intézet diagnosztái.

Az izolátumokat 30% glicerint tartalmazó YPD tápközegben tároltuk (VWR Chemicals, Solon, OH, USA, pH 5,8)  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on. A törzsfenntartásnál figyelmet fordítottunk arra, hogy minimalizáljuk az átoltások számát azért, hogy megakadályozzuk a potenciális geno- és fenotípusos változások felhalmozódását a mintákban, mely az élesztőtörzseknél nemrégiben kimutatott és részletesen vizsgált klonális heterogenitás jelensége miatt történhet [198]. Ezért a kísérleteket mindig az eredeti,  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tárolt izolátumokkal végeztük két átoltást követően, tehát először  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on,

48 órán keresztül inkubáltuk az izolátumokat "Yeast Peptone Dextrose" (YPD) agar táptalajon, majd ezeket a tenyészeteket használtuk közvetlenül az adott kísérlethez.

Patogén pozitív kontrollként a *C. albicans* SC5314 típusörzset használtuk egyes patogenitási teszteknel, a multiplex PCR módszer negatív kontroljaként pedig a *Pichia kudriavzevii* (= *Candida krusei*) DE22293 izolátumot (Debreceni Egyetem Orvosi Mikrobiológiai Intézet gyűjteményéből).

**2. táblázat** A felhasznált *S. cerevisiae* és *S. 'boulardii'* izolátumok, valamint  $\Delta\Delta HMX1$  mutáns törzsek.

#sorszám	ID	$\Delta\Delta HMX1$ mutáns	Típus	Formulázás	Termék fajösszetétele	Beszerzés helye	Izolálás ideje	Gyártási ország		
1	PY0001	AI0001	kereskedelmi izolátum	szárított	<i>S. 'boulardii'</i>	Debrecen, Magyarország	2015. márc.	Franciaország		
2	PY0002	AI0003	kereskedelmi izolátum	szárított	<i>S. 'boulardii'</i>	Debrecen, Magyarország	2017. nov.	Franciaország		
3	PY0003	–	kereskedelmi izolátum	szárított	<i>S. 'boulardii'</i> + <i>L. rhamnosus</i>	Debrecen, Magyarország	2017. szept.	Csehország		
4	PY0004	–	kereskedelmi izolátum	szárított	<i>S. 'boulardii'</i> + <i>L. rhamnosus</i>	Debrecen, Magyarország	2017. nov.	Csehország		
#sorszám	ID	$\Delta\Delta HMX1$ mutáns	Típus	Életkor a mintavétel idején	Nem	Egészségi állapot az izoláláskor	Mikózis	Mintavétel helye	Mintavétel ideje	Földrajzi hely
5	DE342	–	klinikai izolátum	40	♀	hüvelygyulladás	igen	méhszáj	2018. jan. 3.	DE Klinika Központ
6	DE722	–	klinikai izolátum	29	♀	veszélyesztetett terhesség	nem	méhszáj	2018. jan. 8.	DE Klinika Központ
7	DE3912	–	klinikai izolátum	85	♂	tüdőgyulladás	nem	légcső (légcső kanül)	2018. jan. 31.	DE Klinika Központ
8	DE6507	AI0009	klinikai izolátum	63	♂	tüdőgyulladás	igen	hemokultúra	2017. febr. 18.	DE Klinika Központ
9	DE10397	–	klinikai izolátum	67	♂	szív és érrendszeri megbetegedés	nem	légcső (légcső kanül)	2018. márc. 14.	DE Klinika Központ
10	DE11595	–	klinikai izolátum	45	♂	subarachnoidális vérzés	igen	hemokultúra	2018. márc. 22.	DE Klinika Központ
11	DE22293	–	klinikai izolátum	36	♂	akut hasnyálmirigygyulladás	nem	hörgő (mintavétel az intubáció során)	2015. júl. 11.	DE Klinika Központ
12	DE27020	–	klinikai izolátum	40	♀	szepszis (bakteriális)	nem	hörgő (mintavétel az intubáció során)	2015. aug. 23.	DE Klinika Központ
13	DE27290	–	klinikai izolátum	71	♂	aorta szűkület	nem	hörgő (mintavétel az intubáció során)	2015. aug. 25.	DE Klinika Központ
14	DE29607	–	klinikai izolátum	61	♂	tüdőrák	nem	köpet	2015. szept. 16.	DE Klinika Központ
15	DE35762	AI0011	klinikai izolátum	66	♀	légzési elégtelenség	igen	hemokultúra	2015. nov. 5.	DE Klinika Központ
16	DE42533	–	klinikai	2	♂	folyadék	nem	torok	2017. dec. 15.	DE Klinika

			izolátum	homeosztázis zavar					Központ	
17	DE42651	-	klinikai izolátum	59	♂	90% os égési sérülés	nem	orr	2017. dec. 2.	DE Klinika Központ
18	DE42807	-	klinikai izolátum	1	♀	hasmenés	nem	hüvely	2017. dec. 4.	DE Klinika Központ
19	DE43763	-	klinikai izolátum	73	♀	szepszis (bakteriális)	nem	hörgő (mintavétel az intubáció során)	2017. dec. 11.	DE Klinika Központ
20	DE45866	-	klinikai izolátum	64	♂	agyi infarktus	nem	hörgő (mintavétel az intubáció során)	2017. dec. 29.	DE Klinika Központ
21	551/2018	-	klinikai izolátum	81	♂	paralitikus ileusz	nem	széklet	2018. jan. 3.	DE Klinika Központ
22	465/2018	AI0005	klinikai izolátum	41	♀	amenorrhoea	nem	hüvely	2018. jan. 3.	DE Klinika Központ
23	2251/2018	AI0007	klinikai izolátum	17	♂	fekélyes vastagbélgyulladás	nem	széklet	2018. jan. 8.	DE Klinika Központ

## 4.2 Genetikai módszerek

### 4.2.1 DNS izolálás, Multilocus Sequence Typing (MLST)

Az alább ismertetett genetikai fingerprinting és MLST vizsgálatokba a Debreceni Egyetem Klinikai Központjában izolált klinikai élesztőizolátumokat, valamint a kereskedelmi probiotikum izolátumokat vontuk be. A genomi DNS izolálása Hanna és Xiao [243] tanulmánya szerint történt. Izolálást követően a koncentrációt 100 ng/μl-re állítottuk be minden esetben. A DNS-mintákat 1×TE pufferben (10 mM Tris, 0,1 mM EDTA) –20 °C-on tároltuk. A kolónia PCR-hez a DNS-t Lőoke és munkatársai [244] eredményei alapján izoláltuk, és 1×TE-ben tároltuk.

A "Multilocus Sequence Typing" során négy magi gén [*CUP1* (teljes), *HMX1* (teljes), *CCA1* (788 bp fragmentum), *NUP116* (427 bp fragmentum)] és az "Internal Transcribed Spacer" (ITS) régió szekvenálását végeztük el, melyek mindegyike más-más kromoszómán helyezkedett el.

#### Az MLST vizsgálathoz felhasznált primerek listája:

- CCA1f (5'-GTGCTTTGGCACACC-3') [245],
- CCA1r (5'-ATTCTTGATCAGTTCCTGTA-3') [245];
- CYT1f (5'-CATTTTCATTACACTATATCATCTACTA-3') [245],
- CYT1r (5'-CAATTCAGTATGCTCTACTAATA-3') [245];
- HMX1f (5'-GCTTAGTCTAAGGAGGAGCTAT-3') [176],
- HMX1r (5'-TGCTGTTTTTCCTTCCCTATTC-3') [176];
- NUP116f (5'-AAGCAACTGTCACCAACACG-3') [246],
- NUP116r (5'-CTTCCCCATCGTTCTTTGAG-3') [246];
- ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') [247],
- ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') [248].

A PCR reakciók során Pwo polimeráz enzimet (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) alkalmaztunk. PCR protokoll: 94 °C 2 perc, 34× (94 °C 20 mp, 55 °C 50 mp, 68 °C 80 mp), 68 °C 5 percig. Mindegyik reakcióhoz 0,2 mM dNTP-t és 10 pmol primert használtunk, és a reakciók térfogata 50 μl volt. Az amplifikációhoz egy Applied Biosystems 2720 (Foster City, CA, USA) típusú PCR készüléket használtunk. A PCR termékeket 1,2 %-os agaróz gélen futtattuk meg, és az elektroforézist 90 V-on 45 percig végeztük; méretük vizsgálatához UV fényt alkalmaztunk. A PCR termékeket az Illustra GFX PCR DNS és Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) segítségével tisztítottuk, és a PCR-hez használt primerekkel két irányból megszekvenáltuk (Microsynth AG, Ausztria). A „read”-eket a Chromas 2.6.5 (Technelysium Pty. Ltd.) használatával ellenőriztük és szerkesztettük. A teljes ITS1-5.8S rDNS-ITS2 szekvenciát ITSx segítségével nyertük ki a „read”-ekből [249]. A szekvenciák a GenBank adatbázisba kerültek feltöltésre (F2. táblázat). A filogenetikai analízishez a szekvenciákat a MUSCLE használatával illesztettük és MEGA X szofver segítségével

konkatenáltuk [250]. A modellszelekciót és a Maximum Likelihood filogramok generálását szintén a MEGA X szofverrel végeztük 1000 bootstrap ismétléssel [250]. A dendrogramokat az iTOL szofverrel [251] vizualizáltuk. Az egyik heterozigóta élesztőizolátumban a haplotípusokat pJET1.2 vektorba történő klónozással különítettük el a CloneJet (Thermo Fisher Scientific) segítségével, melyet a gyártó ajánlásainak megfelelően használtunk, majd ezt követően szekvenáltuk a haplotípusokat. A szekvencia illesztéseket FigShare-ben (doi: 10.6084/m9.figshare.8114258) helyeztük el.

#### 4.2.2 PCR-fingerprinting

A "Microsatellite-Primed PCR" (MSP-PCR) reakciókhoz 50 ng genomi DNS-t (gDNS) használtunk 12,5 µl térfogatú reakciókhoz [252]. A (GTG)<sub>5</sub> primerrel végzett reakciókhoz a következő PCR programot használtuk: 95 °C 5 perc, 30× (94 °C 30 mp, 45 °C 30 mp, 72 °C 50 mp), 72 °C 5 perc. Az amplifikációhoz 1,5 egység GoTaq DNS-polimerázt használtunk GoTaq Green pufferrel és 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>-dal, 0,2 mM-os dNTP-vel. Mindegyik reakcióhoz 10 pmol primert használtunk. A reakciókat C1000 Touch típusú PCR készülékkel (BioRad, Hercules, CA, USA) végeztük.

Az interdelta fingerprintinghez a delta12 (5'-TCAACAATGGAATCCCAAC-3') és a delta2 (5'-GTGGATTTTTATTCCAACA-3') primereket [253] használtuk. Minden 25 µl-es reakcióhoz 50 ng DNS-t és 0,75 egység GoTaq G2 DNS polimerázt (Promega, Madison, WI, USA) használtunk 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>-dal (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) kiegészített GoTaq Green Pufferrel (Promega). Mindegyik primerből 12,5 pmol-t használtunk, és 0,2 mM dNTP-t [254]. A reakciókat TProfessional típusú PCR készülékkel (Biometra, Göttingen, Németország) végeztük. A PCR protokoll a következő volt: 95 °C 5 perc, 30× (94 °C 50 mp, 55 °C 50 mp, 72 °C 50 mp), 72 °C 5 perc.

A PCR-termékeket (5 µl) 1,2%-os (MSP) vagy 2%-os (interdelta) agaróz gélekre vittük fel, az elektroforézist 110 V-on, 75 percig végeztük 1×Tris-acetát-EDTA (TAE) pufferben. Minden elektroforézishez 1 kb DNS-markert (Thermo Fischer Scientific) használtunk. A sávokat úgy tettük láthatóvá, hogy Gel Red-del (Fremont, CA, USA) festettük az agaróz géleket 20 000× hígításban, majd transzilluminátort használtunk. Azt így kapott képeket a <http://genomes.urv.es/UPGMA/> címen elérhető UPGMA algoritmussal elemeztük a Dice koefficiens alkalmazásával. A dendrogramokat iTOL segítségével vizualizáltuk [251].

#### 4.2.3 Mikroszatellita tipizálás

A mikroszatellita tipizálást az YLR177wf (5'-CTTAAAC AACAGCTCCCAAA-3') és YLR177wr (5'-ATGAATCAGCGCATCAGAAAT-3') primerekkel [255] végeztük az *YLR177w*

mikroszatellita régióban, és a YOR267cf (5'-ATGACTGCAGCAATGAATCG-3') és YOR267cr (5'-TCCTCTGTGCTGTTGACTCG-3') [256] primerekkel a *HRK1* (*YOR267c*) mikroszatellita régióban. A PCR program a következő volt: 98 °C 30 mp, 18× (*YOR267c*) vagy 20× (*YLR177w*) (98 °C 10 mp, 55 °C 20 mp, 72 °C 15 mp), 72 °C 5 perc. Mindegyik 12,5 µl térfogatú reakcióhoz 0,25 egység Phusion polimerázt (Thermo Fischer Scientific), 20 ng gDNS-t, 10 pmol primert és 0,2 mM dNTP-t használtunk. Azért alkalmaztunk rövid programot és nagy pontosságú polimerázt, hogy elkerüljük a polimeráz templáton való megcsúszását és egyéb, a mikroszatellita régiók amplifikációjakor gyakran felmerülő problémákat. A reakciókat C1000 Touch PCR készülékkel hajtottuk végre. A gélelektroforézist GelRed-del festett 3%-os "low electroendosmosis" (LE) TBE agaróz gélen, 110 V-on, 5 órán keresztül végeztük. Minden futtatáshoz 5 µl terméket használtunk. A primerek bekötődési helyeit a *S. 'boulardii'* genomon belül és a várható termékméreteket az NCBI adatbázis Nucleotide BLAST funkciójával határoztuk meg [135]. A mikroszatellit alléleket 20 bp-os markerrel (Sigma Aldrich) és a GelAnalyzer szoftverrel (Lazar & Lazar, <http://www.gelanalyzer.com/>) határoztuk meg a PCR termékek méretének és ezáltal a mikroszatellitában található ismétlések számainak meghatározásához. A mono-, di- és triallélikus izolátumok jelenléte miatt az ismétlésszámokat a POLYSAT 1.7 csomag segítségével R-ben hasonlítottuk össze [257], a ploiditás előzetes feltételezése nélkül. A páronkénti összehasonlításokhoz Bruvo-féle távolságot számoltunk. A „minimum spanning network” hálózatokat egy R-csomag (poppr) segítségével vizualizáltuk [258].

#### 4.2.4 Multiplex PCR

A munka során a probiotikum élesztő izolátumok azonosítására alkalmas multiplex PCR módszert fejlesztettünk ki és használtunk, ami az Eredmények fejezetben részletesen ismertetésre kerül. Röviden: A módszer az interdelta, két mikroszatellita (*YLR177w*, *YOR267c*) és kontrollként az ITS régiót amplifikáló primerpárokat kombinálja egyetlen PCR-reakcióban, ami a probiotikus élesztőkre jellegzetes hosszúságú termékeket és sávmintázatot eredményez gélelektroforézist követően. A módszer alkalmazásakor az általunk publikált protokollt követtük [176]. Kontroll törzsként egy *P. kudriavzevii* törzset (DE22293) használtunk.

## 4.3 Genomikai módszerek

### 4.3.1 Teljesgenom szekvenálás

A genomikai analízishez 6, a géndeléciós kísérletekbe is bevont izolátumot választottunk ki (PY0001, PY0002, 465/2018, 2251/2018, DE6507, DE35762), illetve korábban szekvenált, NCBI SRA-ból letöltött genomokat [4] is felhasználtunk. A könyvtár-előkészítést tagmentálással végezte a Debreceni Egyetem Genomi Medicina és Bioinformatikai Szolgáltató Laboratóriuma a Nextera DNA Flex Library Prep kittel (Illumina, San Diego, CA, USA), a gyártó előírásai szerint. A szekvenálást 150 bp "paired-end" read-ekkel végezték Illumina NextSeq 500 rendszerrel, ~50× lefedettséggel. Továbbá a PY0001 esetében a törzs könyvtárát 400 × lefedettséggel is megszekvenáltattuk egy külön futtatás során. A nyers Illumina readok az NCBI SRA adatbázisba kerültek feltöltésre (BioProject PRJNA813763).

### 4.3.2 Long Read szekvenálás, teljesgenom összeállítás és annotálás a PY0001 izolátumra

A long read szekvenáláshoz a PY0001 izolátum genomi DNS-ét a Quick-DNA™ High Molecular Weight (HMW) MagBead Kittel (Zymo Research, Irvine, CA, USA) izoláltuk a cég utasításai szerint, azzal a különbséggel, hogy a sejtek feltárását nem lizozim, hanem R-Zymolyase (RNáz A-t tartalmazó zimoliáz; Zymo Research, Irvine, CA, USA) enzimmal végeztük. A könyvtárkészítést Ligation Sequencing Kittel (SQK-LSK109; Oxford Nanopore, Oxford, UK) végeztük, majd MinION készülékkel, R9.4.1 Flow Cell-en megszekvenáltuk. A kapott .FAST5 szekvenálási fájlokat felhasználva összeraktuk a genomot az LRSDAY pipeline segítségével [259]. A szekvenálást 550× lefedettséggel végeztük (a *S. cerevisiae* S288C genomját figyelembe véve). A kapott .FAST5 szekvenálási fájlokra a „basecalling”-ot és az adaptorok trimmelését („high accuracy” modell) a cég által biztosított MinKNOW szoftterrel végeztük AMD Ryzen 5 processzorral. A pipeline során a kapott readeket először szűrtük, valamint a lefedettséget 60×-ra csökkentettük, az assembly-t (LRSDAY Canu scriptje alapján) pedig a long readekkel [LRSDAY Racon (2×) és Medaka (2×) scriptek alapján] és a ~400× lefedettségű, Illumina szekvenálásból származó readekkel [LRSDAY Pilon (2×) script alapján] javítottuk (az ún. „polishing” eljárással). Az LRSDAY pipeline-nal nem csak összeillesztettük a genomot, hanem annotáltuk is az egyes genomalkotókat (gének, centromerek, transzpozonok, telomerek), ezzel az izolátum génkészletét és Ty-transzpozon-típusait is felderítettük. A .GFF3 annotációs fájlt FigShare-en helyeztük el. Az összeillesztett kromoszómák páronkénti illesztését a *S. cerevisiae* S288c referencia genommal a MAFFT 7 szoftverrel végeztük [260]. Mivel a genomösszeállítás a mitokondriális DNS-t nem illesztette teljesen össze, a PY0001 magi genomját Peter és munkatársai [4] CIM nevű probiotikus élesztőgenomjának mitokondriális szekvenciájával

egészítettük ki, mikor referenciaként használtuk térképezésre. A genomösszeállítás az NCBI SRA adatbázisba került feltöltésre (BioProject PRJNA813746).

#### 4.3.3 Térképezés a referencia genomokra

Az Illumina szekvenálásból, valamint az SRA-ból származó .FASTQ fájlokat fastp segítségével (<https://github.com/OpenGene/fastp>) (Chen et al., 2018) "trimmeltük" és szűrtük, majd a *S. cerevisiae* S288C [*Saccharomyces* Genome Database (SGD), [yeastgenome.org](http://yeastgenome.org)] referencia genomra, illetve más *Saccharomyces* fajok genomjára térképeztünk [261–263] a Kim és munkatársai [264] eredményei alapján elvégzett módosításokat követően. A *S. 'boulardii'* élesztő izolátumaink nem-hibrid természetének megállapítása után egy újabb térképezési kört alkalmaztunk az általunk készített PY0001 referenciára. A térképezést a BWA 0.7.17 (<http://bio-bwa.sourceforge.net/>) [265] segítségével végeztük. A rendezett (azaz szortolt) BAM-fájlokat a Samtools 1.7 (<http://htslib.org/>) [266] segítségével készítettük, a duplikátum "readek"-et pedig a Picard-tools 2.23.8 Mark Duplicates funkciója (<http://broadinstitute.github.io/picard/>) segítségével jelöltük meg.

#### 4.3.4 Lefedettségi elemzés

A lefedettségi elemzéshez a BEDTools 2.30.0-t (<https://github.com/arq5x/bedtools2>) [267] használtuk. Mindkét térképezés esetén a kromoszómák egyes régiói lefedettségének kiszámításához 10 000 bázisos csúszóablakon belül (5000 bázisonként csúsztatva) számítottunk medián lefedettséget, valamint a teljes kromoszóma medián lefedettségét is megállapítottuk. Az így generált adatokból plotokat (a ploidiát figyelembe véve; lásd lent) készítettünk a potenciális szegmentális duplikációk, illetve deléciók és aneuploidiák meghatározásához.

#### 4.3.5 Variáns meghatározás

A kapott BAM fájlokat felhasználva, az INDEL-ek körüli újraillesztés, összevont variánsidentifikálás („joint calling”) és szűrés az egyes törzsekre (PY0001, PY0002, 465/2018, 2251/2018, DE6507, DE35762) a GATK 4.1.9.0 (<https://software.broadinstitute.org/gatk/>) segítségével történt [268,269]. Ennek során azokat a régiókat, melyek a PY0001-ben egyszerű "repeat"-ként, centromer régióként, telomer régióként vagy hosszú végálló ismétlődésként kerültek meghatározásra, kizártuk az elemzésből az annotálás során kapott .GFF3 fájl alapján, melyből ezen régiókat egy .BED fájlba mentettük és a Haplotype Caller számára kihagyandónak jelöltünk. Először a genom .VCF fájlokat (.g.VCF) generáltuk (HaplotypeCaller parancs), ezután "joint calling"-ot alkalmaztunk (CombineGVCFs és GenotypeGVCF parancsokkal), majd a kapott VCF fájlokban csak az SNP-eket vagy az INDEL-eket választottuk ki (SelectVariants parancs). Az SNP-eket Fay és

munkatársai [270] által használt paraméterek szerint szűrtük (VariantFiltration parancs):  $QD < 5,0$ ;  $QUAL < 30,0$ ;  $SOR > 3,0$ ;  $FS > 60,0$ ;  $MQ < 40,0$ ;  $MQRankSum < -12,5$ ;  $ReadPosRankSum < -8,0$ . Az INDEL-eket a  $QD < 5,0$ ;  $QUAL < 30,0$ ;  $FS > 60,0$ ;  $ReadPosRankSum < -20,0$ . Ezután az INDEL-eket balra igazítottuk (LeftAlignIndels parancs). A végső VCF-fájlokhoz az INDEL-eket és SNP-eket egyesítettük (MergeVcfs Picard Tools-ban) és szűrtük, a nem variáns helyeket és szűrők által kiszűrt pozíciókat pedig eltávolítottuk (SelectVariants parancs). Az így identifikált variáns helyek figyelembe vételével a GATK segítségével „Base Quality Score Recalibration”-t (BQSR) végeztünk (BaseRecalibrator és ApplyBQSR parancsokkal). A rekalibrált .BAM fájlkon a fentiek szerint újra elvégeztük a variáns identifikálás lépéseit. A kombinált gVCF fájlkat FigShare-en helyeztük el (<https://doi.org/10.6084/m9.figshare.19322963>). A „joint calling”-ot a hat szekvenált törzsünkre végeztük el, valamint egy külön „joint calling”-ot végeztünk egy probiotikum és egy kulcsoport élesztőgenom bevonásával is, a 4.3.6. fejezetben leírtak szerint.

#### 4.3.6 Variánsok hatásának meghatározása proteinkodoló génekre

Az identifikált variánsok hatását a proteinkodoló génekre a SNPEff 5.1 szoftverrel (<http://pcingola.github.io/SnpEff/>) határoztuk meg, mely meghatározza, hogy egy-egy variáns okoz-e aminosavcserét, korai terminációt, illetve egyéb változásokat a gén által kódolt fehérjében [271]. Ehhez az LRSDAY pipeline .GFF3 fájlja és a .FASTA referenciagenom alapján a SNPEff-ben adatbázist építettünk a szoftver utasításai szerint, és ezzel annotáltuk a .VCF fájlkat. A nagy és közepes hatású variáns pozíciókat .CSV fájlba exportáltuk (a heterozigótasági adatokkal együtt) és ezek alapján összehasonlítottuk az izolátumokat. Az annotált .VCF fájlkat Figshare-be töltöttük fel (<https://doi.org/10.6084/m9.figshare.19322963>). Ezen felül a *HMX1* génnel genetikai, valamint fizikai interakcióban lévő géneket is kigyűjtöttük a SGD-ből (letöltés dátuma: 2022.03.29.) [272,273], hogy az adatokat a hem oxigenáz-1-el összefüggésben tudjuk vizsgálni. Összesen négy fizikai interakcióban és 88 genetikai interakcióban résztvevő gént listáztunk ki 12 transzkripciós regulátorral együtt. Megvizsgáltuk, hogy a *HMX1*-el kölcsönhatásba lépő géneket szignifikánsan gyakrabban vagy ritkábban érintenek-e mutációk, mint más géneket. Ehhez Fisher-egzakt tesztet alkalmaztunk. A közepes vagy nagy hatású mutációk által érintett gének potenciális feldúsulásának felmérésére GO Term analízist végeztünk a *Saccharomyces* Genome Database-en (Analízis elvégzése: 2022.03.05.) [56,57].

Azokat a variáns helyeket, melyekben a PY0001 Illumina olvasatainak térképezése saját referencia genomjára homozigóta eltérést mutatott, genomösszeállítási hibának vettük és töröltük az adatsorból. A heterozigóta eltéréseket valós eltérésként kezeltük. Az érintett génekhez manuálisan gén ontológia címszavakat (GO Term) rendeltünk, illetve funkcióikat is kigyűjtöttük a *Saccharomyces* Genome Database-ből.

#### 4.3.7 Filogenomikai hálózat építése, Maximum Likelihood filogénia

Annak érdekében, hogy megerősítsük a multiplex PCR alapján kapott eredményeket és az izolátumok közeli rokonságát, filogenomikai analízist végeztünk. Kontroll *S. 'boulardii'* törzsként a CIM törzset használtuk, kulcsoportként pedig az ADD törzset (bor/Y-prime amplifikációs csoport) [4]. A közös genotipizálást és a szűrést a hat izolátumra és az előbb említett két törzsre végeztük el, hogy megkapjuk a szűrt .VCF fájlokat. Az SNP VCF fájlok alapján .phylip genotípus mátrixokat hoztunk létre vcf2phylip (<https://github.com/edgardomortiz/vcf2phylip>) [274] segítségével, melyek tartalmazták a heterozigóta IUPAC kódokat. Ezeket az SNP mátrixokat a MEGA X szoftverben .nexus 3 formátumba konvertáltuk, majd a SplitsTree4 V4.17.0-ben (<https://software-ab.informatik.uni-tuebingen.de/download/splitstree4/welcome.html>) [275] használtuk arra, hogy Neighbor Net típusú genomhálózatokat készítsünk korrekció nélküli P távolsággal a heterozigóta pozíciók kiértékelésekor, ezen pozíciók átlagolásával. Az IQTree2 szoftver segítségével [276] a teljes SNP mátrixra Maximum Likelihood filogenetikai elemzést végeztünk az alábbi módon: *S. 'boulardii'* kontrollként a CIM nevű törzs genomját használtuk, kulcsoportként pedig a Wine/European: Y-prime-amplification alkládba tartozó ADD nevű törzs genomját Peter és mtsai. (2018) nyomán, a szekvenálási fájlokat az SRA-ból töltöttük le. A mátrix ezeket a genomokat is tartalmazta. A mátrix-szal a modellkeresést és automatikus modellválasztást [a ModelFinder alapján [277], a mátrix jellege miatt „ascertainment bias correction” (+ASC) opcióval] követően 1000 ultagyors bootstrap megközelítéssel [278] végeztük el a Maximum Likelihood elemzést, a kapott .contree törzsfát pedig az iTOL-on vizualizáltuk [251].

#### 4.3.8 Allél arányok meghatározása és kromoszómaszám analízis

Az egyes törzsekben előforduló variánsok pozícióit és „allele depth” (AD) lefedettségi értékeit .csv fájlokba exportáltuk a SAMtools/BCFtools 1.10.2 (<http://samtools.sourceforge.net/mpileup.shtml>) „query” parancsának segítségével, majd allél frekvencia plotokat készítettünk belőlük. Az allél frekvenciák alapján határoztuk meg a kromoszómák ploidiait [132] azt feltételezve, hogy az allélok eloszlása diploidok esetében 1:0 vagy 1:1, triploidok esetében 1:0, 1:2 vagy 2:1, tetraploidok esetében 1:0 1:3, 1:1 vagy 3:1, és így tovább. Az allél arányok alapján megállapított ploidiaikat és a kromoszóma kópiaszámváltozások (CCNV) eredményeit összevetettük a lefedettségi ábrákkal és arányokkal, hogy kiderítsük, mutatnak-e a törzsek eltérést a diploid euploid genomtól. Az allél adatokat arra is felhasználtuk, hogy meghatározzuk az allélarány változásokat az izolátumokban a PY0001-hez képest. Ezt követően a GATK Haplotype Caller által meghatározott genotípus értékeket exportáltuk a .VCF fájlokból BCFTools segítségével .csv fájlokba, és ezek alapján kerestük meg a legjelentősebb allél arány változásokat [pl. heterozigótaság-vesztés

(LOH), vagy nyerés (GOH)] az egyes kromoszómák esetében. Jelentősnek azokat a változásokat tekintettük, melyek sorban 10 egymást követő variáns helyet érintettek. 20-nál több, egymás után következő variáns hely esetén 1 pozícióban azonban megengedtünk az LOH/GOH eseménytől eltérő allélt. Ezeket a jelentős allélarány-változásokat vizualizáltuk.

#### 4.3.9 ORF, mitokondriális DNS, plazmid és transzpozon kópiaszám analízis

A BEDTools segítségével kiszámoltuk mindegyik PY0001 ORF medián lefedettségét. Minden ORFnél kiszámoltuk az adott ORF és a tőle "upstream" és "downstream" elhelyezkedő 20 ORF (összesen 41 ORF) medián lefedettségének mediánját (kromoszómák első és utolsó 20 ORF-ének esetében az adott kromoszóma első és utolsó 41 génjének medián lefedettségének mediánját használtuk). Ezután kiszámítottuk a kérdéses ORF és a 41 ORF mediánjának arányát, és a kapott arányszámot használtuk a haploid genomra korrigált génkópiaszám (CNV) becsléséhez. Ezt az arányszámot a következők szerint kerekítettük: az 1,5 CNV értékeket 2-nek vettük, a 0,5 és 1,0 közötti értékeket pedig 1 kópiának számoltuk (érdemes megjegyezni, hogy a tört génkópiaszámok nem irreálisak abban az esetben, ha a CNV értékek haploid genomra vannak korrigálva). Ezután térképezést végeztünk a teljes *S. cerevisiae* pangenom ORF .FASTA gyűjtemény [4] referenciaként való felhasználásával, hogy meghatározzuk a haploid genomra vonatkoztatott mitokondrium, Ty transzpozon, rDNS és 2 $\mu$  plazmid kópiaszámokat: A releváns gének medián lefedettségének kiszámításához a BEDTools-t használtuk. A mitokondriális és plazmid gének kópiaszámának meghatározásához ezeknek a lefedettségeknek a mediánját számoltuk ki. Ezeknek a genomi elemeknek a lefedettségét elosztottuk a kromoszómák medián lefedettségének mediánjával. Ezt a hányadost vettük a haploid genomra vonatkoztatott kópiaszámnak. A normál térképezéstől eltérően az olyan readeket, amiknek a párja nem térképeződött megtartottuk a BAM fájlokban.

## 4.4 Fenotipizálási kísérletek

### 4.4.1 Telepmorfológia, invazivitás és öregedés

A fenotipizálási, patogenitási kísérletekbe valamennyi *S. 'boulardii'* izolátumunkat bevontuk (4 kereskedelmi izolátum, 10 klinikai izolátum, melyből 7 a multiplex PCR vizsgálatokban bemutatott debreceni izolátum, 3 pedig későbbiekben bevont, szegedi klinikai izolátum. A telepmorfológia vizsgálatát YPD (VWR, 2% glükóz, 2% pepton, 1% élesztőkivonat), SD ["synthetic dextrose"; 2% glükóz; 0,17% élesztő nitrogén bázis (YNB; aminosavak és ammónium-szulfát nélkül) (Alpha Aesar-ThermoFischer, Kandel, Németország); 0,5% ammónium-szulfát], SLAD ("synthetic low-ammonium (50  $\mu$ M) dextrose", összetétele megegyezik az SD táptalajjal az ammónium-szulfát koncentrációt

kivéve), és SLG ("synthetic low-glucose" (0.1%), összetétele megegyezik az SD táptalajjal a glükóz koncentrációt kivéve) agar táptalajokon végeztük (mindegyik táptalaj 2% agart tartalmazott). A kísérletekhez egy éjszakán keresztül rázatott tenyészeteket használtunk, melyek optikai denzitását ( $OD_{600}$ ) 0,1-re állítottuk, majd 10  $\mu$ l tenyészetet az adott táptalajra cseppentettünk. Jól szellőző, 90 mm átmérőjű és 14 mm magas műanyag Petri-csészéket (VWR) használtunk a kísérletekhez. Az izolátumokat ezt követően 10 napig, 37 °C-on inkubáltuk (agar felülettel lefelé), majd a telepek fenotípusát vizuálisan értékeltük ki. Az invazivitás vizsgálatához a csészék felületét csapvízzel lemostuk, hogy láthatóvá váljanak az agar belsejébe belenőtt sejtek. A telepek öregedésének vizsgálatához, az izolátumokat a fentebb leírt módon GlyYP (2% glicerin, 1% élesztőkivonat, 2% pepton, 2% agar) + 0,1% glükózt tartalmazó táptalajra oltottuk. A tenyészeteket 37 °C-on, 30 napig inkubáltuk, majd vizuálisan kiértékeljük a telepek morfológiáját. Mindegyik kísérletet háromszor ismételtük meg.

#### 4.4.2 "Killer" aktivitás és érzékenység

A "killer" toxin termelést és érzékenység felméréséhez kontrollként a K1 (NCYC 232) és K2 (NCYC 738) toxintermelő, és egy toxinra érzékeny borélesztőtörzset (NCYC 1006) [279] használtunk fel. A tesztekhez a *S. 'boulardii'* izolátumok és "killer" kontroll törzsek folyékony tenyészetéből ( $OD_{600} = 0,1$ ) 20  $\mu$ l-t cseppentettünk YPD táptalajra (+ 0,003 g/l metilénkék, 4,5 pH citrát-foszfát pufferrel beállítva). A csészéket 2 napig, 25 °C-on inkubáltuk, majd a killer toxinra érzékeny törzs tenyészetéből 500  $\mu$ l-t (sejtsűrűség: 1,0 McFarland érték) szórófej segítségével eloszlattunk. Ezt követően a csészéket további 2 napig 25 °C-on inkubáltuk. A kísérletet három ismétlésben végeztük. "Killer" pozitív aktivitást akkor állapítottunk meg amikor a 20  $\mu$ l-es cseppek körül a szaporodás gátlását jelentő zóna alakult ki, aminek a szélén halott sejtekből kialakult sötétkék zóna jelent meg.

#### 4.4.3 "Petite" teszt

A "petite" telepek gyakoriságának vizsgálatához a *S. 'boulardii'* izolátumokat folyékony YPD-ben egy éjszakán keresztül tenyésztettük elő 25 °C-on. Thoma kamrás számolással beállítottuk a sejtszámot, majd körülbelül 1000 sejtet szélesztettünk ki mindegyik GlyYP + 0,1% glükóz táptalajra. Jól szellőző, 90 mm átmérőjű és 14 mm magasságú műanyag Petri-csészéket használtunk. A csészéket 10 napig inkubáltuk 30 °C-on (agar felülettel lefelé). A feltételezett "petite" mutánsokat YPD táptalajra oltottuk át, majd előtenyésztést követően (folyékony YPD, 25 °C), glükóz mentes GlyYP táptalajon tenyésztettük őket. A kísérletet három ismétlésben végeztük. A glükóz mentes táptalajon életképtelen szubklónok voltak a "petite" mutánsok.

#### 4.4.4 MAT lókusztipizálás és spórázási teszt

A III. kromoszómán található "mating type locus"-t a (5'-AGTCACATCAAGATCGTTTATG-3'), (5'-GCACGGAATATGGGACTACTTCG-3'), és (5'-ACTCCACTTCAAGTAAGAGTTTG-3') primerekkel amplifikáltuk [280]. Mindegyik reakcióhoz (12,5 µl végtérfogat) 0,25 egység GoTaq G2 polimerázt, 20 ng gDNS-t, 10 pmol primert és 0,2 mM dNTP-t használtunk. A reakciókat C1000 Touch típusú PCR gépben hajtottuk végre. A gélelektroforézist 2%-os, 20 000× hígítású GelRed-del festett TBE LE agaróz gélben végeztük 110 V-on 30 percig, majd UV transzilluminátorral készítettünk gélfotókat, melyeket kiértékelünk. A sávok alapján megállapítottuk az izolátumok párosodási típusát, illetve a párosodási típus heterozigotáságát. A sporulációs képesség vizsgálatához, az izolátumokat egy éjszakán keresztül YPD agar táptalajon tenyésztettük, majd kálium-acetátos (KAc) spóráztató táptalajra (0,05% glükóz, 1% kálium-acetát, 0,1% élesztőkivonat, 2% agar) oltottuk le őket. A spórázási százalékot 5 napos, szobahőmérsékleten, és 37 °C-on végzett inkubáció után fáziskontraszt mikroszkóppal (400× nagyítás) állapítottuk meg. Megszámoltuk, hogy 100 sejtből hány spórázott, és az így kapott számot vettük spórázási százaléknak. A spórázási kísérletet törzsenként háromszor végeztük el.

#### 4.4.5 Szaporodás magas hőmérsékleten

A "spot plate" módszerrel teszteltük az izolátumok telepeinek növekedési képességét magas (37–42 °C) hőmérsékleten. Az izolátumokat 30 °C-on tenyésztettük elő YPD táptalajon, majd vízben 0,5 McFarland sejtszámot állítottunk be, és 5×5 µl-es cseppek formájában inokuláltuk a tenyészeteket, 10-szeres hígítási sort alkalmazva. Tehát a cseppek 50 000, 5000, 500, 50 és 5 sejtet tartalmaztak. A csészéket különböző hőmérsékleteken inkubáltuk 3 napig (37 °C, 39 °C, 42 °C). A 39 °C és 42 °C-os inkubációt követően kapott eredményeket a telepek 37 °C-on megfigyelt szaporodáshoz hasonlítottuk minden esetben, és a következők szerint értékeltük: –: nincs; +–: nagyon gyenge; +: gyenge; ++: normális; +++ erős kolónianövekedés.

#### 4.4.6 Pseudohifa növekedés és flokkuláció

A telepmorfológiai és invazivitási teszteknel (lásd fentebb) kapott telepekből 10 napos, 37 °C-on végzett inkubálást követően mintát vettünk és megvizsgáltuk a pseudohifa növekedést. A mintákat 400-szoros nagyításban vizsgáltuk fénymikroszkóp segítségével, és feljegyeztük, ha pseudohifa növekedést tapasztaltunk. A flokkuláció vizsgálatához az izolátumokat egy éjszakán át, 37 °C-on, folyékony YPD táptalajban, rázás nélkül tenyésztettük, hogy megfigyeljük a flokkulációt a tápközegben. Az epitélium transzmigrációs kísérletek során (lásd később) az élesztők morfológiáját

DMEM (+10% szarvasmarha magzat szérum: FBS, nem amerikai eredetű, sterilre szűrt, sejtenyésztésre alkalmas, Sigma-Aldrich) táptalajban is rögzítettük. A kísérleteket három ismétlésben végeztük.

#### 4.4.7 Extracelluláris proteáz aktivitás, foszfolipáz aktivitás, hemolitikus aktivitás

A kísérletek előtt az izolátumokat és törzseket élesztő pepton dextróz táptalajon (YPD; 1% élesztőkivonat, 2% mikológiai pepton, 2% glükóz, 2% agar, pH 5,6) 2 napig szaporítottuk. A törzseket folyékony YPD tápközegben egy éjszakán át, 30 °C-on előtenyésztettük, majd foszfáttal pufferolt sóoldatban (PBS) háromszor mostuk. A táptalajokat 5 µl,  $5 \times 10^4$  sejtet (proteáz szekréció és hemolízis), illetve 5 µl,  $2,5 \times 10^6$  sejtet (foszfolipáz szekréció) tartalmazó sejtszuszpenzióval oltottuk le. A kísérleteket három ismétlésben végeztük. A gombák hemolitikus aktivitását [281] véres Sabouraud Dextrose Agar (SDA; 4% glükóz, 1% pepton, 7,5% birkavér, 1,5% agar) táptalajon követtük 37 °C-on, 5% CO<sub>2</sub> mellett, 3 napig. A kísérlet során biztosítottuk a csészék jó szellőzését az alkohol mediált hemolízis elkerülése érdekében [239]. A hemolitikus zónákat 1 és 2 (α-hemolízis), valamint 2 és 3 nap (β-hemolízis) inkubáció után mértük le tolmérővel. A hemolízis indexeket (HI) úgy számítottuk ki, hogy a zóna méretét elosztottuk a telep átmérőjével (HI = zónaméret/telepátmérő; HI ≥ 1). A proteáz szekréciót szarvasmarha szérum albumin táptalajon [BSA; 0,02% MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O, 0,25% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5% NaCl, 0,1% élesztőkivonat, 2% glükóz, 0,25% szarvasmarha szérum albumin (Sigma-Aldrich), 2% agar] követtük 37 °C-on, 2 napig. A foszfolipáz szekréciót tojássárgás táptalajon (EY; 4% glükóz, 1% pepton, 1,5% agar, 5,85% NaCl, 0,0555% CaCl<sub>2</sub>, 10% v/v tojássárgája emulzió) vizsgáltuk 37 °C-on, 2 napig. A tojássárgája emulzió 2:1 arányban fiziológiás sóoldatot és tojássárgáját tartalmazott [189]. A mérések nyers adatait FigShare-be (doi:10.6084/m9.figshare.15145020) töltöttük fel.

#### 4.4.8 Antifungális szerekkel szembeni érzékenység

A minimális gátló koncentrációt (MIC) három antifungális szer esetében határoztuk meg az Orvosi Mikrobiológiai Intézet segítségével: flukonazol (Molecula Limited, Newcastle Upon Tyne, UK), amfotericin B (Duchefa Biochemie, Haarlem, The Netherlands), és kaszopofungin (Molcan, Toronto, Canada). Az izolátumokat bikarbonát mentes RPMI 1640-ben (pH 7,0; Roswell Park Memorial Institute medium, Sigma-Aldrich), 96-lyukú mikrotiter lemezekben tenyésztettük a kísérlet során, illetve hígítási sort alkalmaztunk a különböző antimikotikum koncentrációk hatásának vizsgálatához. A kísérletet háromszor ismételtük meg. A sejtkoncentrációk, kontroll törzsek és a 24 óra elteltével történő MIC értékek meghatározása a mikrodilúciós antifungális érzékenységi vizsgálat referenciamódszere alapján történt [282].

## 4.5 Humán epitélium modell interakciók vizsgálata

### 4.5.1 *S. 'boulardii'* izolátumok adhéziója Caco-2 humán gasztrointesztinális epitélium modellen

A Caco-2 (vastagbél adenokarcinóma) sejtvonal a "European Collection of Cell Cultures"-től (ECACC, No. 86010202) származott. A sejteket (20–30. passzázs) magas glükóz tartalmú (4,5 g/l) "Dulbecco's Modified Eagle's Media" (DMEM) tápközegben tenyésztették a Debreceni Egyetem Gyógyszertechnológiai Tanszékén, amelyet 3,7 g/l NaHCO<sub>3</sub>-al, 10% hővel inaktivált FBS-sel, (nem USA eredetű, sejttenyésztésre alkalmas, Sigma Aldrich), 1% (v/v) nem esszenciális aminosav oldattal (Lonza, Basel, Svájc), 100 IU/ml penicillin és 100 µg/ml streptomycin keverékkel (Lonza) egészítették ki (sejttenyésztő tápközeg), az inkubálás pedig 37 °C-on, párasított inkubátorban, 5% CO<sub>2</sub> mellett történt. A glutamint GlutaMax™-al (Thermo Fisher) biztosítottuk. Az adhéziós vizsgálatokhoz 1×10<sup>5</sup> Caco-2 sejtet oltottunk a sejttenyésztő táptalajba patkányfarokból származó kollagén I-el előkezelte (egy éjszakán át, 4 °C-os inkubálás; Gibco-Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) üveg fedőlemezekre, 24 lyukú sejttenyésztő lemezekbe, és 2–3 napig inkubáltuk [283] addig, amíg a fedőlemezeken egy folyamatos sejtréteg alakult ki. A sejteket 1×10<sup>5</sup> élesztősejttel (amik szérumentes sejttenyésztő tápközegben voltak szuszpendálva) fertőztük meg három ismétlésben, majd 1 órán át inkubáltuk 37 °C-on, 5% CO<sub>2</sub> mellett, majd a meg nem tapadt sejteket háromszor 1 ml PBS-sel lemostuk. A fedőlemezeken lévő sejteket ezután 4%-os paraformaldehiddel fixáltuk, és "calcofluor white" festékkel festettük. A megfestett fedőlemezeket Olympus BD-40 mikroszkóppal vizsgáltuk meg, amely 40× fáziskontraszt és 40× fluoreszcens objektívvel, valamint látható fényű megvilágítással, fáziskontraszttal, és fluoreszcens megvilágítással volt felszerelve. Mindegyik ismétlésnél három látómezőt vizsgáltunk, kiszámítottuk a látómező területét, és ezt követően kiszámítottuk a letapadt sejtek számát 1 mm<sup>2</sup>-re vonatkoztatva. Pozitív kontrollként a *Candida albicans* SC5314 típusörzset használtuk, amelyről ismert volt, hogy tapad a Caco-2 epitélium sejtmodellhez [283]. A kísérletekből származó összes nyers adatot FigShare-be (doi:10.6084/m9.figshare.15145020) töltöttük fel.

### 4.5.2 Caco-2 humán epitélium modell károsítás vizsgálatok

Az izolátumok bélepitélium károsítási képességének felméréséhez 96 üregű mikrolemezeket használtunk, melyekbe üregenként 10<sup>4</sup> Caco-2 hámsejtet oltottunk, és az élesztőkkel való fertőzés előtt 7 napig inkubáltuk a sejteket a fentebb leírt DMEM tápközegben [284]. Mindegyik lemezen három csoportot alakítottunk ki: 18 üregben csak Caco-2 sejtek voltak, 18 üregben Caco-2-sejteket fertőztünk élesztőkkel, 18 üregbe pedig csak élesztősejteket oltottunk le. A fertőzés során 1 × 10<sup>5</sup> sejt/ml *S. 'boulardii'* sejtuszpenzióval oltottuk le a Caco-2 sejteket, és 24 órán keresztül,

FBS mentes sejttenyésztő tápközegben inkubáltuk őket együtt, 37 °C-on, 5% CO<sub>2</sub> mellett (párásított atmoszféra). Az élesztőkkel nem fertőzött Caco-2 sejtek tápközegét a többi sejt fertőzésekor frissítettük. 24 órás inkubációt követően mindegyik cellát 1 mg/ml amfotericin B-vel kezeltünk 1 órán keresztül. Ezt követően az amfotericin B-t eltávolítottuk, a sejteket mostuk, és 0,1 ml, 0,5 mg/ml koncentrációjú 2-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-3,5-difenil-2H-tetrazólium-bromid (PBS-ben oldott MTT só) oldattal egészítettük ki mindegyik üreget. A lemezeket 3 órán át 37 °C-on inkubáltuk, majd a festéket eltávolítottuk, és mindegyik lyukba 0,1 ml izopropanol:1 M hidroklorid (25:1) elegyet adtunk, hogy a sejtek feloldódjanak. Az üregek abszorbanciáját 570 nm-en és 690 nm-en mértük. Minden mérést Multiskan Go (Thermo Fisher) mikroplate olvasóval végeztünk. Az összes adatkészlet esetében az A570–A690 kivonást végeztük el, majd az élesztővel fertőzött üregek átlagát is kivontuk a fertőzött Caco-2 sejteket tartalmazó üregek értékéből. A fertőzött – és az előbb leírtak alapján korrigált – Caco-2 sejteket tartalmazó üregekben a sejtek életképességét a nem fertőzött Caco-2 sejtek átlagos abszorbancia értékeinek százalékában fejeztük ki, amelyeket sejttenyésztő tápközegben 24 órán keresztül inkubáltunk. Patogén pozitív kontrollként a *C. albicans* SC5314 típus törzset használtuk. A kísérletet három ismétlésben végeztük.

#### 4.5.3 *S. 'boulardii'* izolátumok átjutásának vizsgálata Caco-2 humán epitélium modellen

Annak felmérésére, hogy a probiotikus élesztőgombák képesek-e átjutni a bélepitéliumon *in vitro* körülmények között, "Transwell (Corning, NY, USA) cell culture" inzertet használtunk Pérez-Torrado és munkatársai [191] munkája alapján. Ahhoz, hogy polarizált egyrétegű sejtréteget kapjunk,  $6 \times 10^4$  azonos passzázs számú Caco-2 sejtet oltottunk le a "Transwell cell culture" inzertekbe (polikarbonát membrán; Corning Incorporated, Corning, NY, USA), amiken a pórusok mérete 8  $\mu\text{m}$ , a pórusok sűrűsége  $1 \times 10^5$  pórus/cm<sup>2</sup>, és amik területe 0,33 cm<sup>2</sup> volt. Az inzerteket 24 üregű lemezekbe helyeztük. Az apikális kompartment térfogatát minden esetben 200  $\mu\text{l}$ -re, a bazolaterálisat 1250  $\mu\text{L}$ -re állítottuk be. A Caco-2 monoréteget 14–21 naposan használtuk a kísérletekhez, amikor a transzepteliális elektromos ellenállás (TEER) elérte a 450  $\Omega\text{cm}^2$ -t. A fertőzés előtt az élesztő törzseket egy éjszakán át 30 °C-on YPD-ben tenyésztettük, majd PBS-sel mostuk. A törzseket ezt követően sejttenyésztő tápközegben szuszendáltuk, a sejtszámot  $1 \times 10^6$  sejt/ml-re állítottuk, majd az apikális rekeszt feltöltöttük az élesztőket tartalmazó sejtsuszpenzióval, és 37 °C-on párásított helyiségben inkubáltuk, 5% CO<sub>2</sub> mellett. Pozitív kontrollként a *C. albicans* SC5314 törzset használtuk [191]. A kísérlet során vizsgáltuk azt is, hogy az élesztősejtek képesek-e átjutni a Transwell inzerten, ha az nem volt beoltva Caco-2 sejtekkel. A táptalajt az apikális és a bazolaterális kompartmentben naponta cseréltük anélkül, hogy megzavartuk volna az élesztőréteget. Az alsó részből származó tápközeg teljes térfogatát  $10\,000 \times \text{g}$ -vel centrifugáltuk, és ddH<sub>2</sub>O-val hígítottuk. Ezt követően a mintákat hemocitóméterben vizsgáltuk, és YPD agar táptalajon, 30 °C-on inkubáltuk 3

napig. Telepszámolást követően meghatároztuk az életképes sejtek mennyiségét (CFU). Minden törzsnél három párhuzamos üreget mértünk. A kísérletet az inokulálást követő 144. óráig végeztük, amikor a Caco-2 sejtréteg elkezdtek tönkremenni. Az élesztő törzsek biofilm képző képességét az apikális kompartmentben vizuálisan ellenőriztük a friss tápközeg minden napi adagolásakor (könnyen szuszpendálódnak-e) binokuláris mikroszkóppal (20× nagyítás, látható fény), valamint egy 2 µl-es mintát 400× nagyítással, és látható fényel vizsgáltunk, a pszeudohifa morfológia vizsgálatához.

## 4.6 Immunológiai vizsgálatok

### 4.6.1 Humán primer sejtek izolálása és differenciálása

A Debreceni Regionális Vérellátó Központban levett perifériás vérminták mononukleáris sejteit (PBMC) Ficoll–Paque (GE Healthcare, Uppsala, Svédország) sűrűséggradiens centrifugálással izolálták a Debreceni Egyetem Immunológiai Intézetében egészséges donorok heparinizált, leukocitadúsított ún. centrifugálási határretegeiből („buffy coat”). Az izolálás az Országos Vérellátó Szolgálat igazgatója, valamint a Debreceni Egyetem Általános Orvostudományi Kar Regionális és Intézményetikai Bizottsága (Debrecen, Magyarország) írásbeli jóváhagyásával történt. A monocitákat a PBMC-kből tisztították pozitív szelekcióval anti-CD14-hez konjugált mikrogyöngyökkel (Miltenyi Biotec, Bergish Gladbach, Németország), a gyártó utasításai szerint. Ezután a dendritikus sejtek (DC) differenciálódásához frissen izolált monocitákat oltottunk le 24 lyukú sejtenyésztő lemezekre  $1 \times 10^6$  sejt/ml koncentrációban, RPMI 1640 tápközegbe (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Egyesült Államok), amit 10% hővel inaktivált FBS-sel (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, Egyesült Államok), 2 mM L-glutaminnal, 100 U/ml penicillinnel, 100 mg/ml sztreptomocinnel (Sigma-Aldrich), 80 ng/ml granulocita-makrofág kolónia stimuláló faktorról (GM-CSF; Gentaur Molecular Products, London, Egyesült Királyság) és 50 ng/ml interleukin-4-el (IL-4; PeproTech, Brüsszel, Belgium) egészítettük ki. A differenciáltatást 5 napig végeztük a DE Immunológiai Intézetében. A 2. napon azonos mennyiségű GM-CSF-et és IL-4-et adtunk a sejtenyészetekhez. A monocita eredetű DC-eket (moDC) 5 naposan használtuk a kísérletekhez, amikor már a sejtek több mint 90%-a érett DC fenotípust mutatott (DC-SIGN/CD209+, CD14-). A donorok allogén CD3+ pan-T sejteit PBMC-ből izoláltuk anti-CD3 mikrogyöngyökkel (Miltenyi Biotec) a gyártó utasításai szerint, és a moDC-T sejt kokultúrák kísérletekhez használtuk fel az alább leírtak szerint. Minden sejtet 37 °C-on inkubáltunk 5% CO<sub>2</sub>-t tartalmazó párasított atmoszférában. Az immunológiai vizsgálatokhoz tartozó mérések nyers adatait FigShare-be (doi:10.6084/m9.figshare.15145020) töltöttük fel.

#### 4.6.2 *S. 'boulardii* izolátumokkal együttinkubált monocita eredetű dentritikus sejtek (moDC) fagocitózis vizsgálata, valamint fenotípusos és funkcionális elemzése

Az élesztősejteket a kísérletek előtt egy éjszakán át folyékony YPD-ben tenyésztettük 30 °C-on, 140 rpm fordulatszámon. A sejteket háromszor mostuk PBS-sel, majd PBS-ben szuszpendáltuk, és  $1 \times 10^8$  sejt/ml-t 1 mg/ml FITC-cel (fluoreszcein-izotiocianát, Sigma-Aldrich) festettünk meg. A szuszpenziót 30 percig sötétben, 37 °C-on, 5% CO<sub>2</sub> jelenlétében inkubáltuk. Inkubálás után a felesleges FITC-t lemostuk az élesztősejtekről (kétszeres PBS-es mosás), majd a moDC-eket és az élesztősejteket 1:5 arányban ( $5 \times 10^5$  moDC +  $2,5 \times 10^6$  élesztősejt), komplett RPMI 1640 tápközegben inkubáltuk együtt. Egy óráig, 37 °C vagy 4 °C-os (negatív kontroll) inkubálást követően hideg pufferrel mostuk a DC-eket, hogy leállítsuk a fagocitózist, és a mintákat 100 µl 4%-os paraformaldehiddel (PFA, Sigma-Aldrich) fixáltuk. A fagocitózis mérését BD FACS Calibur típusú flow citométer készülékkel (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA), az adatok elemzését pedig a FlowJo Software (Treestar, Ashland, OR, USA) segítségével végeztük. Feljegyeztük a fagocitált élesztősejteket tartalmazó moDC-k arányát.

A sejt felszíni fehérjék (CD40, CD80, CD83, CD86, HLA-DQ) expressziójában, és a citokin, kemokin szekréciós profilban (IL-6, IL-8, IL-12, IL-1β, TNFα) bekövetkező változások meghatározásához moDC-eket festetlen élesztősejtekkel inkubáltuk együtt 1:3 arányban ( $5 \times 10^5$  moDC +  $1,5 \times 10^6$  élesztősejt) 24 órán át, 37 °C-on. Az élesztőkkel együttinkubált moDC-k sejt felszíni fehérje expresszióját "multicolor" áramlási citometriával elemeztük anti-CD40-FITC, anti-CD80-FITC, anti-CD86-PE, anti-HLA-DQ-PE, és anti-CD83-PeCy5 fluoreszcensen jelölt monoklonális antitestek, valamint izotípussal egyező kontroll antitestek (BioLegend, San Diego, CA, USA) alkalmazásával. A fluoreszcencia intenzitását BD FACS Calibur típusú áramlási citométerrel (Becton Dickinson) mértük, az adatok elemzését pedig a FlowJo szoftverrel végeztük. A moDC-k által termelt gyulladáscitokinek és a kemokin koncentrációját enzimhez kötött immunoszorbens próba (ELISA) mérték a sejtenyészetek felülúszójában az Immunológiai Intézetben. A mért citokinekre vagy kemokinekre specifikus BD OptEIA humán ELISA kitért a BD Biosciences-től (San Diego, CA, USA) szereztek be és a gyártó utasításainak megfelelően használták ezeket. Az abszorbancia méréseket Synergy HT mikrotiterlemez-olvasóval (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA) végezték 450 nm-s hullámhosszon. Ha a citokin/kemokin mérésekor a fluoreszcencia elhanyagolható volt, az eredményt kizártuk az összehasonlításból. A kizárt donorok pirossal vannak jelölve a nyers mérési adatkészletben (Figshare doi:10.6084/m9.figshare.15145020). A kísérleteket háromszor ismételtük meg.

#### 4.6.3 *S. 'boulardii* izolátumokkal együttinkubált moDC-k T-sejt aktiválási képességének vizsgálata

Az élesztőkkel együttinkubált moDC-k T-sejt-aktiváló képességének vizsgálatára enzimhez kötött immunospot (ELISPOT) próbát végeztünk. Az élesztőkkel való kezeléseket követően az moDC-eket sejtenyészítő tápközeggel kétszer mostuk, majd allogen CD3+ pán-T sejtekkel együtt tenyésztettük 48 lyukú szövettenyészítő lemezekben, 1:10 arányban ( $1 \times 10^5$  moDC +  $1 \times 10^6$  T-sejt), RPMI 1640 tápközegben (Sigma-Aldrich), amelyet 10% hővel inaktivált FBS-sel (Life Technologies Corporation), 2 mM L-glutaminnal, 100 U/ml penicillinnel, és 100 mg/ml sztreptomocinnel (Sigma-Aldrich) egészítettünk ki 1 mg/ml anti-humán CD3 mAb (BD Biosciences) jelenlétében. Négy nap elteltével a sejteket kétszer mostuk PBS-sel, és humán IFN- $\gamma$  és IL-17 ELISPOT kittel (eBioscience, Bécs, Ausztria) mértük az IFN- $\gamma$  és IL-17 termelő T-sejtek arányát. A vizsgálatok befejezése után az ELISPOT lemezeket megszáritottuk, és a foltokat ImmunoScan analízátorral (ImmunoSpot 4.0 szoftver; Cellular Technology Ltd., Bonn, Németország) olvastuk le. Azokat az eredményeket, ahol a T-sejt kontrollok magas értékeket mutattak, nem találtunk aktivációt, vagy ahol az ismétlésekre használt lemezlyukak között az eredmény túlságosan változó volt, kizártuk az összehasonlításból. A kizárt donorokat pirossal emeltük ki a FigShare-be feltöltött nyers adatkészletben (doi:10.6084/m9.figshare.15145020, ELISPOT képek is elérhetőek). A kísérleteket háromszor ismételtük meg.

### 4.7 *In vivo* vizsgálatok

#### 4.7.1 *Galleria mellonella* (viaszmoly) lárva infekciós kísérletek

A kísérletekhez két sarzs lárvét rendeltünk (Chameleon-farm, Budapest, Magyarország), melyeket az érkezésüktől számított 5 napon belül fertőztünk. Minden törzsnél vagy izolátumnál  $2 \times 20$  db, utolsó fejlődési stádiumban lévő lárvét használtunk a kísérletekhez, minden esetben 20–20 lárvét a két különböző sarzsból. Negatív kontrollként  $2 \times 20$  db lárvét használtunk, melyeket PBS-sel oltottunk be, valamint 20 db egyed nem fertőzött kontrollként alkalmaztunk. Patogén pozitív kontrollként a *C. albicans* SC5314 típus törzset használtuk. A lárvák fertőzését [285]  $10^6$  élesztőssejttel (egy éjszakán át inkubált, majd PBS-ben háromszor mosott és szuszpendált sejtek) végeztük. A kísérletek megkezdése előtt a lárvékat 24 órán át, 30 °C-on éhezettük, hogy a hősök általi immunaktivációt elkerüljük az oltás előtt [286]. A beoltás után a lárvák túlélését 96 órán keresztül követtük nyomon, 37 °C-on. Az elpusztult lárvából visszaizoláltuk az élesztőket. Ennek során a lárvékat 1 ml PBS-ben homogenizáltuk, és 10  $\mu$ l homogenizátumot szélesztettünk 100  $\mu$ g/ml ampicillinnel kiegészített YPD táptalajra. Ezeket a csészéket 3 napig 30 °C-on inkubáltuk. A kinőtt

telepek sejtjeinek morfológiai vizsgálatát mikroszkóp alatt, áteső látható fényel 400× nagyításban végeztük.

#### 4.7.2 Immunszuppresszált BALB/c egér infektív kísérletek

Az izolátumok virulenciájának vizsgálatok az Orvosi Mikrobiológiai Intézet munkatársaival működünk együtt. A kísérletekben BALB/c immunhiányos nőstény egereket (21–23 g; Charles River) használtunk. Az állatok fenntartása a laboratóriumi állatok gondozására és felhasználására vonatkozó irányelvek szerint történt. A kísérleteket a Debreceni Egyetem Állatgondozói Bizottsága hagyta jóvá (DEMÁB engedély: 12/2014), és a Debreceni Egyetem Orvosi Mikrobiológiai Intézetében végeztük. Az immunszuppressziót ciklofoszfamid többszöri [150 mg/testtömeg kilogramm (ttkg) 4 nappal a fertőzés előtt, 100 mg/ttkg 1 nappal a fertőzés előtt, valamint 100 mg/ttkg 2 és 5 nappal a fertőzés után] intraperitoneális beadásával idéztük elő. Az állatokat intravénásan fertőztük 0,2 ml fiziológiás sóoldatban szuszpendált,  $1-1,5 \times 10^7$  db élesztősejttel az oldalsó farokvénán keresztül. Törzsenként 7–9 egeret oltottunk, és az inokulumban lévő sejtszámot Sabouraud dextróz agaron végzett sorozathígításokkal igazoltuk. A fertőzés után 6 napon keresztül követtük az egerek halálózását, majd a még élő egereket előírás szerint leöltük, veséiket eltávolítottuk és aseptikusan homogenizáltuk. A homogenizálás után fizsóval sorozathígításokat készítettünk, melyeket YPD agarlemezekre szélesztettük, és a telepeket 2 nap, 37 °C-os inkubáció után megszámláltuk, hogy meghatározzuk a vesékben található élő sejtek számát [CFU/vesetömeg (g)]. Az egerek fertőzését a vad típusú izolátumokkal és a *HMX1* deléciós mutáns *S. 'boulardii'* törzsekkel is elvégeztük.

### 4.8 A hem oxigenáz-1 gén (*HMX1*) funkciójának vizsgálata

#### 4.8.1 Plazmidok és konstrukciók a *HMX1* gén deléciójához

A hem oxigenáz-1 gén (*HMX1*) funkciójának vizsgálatára 6 élesztőizolátumot választottunk ki. A kiválasztás során figyelembe vettük, az *in vivo* egérkísérletek eredményeit, valamint mind a három csoportból (kereskedelmi, mikózist okozó, mikózist nem okozó) választottunk izolátumot. Ezért 2 kereskedelmi, 2 vérizolátum és 2 egerben magas letalitást okozó izolátum (2 kereskedelmi és 4 klinikai izolátum) esetében végeztük el a génkiütést. A *S. 'boulardii'* izolátumokból a homozigóta *HMX1* nullmutáns törzseket a CRISPR/Cas9 rendszer segítségével hoztuk létre. A génkiütéshez szükséges "repair" DNS-t (rDNS) és a Cas9/guide RNS-t (gRNS) expresszáló plazmidot a Benchling online szofverrel [287] terveztük meg és a MoClo Yeast Toolkit plazmidjaiból (YTK, Addgene kit, Addgene, katalógusszám: 1000000061) állítottuk össze [288,289]. A rDNS összeállítását PCR-reakcióval végeztük, Dream Taq Green polimeráz (Thermo Fisher Scientific) alkalmazásával. A

rDNS-t úgy terveztük meg, hogy a teljes *HMX1* gén kiütésre kerüljön, és egy 20 bp hosszú inzerció kazettát (STOP kodonokat kódoló DNS szakasz) tartalmazzon. Az LRSDAY pipeline-nal összeállított teljesgenom fájlt, valamint a térképezési .BAM fájlokat is felhasználtuk, hogy a szoftverben megtalálható S288c törzshöz képet fennálló különbségeket az esetleges génkiütési problémák szempontjából elemezzük. A rDNS és a gRNS-szekvenciát tartalmazó oligonukleotidok tervezésénél Akhmetov és mtsai. [289] eredményeit vettük figyelembe. A rDNS és gRNS oligonukleotid szekvenciáit a 3. táblázat tartalmazza. A Cas9/gRNS-t expresszáló plazmidot Golden Gate reakcióval állítottuk össze, amelyben három plazmidot használtunk fel: egy gRNS-t és egy Cas9 fehérjét kódoló plazmidot, valamint az úgynevezett "Multi-Gene" vektort, amely tartalmazta az élesztők szelekcióját biztosító nourseothricin rezisztenciáért felelős gént. Mindhárom plazmidot Golden Gate reakcióval állítottuk elő a MoClo Yeast Toolkit-ben található plazmidokból Akhmetov és munkatársai [289] és Lee és munkatársai [288] eredményei alapján. Az gRNS kazettát tartalmazó plazmidot a pYTK003, pYTK072, pYTK095 plazmidok és a pYTK050-sgRNS felhasználásával állítottuk össze, amelyekből az utóbbit Golden Gate reakcióval állítottuk elő a pYTK050 plazmidból és a PCR készülékkel összeállított gRNS oligoból. A 22 bp méretű gRNS oligo helyes beépülését a pYTK050 plazmidba Sanger szekvenálással ellenőriztük (Microsynth AG, Ausztria). A Cas9 fehérjét kódoló plazmidot a pYTK002, pYTK011, pYTK036, pYTK054, pYTK064 és a pYTK095 plazmidokból raktuk össze Golden Gate reakcióval. A nourseotricin szelekciós markert hordozó Multi-Gene vektort pYTK008, pYTK047, pYTK073, pYTK078, pYTK081 és pYTK084 plazmidokból állítottuk össze. A mutánsok szelekciójára 0,1 mg/ml nourseothricin-t (Werner BioAgents GmbH, Jena, Németország) tartalmazó YPD táptalajt használtunk. A mutánsokat YPD táptalajon tenyésztettük tovább, hogy elveszítsék a plazmidon kódolt antimikotikum rezisztencia gént (illetve magát a plazmidot), így a deléciós törzsek nem tartalmaztak markert. Valamennyi klónozási reakcióhoz ultrakompetens *E. coli* DH5 $\alpha$  sejteket használtunk, amelyeket transzformáció után a megfelelő antibiotikumokat (ampicillint, kloramfenikolt vagy kanamicint) tartalmazó Lysogeny Broth (LB, Miller) agarlemezekken szelektáltunk. Az ultrakompetens *E. coli* sejteket az Inoue-féle módszerrel [290] készítettük, a transzformációkat pedig hősokkal végeztük (42 °C, 30 mp). A géndeléción sikerességét PCR reakcióval (GoTaq G2 Hot Start polimeráz; Promega) ellenőriztük minden egyes törzsnél. Ennek során a használt primerpároktól függően vagy a teljes *HMX1* gént kíséreltük meg amplifikálni, vagy a javító DNS-kazetta helyes beépülését határoztuk meg. Az ellenőrzéshez használt primereket a 3. táblázatban soroltuk fel. A gélelektroforézist 1%-os, "low electroendosmosis" agaróz gélen (LE; Promega), 80 V-on végeztük, TAE pufferrel.

**3. táblázat.** A géndelécíóhoz használt rDNS, gRNS oligonukleotidok és ellenőrző primerek szekvenciái. A rDNS szekvenciákon belül a kisbetűvel jelzett nukleotidok az inzerciós kazettát jelzik. A gRNS szekvenciákban a kisbetűvel jelzett nukleotidok az Akhmetov és munkatársai [289] által javasolt módosításokat mutatják.

<b>rDNS oligonukleotidok:</b>	forward: 5'-ATGGAGGACAGTAGCAATACAATCATACCCTCACCCACTGACGTGGGGGCGCTAGCAAACcactaactaactaagcgtcg-3' reverse: 5'-TTTTGATATTATTCATGTATATATTATGTTTGTATTTAGACTTTTTTTTTTATACGTTAcgacgcttagtagtagtg-3'				
<b>gRNS oligonukleotidok:</b>	forward: 5'-gactttCATCCACGAAAACATACACA-3' reverse: 5'-aaacTGTGTATGTTTTCGTGGATGaa-3'				
<b>Ellenőrző primerek</b>	<table border="1"> <tr> <td><b>primerek a géndelécíó ellenőrzésére</b></td> <td>forward: 5'-TGTTATTGTACCCATAGAGG-3' reverse: 5'-AAATATAGTGATGCAACTCG-3'</td> </tr> <tr> <td><b>primerek a delécíós kazetta helyes beépülésének ellenőrzésére</b></td> <td>forward: 5'-TGTTATTGTACCCATAGAGG-3' reverse: 5'-CGACGCTTAGTTAGTTAGTG-3'</td> </tr> </table>	<b>primerek a géndelécíó ellenőrzésére</b>	forward: 5'-TGTTATTGTACCCATAGAGG-3' reverse: 5'-AAATATAGTGATGCAACTCG-3'	<b>primerek a delécíós kazetta helyes beépülésének ellenőrzésére</b>	forward: 5'-TGTTATTGTACCCATAGAGG-3' reverse: 5'-CGACGCTTAGTTAGTTAGTG-3'
<b>primerek a géndelécíó ellenőrzésére</b>	forward: 5'-TGTTATTGTACCCATAGAGG-3' reverse: 5'-AAATATAGTGATGCAACTCG-3'				
<b>primerek a delécíós kazetta helyes beépülésének ellenőrzésére</b>	forward: 5'-TGTTATTGTACCCATAGAGG-3' reverse: 5'-CGACGCTTAGTTAGTTAGTG-3'				

#### 4.8.2 Élesztőizolátumok transzformálása

Az élesztők transzformációját Lee és munkatársai [288] eredményei alapján végeztük a következő módosításokkal: 1) a transzformáció előtt az élesztősejteket 20 ml YPD tápközegben (1% élesztőkivonat, 2% mikológiai pepton, 2% glükóz, 2% agar, pH 5,6) tenyésztettük; 2) a transzformációs elegyhez (végtérfogat: 50  $\mu$ l) a sejteket 33,33  $\mu$ l 50%-os PEG-3350-t (Sigma), 1,39  $\mu$ l forralt (95 °C, 5 perc) lazac spermium DNS-t (Sigma), 5  $\mu$ l 1 M lítium-acetátot-t (pH 7,5), 4,28  $\mu$ l steril desztillált vizet, 200 ng Cas9/gRNS-t expresszáló plazmidot, és 1000 ng rDNS-t alkalmaztunk; 3) a transzformációs elegyet 30 °C-on 30 percig inkubáltuk a 42 °C-os, 30 perces hősokk előtt; 4) a nourseotricin rezisztencia szelekció előtt a sejteket centrifugáltuk, YPD-ben szuszpendáltuk, majd 30 °C-on, 220 rpm-en egy éjszakán át inkubáltuk. A transzformánsok szelekciójához 0,1 mg/ml nourseothricinnel kiegészített YPD agart használtunk, majd több telepet YPD agar táptalajra oltottunk, hogy elősegítsük az antimikotikum szelekciót biztosító plazmid elvesztését.

#### 4.8.3 Vaséhezéssel szembeni tolerancia, hemolitikus aktivitás és *in vivo* virulencia vizsgálata a *HMXI* deléciós törzsek esetében

A törzseket YPD-n 24 órán keresztül előtenyésztettük 30 °C-on, majd vizsgáltuk a vaséhezés hatását hat probiotikum izolátum és a belőlük létrehozott *HMXI* deléciós törzsek telepeinek növekedésére "spot plate" assay alkalmazásával. A vashiány előidézésére "synthetic defined" (SD) agar táptalajt (6,7 g/l YNB aminosavak nélkül, 2,2% glükóz, 2% agar) 40, 80 és 120  $\mu$ M vaskelátképző batofenantrolindiszulfonsav-dinátrium-sóval (BPS) egészítettük ki. A BPS nélküli SD tápközeg körülbelül 68,86  $\mu$ g/L szabad vasat tartalmazott. A sejtszámot minden esetben 0,5 McFarland-re állítottuk be desztillált vízben, majd az izolátumokat három ismétlésben oltottuk le. Mindegyik ismétlésnél 4 $\times$ 10  $\mu$ l sejtszuszpenziót oltottunk a táptalajra, amelyek a sejtek 10-szeres hígítási sorát tartalmazták (kb. 50 000, 5 000, 500 és 50 sejt). A *HMXI* deléciós törzsek hemolitikus aktivitának meghatározását a 4.4.8 pontban leírtak alapján végeztük. Az izolátumokat és törzseket 37 °C-on inkubáltuk, és a telepek növekedését 3 nap után fényképesen dokumentáltuk. Az eredeti fotók, valamint a statisztikai próbák eredményeit összefoglaló táblázatok a Figshare-be feltöltött kiegészítő fájlban találhatóak meg (10.6084/m9.figshare.17000254).

A törzsek szaporodását 50% humán szérumban (mint szabad vasat alapvetően nem tartalmazó tápközeg) is vizsgáltuk [291] az Orvosi Mikrobiológiai Intézet munkatársaival együttműködve. A kísérlet során a vad típusú és a *HMXI* deléciós mutánsok növekedési görbéit hasonlítottuk össze 5 ml végtérfogatú humán szérumban [Összetétel: 50% RPMI-1640 (Sigma Aldrich; R6504), 50% humán szérum (Sigma Aldrich; H4522)]. A kiindulási oltóanyag 1 $\times$ 10<sup>5</sup>–2 $\times$ 10<sup>5</sup> CFU/ml volt. A tenyészetekből 0, 4, 8, 12, illetve 24 óra elteltével 100  $\mu$ l térfogatú mintákat vettünk, 10 $\times$

sorozathígítást végeztünk, majd SDA lemezekre szélesztettük, melyeket 35 °C-on 48 órán át inkubáltuk. A kísérletet három ismétlésben végeztük. A deléciós törzsek virulenciáját immunszuppresszált BALB/c egérmodellben vizsgáltuk a 4.8.2 pont szerint.

#### 4.9 Statisztika és adatvizualizáció

Az élesztőizolátum csoportoknál (C: kereskedelmi, M: mikózist okozó, és NM: mikózist nem okozó csoportok, valamint a  $\Delta\Delta$ C: kereskedelmi,  $\Delta\Delta$ M: mikózist okozó, és  $\Delta\Delta$ NM: mikózist nem okozó csoportok), és élesztő törzseknél kapott eredmények összehasonlításához a VassarStats (<http://vassarstats.net/>), Astatsa (<https://astatsa.com/>) és Statistics Kingdom (<https://www.statskingdom.com/>) online statisztikai alkalmazásokat használtuk. Két adathalmaz összehasonlításakor két mintás T-próbát (egyenlő varianciák esetén) vagy Welch-tesztet (nem egyenlő varianciák esetén) alkalmaztunk, ha az adatsorok normál eloszlást követtek. Nem normál eloszlás esetén Mann-Whitney tesztet alkalmaztunk. Több mint két, normál eloszlású adatsor összehasonlításához ANOVA-t használtunk, majd Tukey HSD tesztel határoztuk meg, hogy mely adatsorok térnek el szignifikánsan a többitől. Több mint két, nem normál eloszlású adatsor esetén Kruskal-Wallis tesztet alkalmaztunk, majd Dunn post-tesztel (Benjamini-Hochberg FDR-rel korrigált) határoztuk meg az adatsorok közötti különbségeket. Az immunológiai kísérletek esetében nemcsak az izolátumcsoportok, és a törzsek adatait, hanem a donorok adatait is összehasonlítottuk. Az egér és lárva túlélés elemzéséhez Log-rank (Mantel-Cox) tesztet végeztünk, és Kaplan-Meier túlélési görbével illusztráltuk az eredményeket. A spot plate assay statisztikai értékeléséhez az úgynevezett "mean gray-value" értékeket az ImageJ szofverrel mértük meg Petropavlovskiy és munkatársai [292] eredményei alapján. A "mean gray value" az átlagos szürkeségi értéket jelenti [a szürke szín intenzitását meghatározó érték egy adott pixelben 0% szürke (fehér) és 100% szürke (fekete) közötti skálán] egy fotó kiválasztott területén belül. Így az átlagos szürkeségi érték a kiválasztott összes pixel szürkeségi értékének összege osztva a pixelek számával.

Annak ellenére, hogy a törzsek között nem volt látható különbség a telepek növekedésében, azt tapasztaltuk, hogy a kontroll SD csészéknél jelentősen eltértek a szoftverrel mért értékek (a számunkra releváns 2. spot esetében). Emiatt az adatok normalizálására az SD kontrollcsészék összes mért "gray-value" értékének átlagát alkalmaztuk, a törzsenkénti normalizálás helyett. A spot plate assay kivágott fotóit nem szerkesztettük, azok megegyeznek az eredeti fotókkal. Az eredeti fotók, valamint a statisztikai próbák eredményeit összefoglaló táblázatok a Figshare-be feltöltött kiegészítő fájlban találhatóak meg (10.6084/m9.figshare.17000254). A szignifikáns eltéréseket a következőképpen jelöljük: \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*:  $p < 0,0001$ . Az adatok és eredmények vizualizálásához a Graphpad 9.3.0 szofvert és a Biorender online alkalmazást (<https://biorender.com/>) használtuk.

## 5. EREDMÉNYEK

### 5.1 Fajidentifikálás és MLST

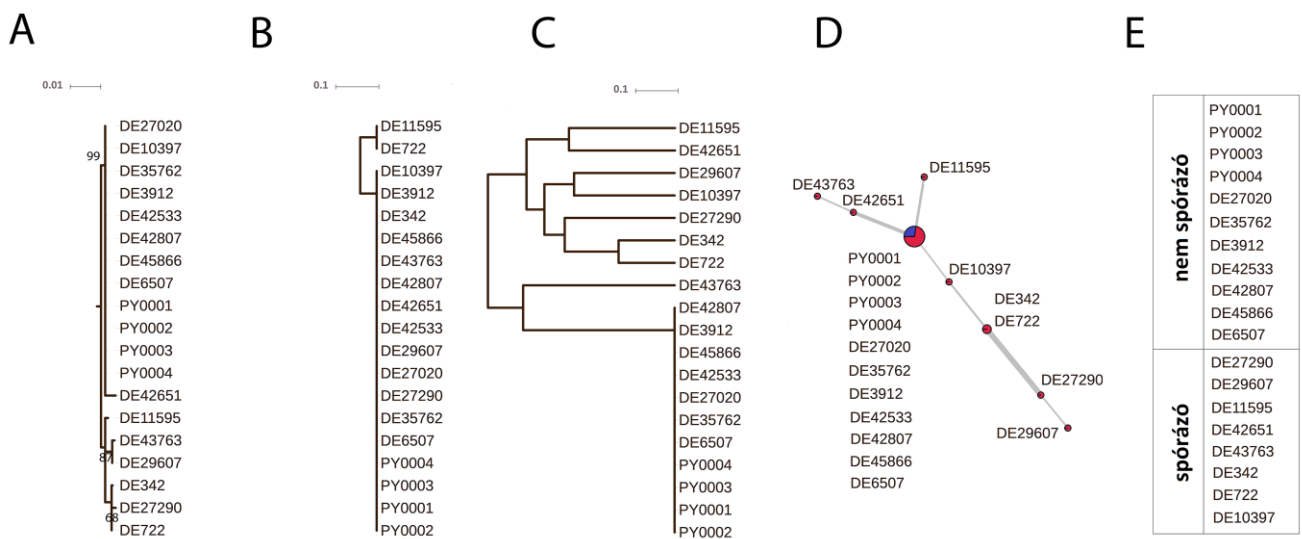
A DE Orvosi Mikrobiológiai Intézetében összesen 16 élesztőizolátumot azonosítottak MALDI-TOF módszerrel *S. cerevisiae*-ként, melyek mindegyikét a Debreceni Egyetem Klinikai Központjában izolálták. Ezek közül az egyik izolátumról (DE22293) az ITS analízist követően kiderült, hogy tévesen azonosították *S. cerevisiae*-ként, mert valójában ez egy *P. kudriavzevii* izolátum volt. Ezért a további analízisekből ezt az izolátumot kizártuk. A felhasznált törzsek listájában említett szegedi klinikai izolátumok ehhez a kísérlethez még nem álltak rendelkezésre, így azokat nem elemeztük.

Az ITS régió kivül négy, különböző kromozómán elhelyezkedő, sejtmagban található gén szekvenálását végeztük el, és kereskedelmi izolátumokat is bevontunk a vizsgálatba. Három izolátum esetében a *HMX1* gén olvashatatlan volt, vagy csak részben volt olvasható, hat izolátum esetében pedig az ITS régió volt olvashatatlan az egymástól eltérő, INDEL-eket tartalmazó allélok miatt (F2. táblázat). A többi izolátumnál mind a négy gén és az ITS régió szekvenálásakor is olvasható szekvenciákat kaptunk, melyekben számos egynukleotid polimorfizmust (SNP) találtunk. A szekvenciákat törzsenként konkatenáltuk (összesen 3854 nukleotid), majd filogenetikai analízist végeztünk, ami alapján nyolc kládot tudtunk azonosítani. Nyolc izolátum a kereskedelmi élesztőkkel együtt egy egységes kládot alkotott (6. A ábra). Azonban a DE10397 izolátumban heterozigóta SNP-eket találtunk a *CCA1*, *CYT1*, *HMX1* és *NUP116* gének esetében (az ITS szekvencia olvashatatlan volt), melyeket vektorba klónozással elkülönítettünk. A szekvenálást követően kiderült, hogy ez az izolátum a probiotikumokkal megegyező, és 1–7 SNP-ben eltérő haplotípusokat egyaránt hordoz. A kládban található maradék hét izolátum (DE6507, DE27020, DE35762, DE3912, DE42533, DE42807, DE45866) génszekvenciái nem mutattak különbséget a probiotikumokhoz képest, sőt egy közös heterozigóta pozíció is megtalálható bennük az ITS1 régió belül (A/G, 121. pozíció). A többi szekvenált régió homozigóta volt ezeknél a kereskedelmi probiotikumokkal egyező izolátumoknál.

### 5.2 PCR-fingerprinting és mikroszatellita tipizálás

Az MSP-PCR módszer felbontóképessége alacsony volt, csak két csoportot tudtunk megkülönböztetni az izolátumok analízisekor. A kereskedelmi probiotikumok és a fentebb említett hét probiotikum eredetű izolátum egységes volt, de egyúttal megkülönböztethetetlenek voltak a többi izolátumtól (6. B ábra, F1. ábra). Az interdelta fingerprinting módszer kilenc csoportba tudta sorolni az izolátumokat. A kereskedelmi probiotikumok, valamint a hét potenciálisan probiotikum eredetű klinikai izolátum ezzel a módszerrel is egységes kládott alkotott (6. C ábra, F2. ábra). A mikroszatellita tipizálás, melyet a

többi módszertől eltérően a Molekuláris Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszéken munkatársaim végeztek [Társszerzői eredmény (mikroszatellita tipizálás): Lovászné Rácza Hanna Viktória, Dr. Pfliegler Valter Péter, Molekuláris Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszék], az összes probiotikum és klinikai élesztő esetében homozigóta allélokat azonosított az *YLR177w* (XII. kromoszóma) esetében, melyben 4–12 db CAG ismétlés volt. A *YOR267c* mikroszatellita homo-, di- és trizigóta volt, 11–41 db CAA ismétléssel (F3. táblázat). Az összes kereskedelmi probiotikum és a feltételezhetően probiotikum eredetű klinikai izolátumok egyértelműen elkülönültek a többi izolátumtól ezzel a módszerrel (6. D ábra), és mindegyik homozigóta volt a két mikroszatellitára nézve. Ezen 11 izolátum közeli rokonságát erősíti, hogy egyik sem volt képes spórázni a kísérleteink során (6. E ábra).



**6. ábra** A különböző tipizálási technikák alapján kapott eredmények probiotikus és egyéb *Saccharomyces* élesztőizolátumok esetén. A: Maximum likelihood filogram az öt konkatenált gén szekvenciájának felhasználásával. B: UPGMA dendrogram az MSP-PCR analízis alapján. C: UPGMA dendrogram az interdelta analízis alapján. D: Minimum spanning network a mikroszatellita allélok hasonlóságairól [Társszerzői eredmény (mikroszatellita tipizálás): Lovászné Rácza Hanna Viktória, Dr. Pfliegler Valter Péter, Molekuláris Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszék]. E: az izolátumok spórázási képessége

### 5.3 Új multiplex PCR protokoll a *S. 'boulardii'* azonosítására

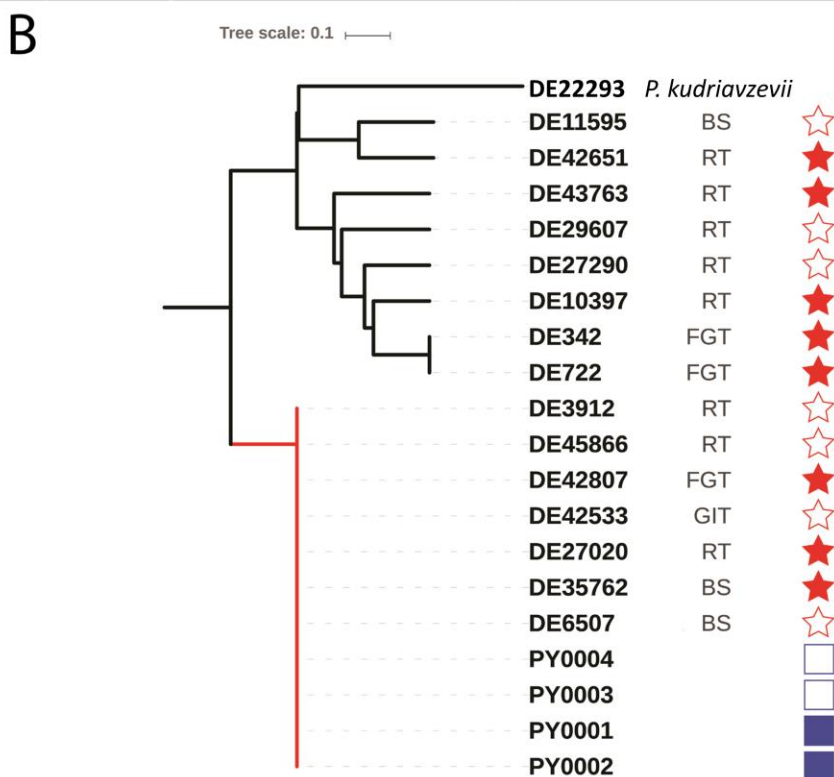
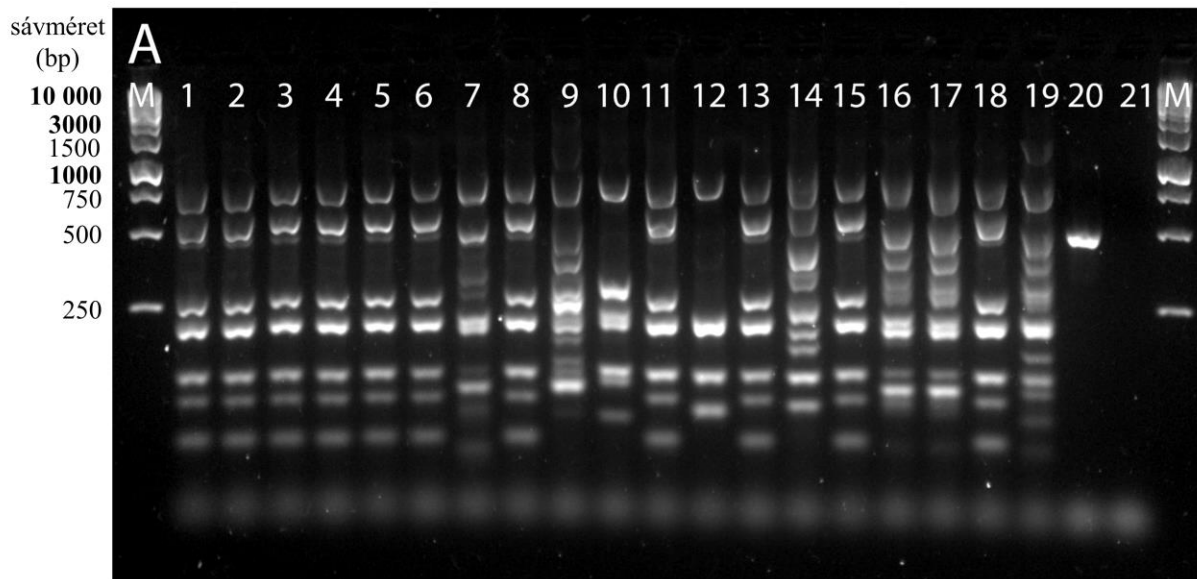
A PCR alapú módszerek kombinálásával létrehoztunk és optimalizáltunk egy törzs szintű identifikálásra alkalmas, nagy diagnosztikai értékű, gyorsan elvégezhető multiplex PCR módszert, ami nem igényel nagyfokú mintaelőkészítést. Az MLST, MSP-PCR, interdelta és mikroszatellita tipizálási eredmények, valamint más interdelta és mikroszatellita tipizálásról szóló munkák alapján [126,131,253] kombináltunk az interdelta, *YLR177w*, *YOR267c*, és ITS régiók amplifikálásához szükséges primereket egyetlen multiplex PCR reakcióban. A primer koncentrációkat optimalizáltuk annak érdekében, hogy a gélelektroforézist követően elkerüljük a nagymértékű

intenzitáskülönbségeket a sávok között (4. táblázat). A kereskedelmi probiotikumoknál és probiotikum eredetű klinikai izolátumoknál ez a módszer egy jól felismerhető, három csoportban elhelyezkedő (600–850 bp, 210–270 bp, és 100–140 bp), 7+1 (<75 bp) sávból álló mintázatot adott (7. A; F3.3; F3.4 ábra). A megfelelő felbontáshoz a gélelektroforézis során 2% TBE agaróz gélt és 100 V feszültséget alkalmaztunk 1 órán keresztül. A többi, nem probiotikum eredetű klinikai izolátumnál eltérő sávmintázatot figyeltünk meg, ami alapján hét csoportot tudtunk megkülönböztetni. Ezek a mintázatok egyértelműen elkülönültek a probiotikum és probiotikum eredetű izolátumok sávmintázatától (7. B ábra).

Ezen felül a kontrollként használt *P. kudriavzevii* izolátum esetében *Saccharomyces* specifikus szekvencia nem volt jelen, ITS sáv viszont volt (7. A ábra). A módszert tisztított és telepből izolált DNS-el, és egy másik enzimmel (DreamTaq; Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) is leteszteltük (F3. ábra). Dream taq polimeráz alkalmazásával is alapvetően ugyanazt az eredményt kaptuk, mint a GoTaq használatakor. Két sáv mérete megváltozott, valamint a sávintenzitások eltértek a GoTaq és DreamTaq enzimekkel kapott eredmények összehasonlításakor, de ez nem befolyásolta a mintázatok kiértékelését. Ezen felül pedig *S. cerevisiae* bor, élelmiszer, bioetanol és labor törzset is vizsgáltunk a multiplex módszerrel. A kapott sávmintázatok ezeknél a törzseknél nagymértékben különböztek a probiotikumoknál kapott mintázattól (F4. ábra), tehát a módszer megbízhatóan alkalmazható a *S. 'boulardii'* altípus azonosítására. A vizsgált izolátumokat a multiplex PCR alapján a *S. cerevisiae* fajba, illetve a *S. 'boulardii'* altípusba soroltuk (5. táblázat).

#### 4. táblázat A kifejlesztett multiplex PCR módszerhez használt primerek, PCR mix és program

<b>Primerek</b>	<p>δ12 (5'-TCAACAATGGAATCCCAAC-3') δ2 (5'-GTGGATTTTTATTCCAACA-3') YLR177wf (5'-CTTAAACAACAGCTCCCAAA-3') YLR177wr (5'-ATGAATCAGCGCATCAGAAAT-3') YOR267cf (5'-ATGACTGCAGCAATGAATCG-3') YOR267cr (5'-TCCTCTGTGCTGTTGACTCG-3') ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')</p>
<b>PCR mix és program (GoTaq)</b>	<p><u>PCR mix 50 µl-s reakcióhoz:</u></p> <p>1× GoTaq Flexi puffer; 4,0mM MgCl<sub>2</sub>; 0,2mM dNTP; δ12, δ2, YLR177wf, és YLR177wr primerek (mindegyikből 20 pmol); YOR267cf, YOR267cr primerek (mindegyikből 10 pmol); ITS1, ITS4 primerek (mindegyikből 3 pmol); 2,5 u GoTaq G2 Hot Start polimeráz; 1 ng genomi DNS (vagy 1 µl kolónia DNS)</p> <p><u>Program:</u> 95 °C 3 p, 25× (95 °C 30 mp, 55 °C 30 mp, 72 °C 1 p), 72 °C 5 p</p>
<b>PCR mix és program (DreamTaq)</b>	<p><u>PCR mix 50 µl-s reakcióhoz:</u></p> <p>1× DreamTaq puffer (MgCl<sub>2</sub>-t tartalmaz); 0,2mM dNTP; δ12, δ2, YLR177wf, és YLR177wr primerek (mindegyikből 20 pmol); YOR267cf, YOR267cr primerek (mindegyikből 10 pmol); ITS1, ITS4 primerek (mindegyikből 3 pmol); 1,25 u DreamTaq polimeráz; 1 ng genomi DNS (vagy 1 µl kolónia DNS)</p> <p><u>Program:</u> 95 °C for 3 p, 25x (95 °C 30 mp, 50 °C 30 mp, 72 °C 1 p), 72 °C 5 p</p>



**7. ábra** Az új multiplex PCR módszerrel kapott eredmények. A: gél elektroforézis (1 óra, 2% TBE, 100 V, 5 µl termék volt futtatva); M: Gene Ruler 1 kb marker (Thermo Fischer Scientific); 1: PY0001; 2: PY0002; 3: PY0003; 4: PY0004; 5: DE6507; 6: DE35762; 7: DE27290; 8: DE27020; 9: DE29607; 10: DE11595; 11: DE42533; 12: DE42651; 13: DE42807; 14: DE43763; 15: DE45866; 16: DE342; 17: 722; 18: DE3912; 19: DE10397; 20: DE22293; 21: negatív kontrol. B: UPGMA dendrogram a multiplex PCR módszer alapján; a probiotikum klád tagjait tartalmazó ág pirossal van kiemelve a fán; teli négyzetek: csak élesztő törzset tartalmazó termék izolátumok; üres négyzetek: élesztő és baktérium törzset egyaránt tartalmazó termék izolátumok; teli csillagok: női betegtől származó klinikai izolátumok; üres csillagok: férfi betegtől származó klinikai izolátumok; BS: vér; FGT: női nemi traktus; GIT: gasztrointesztinális traktus; RT: légzőrendszer.

**5. táblázat** A multiplex PCR módszer fejlesztése során felhasznált törzsek faj/altípus szerinti besorolása. Az izolátumok sorszámai megegyeznek a 27. ábrán használt sorszámokkal.

#sorszám	ID	Típus	Faj/altípus
1	PY0001	kereskedelmi izolátum	<i>S. 'boulardii'</i>
2	PY0002	kereskedelmi izolátum	<i>S. 'boulardii'</i>
3	PY0003	kereskedelmi izolátum	<i>S. 'boulardii'</i>
4	PY0004	kereskedelmi izolátum	<i>S. 'boulardii'</i>
#sorszám	ID	Típus	Faj/altípus
5	DE6507	klinikai izolátum	<i>S. 'boulardii'</i>
6	DE35762	klinikai izolátum	<i>S. 'boulardii'</i>
7	DE27020	klinikai izolátum	<i>S. 'boulardii'</i>
8	DE3912	klinikai izolátum	<i>S. 'boulardii'</i>
9	DE42533	klinikai izolátum	<i>S. 'boulardii'</i>
10	DE42807	klinikai izolátum	<i>S. 'boulardii'</i>
11	DE45866	klinikai izolátum	<i>S. 'boulardii'</i>
12	465/2018	klinikai izolátum	<i>S. 'boulardii'</i>
13	551/2018	klinikai izolátum	<i>S. 'boulardii'</i>
14	2251/2018	klinikai izolátum	<i>S. 'boulardii'</i>
15	DE342	klinikai izolátum	<i>S. cerevisiae</i>
16	DE722	klinikai izolátum	<i>S. cerevisiae</i>
17	DE10397	klinikai izolátum	<i>S. cerevisiae</i>
18	DE11595	klinikai izolátum	<i>S. cerevisiae</i>
19	DE27290	klinikai izolátum	<i>S. cerevisiae</i>
20	DE29607	klinikai izolátum	<i>S. cerevisiae</i>
21	DE42651	klinikai izolátum	<i>S. cerevisiae</i>
22	DE43763	klinikai izolátum	<i>S. cerevisiae</i>

#### 5.4 Genomikai eredmények: teljesgenom-összeállítás és -annotálás

A hosszú, illetve rövid szekvenciaolvasatok felhasználásával az LRSDAY pipeline alkalmazásával 16 nukleáris kromozómából, valamint két mitokondriális kontigból álló, gyakorlatilag teljes genomot állítottunk össze a PY0001 kereskedelmi izolátum (*S. 'boulardii'* CNCM I-745) esetén. A mitokondriális genomot Peter és munkatársai [4] genom összeillesztéseit felhasználva, a CIM nevű *S. 'boulardii'* izolátummal pótoltuk ki, mely a rövid olvasatok alapján mindössze egy SNP-t tartalmazott a PY0001-hez képest. Az alkalmazott pipeline nem kis méretű, cirkuláris genomalkotók összerakására volt optimalizálva, így a 2 $\mu$  plazmid összerakásától eltekintettünk. Az összeállított genom nagymértékben szinténikus volt a *S. cerevisiae* S288C referencia genommal (8. ábra), és a teljes genom méret a mitokondriummal együtt 11 868 337 bp-nak adódott, szemben az S288c referencia 12 157 105 nukleotidjával (6. táblázat). A gének, a telomerikus régiók, és a centromerek annotációja alapján a két törzs közötti különbség leginkább egyes S288c gének hiányából, valamint a Ty1-3-4 retrotranszpozonok hiányából fakad. Ugyanakkor a PY0001 genomja tartalmaz az S288c-ben meg nem lévő ORF-eket is. Megjegyzendő, hogy a CIM törzs

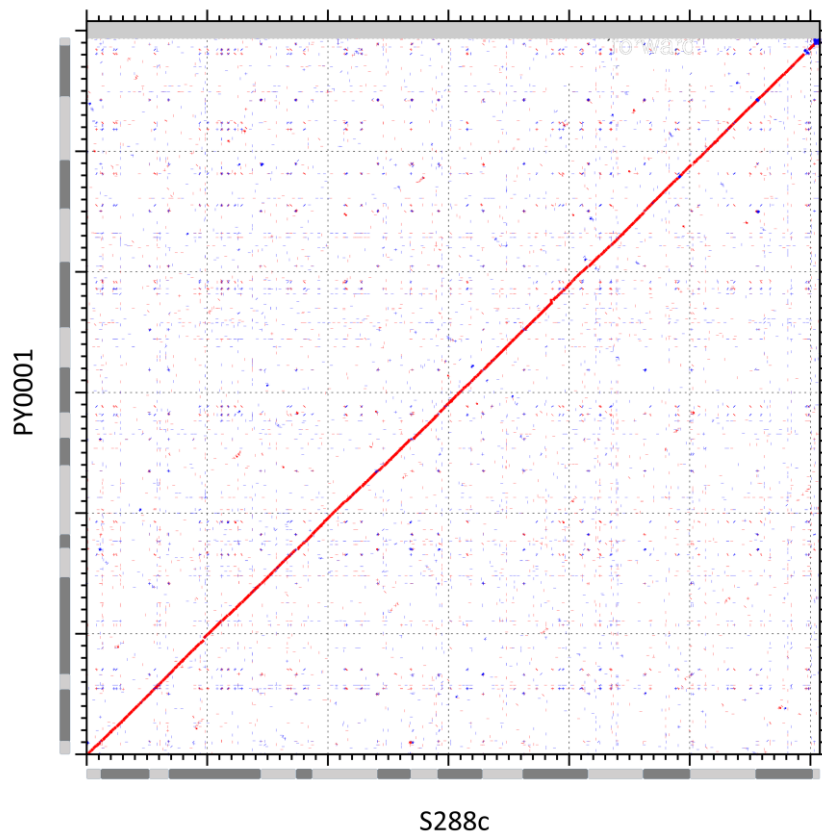
mitokondriális genomja hosszabb, mint az S288c referencia mitokondriális genomja (87 321 bp, illetve 85 779 bp).

A gének identifikálása során 3 ETS-szekvencia („external transcribed spacer”, külső átírt elválasztó szekvencia) is tévesen ORF-ként került meghatározásra, ezeket a SGD BLAST szolgáltatásával identifikáltuk, majd az annotációs listából (.GFF3 fájl) töröltük. Így mindösszesen 5717 magi proteinkódoló gént identifikáltunk a PY0001-ben (6. táblázat). Később ezt az összeállított genomot használtuk referenciaként a *HMXI* génkiütéshez használt hat izolátum genomikai elemzéséhez.

A nyolc ismert *Saccharomyces* fajra történő térképezés alapján a probiotikus élesztők genomja nem tartalmazott semmilyen jelentős introgressziót, így ezek további analizisétől eltekintettünk.

**6. táblázat** A PY0001 izolátum összeállított genomjának jellemzői: kromoszómák méretei (összehasonlítva az S288c referenciagenommal), illetve az annotált fehérjekódoló gének száma.

<b>kromoszóma</b>	<b>S288c referencia genom</b>	<b>PY0001 referencia</b>
<b>I.</b>	230 218 bp,	210 734 bp, 95 gén
<b>II.</b>	813 184 bp	793 175 bp, 397 gén
<b>III.</b>	316 620 bp	315 973 bp, 159 gén
<b>IV.</b>	1 531 933 bp	1 510 005 bp, 743 gén
<b>V.</b>	576 874 bp	565 474 bp, 273 gén
<b>VI.</b>	270 161 bp	245 370 bp, 122 gén
<b>VII.</b>	1 090 940 bp	1 058 692 bp, 503 gén
<b>VIII.</b>	562 643 bp	523 461 bp, 271 gén
<b>IX.</b>	439 888 bp	420 152 bp, 208 gén
<b>X.</b>	745 751 bp	730 649 bp, 354 gén
<b>XI.</b>	666 816 bp	668 834 bp, 321 gén
<b>XII.</b>	1 078 177 bp	1 051 807 bp, 472 gén
<b>XIII.</b>	924 431 bp	909 758 bp, 450 gén
<b>XIV.</b>	784 333 bp	790 714 bp, 382 gén
<b>XV.</b>	1 091 291 bp	1 054 797 bp, 511 gén
<b>XVI.</b>	948 066 bp	931 421 bp, 456 gén
<b>mtDNS</b>	85 779 bp	87 321 bp (CIM), 20 gén
<b>2<math>\mu</math> plazmid</b>	nincs	nincs összeállítva



**8. ábra** Teljesgenom-illesztés az S288c referenciagenom és a PY0001 referenciagenom között.

### 5.5 Fenotípusos különbségek a kereskedelmi, mikózist okozó és mikózist nem okozó *S. 'boulardii'* izolátumok között

A probiotikum izolátumok közötti fenotípusos eltérések megállapításához, először a telepmorfológiát vizsgáltuk. Tíz napos inkubációt követően a telepek sima felszínűek és fehérek voltak az összes izolátumnál. Azonban a telepek öregedésének vizsgálatakor eltérő fenotípusok jelentek meg, a fungémiát okozó izolátumoknál pedig komplex telepmorfológiát figyeltünk meg (F4. táblázat). A mitokondriális "petite" mutánsok aránya jellemzően kicsi volt: 0–1,22% között mozgott, és az izolátum csoportok között nem volt szignifikáns eltérés. Egyik izolátum sem spórázott a vizsgált hőmérsékleteken (25 °C és 37 °C), de a MAT lókusztipizálás megerősítette, hogy mindegyik izolátum homotallikus (F4. táblázat). Továbbá mindegyik izolátum "non-killer" és szenzitív volt az 1 és 2 típusú killer toxinokra (F4. táblázat) [Társszerzői eredmények (petite-teszt, MAT lókusztipizálás, killer teszt): Dr. Pfliegler Valter Péter, Molekuláris Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszék]. A telepek egyik esetben sem voltak invazívak függetlenül a táptalaj típusától vagy az inkubáció során alkalmazott hőmérséklettől, valamint flokkuláció sem volt megfigyelhető, a pszeudohifás növekedés pedig táptalaj függő volt. A spot-plate módszer eredményei alapján az izolátumok telepeinek növekedése azonos volt, 37 °C és 39 °C-on, 42 °C-on viszont a PY0001 és PY0002 izolátumok esetében a telepek intenzívebb növekedést mutattak a többi izolátumhoz képest, a 2251/2018 izolátum

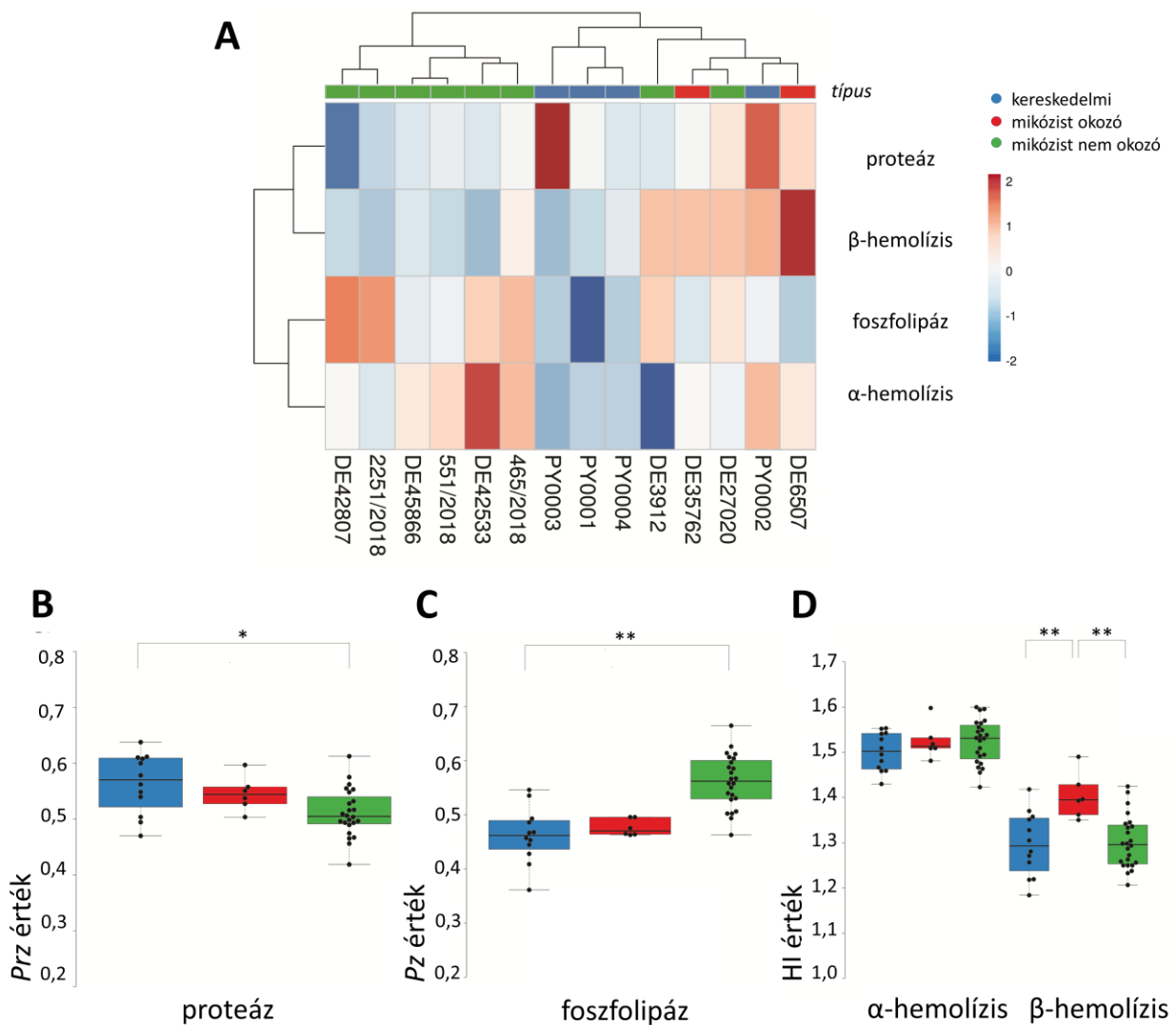
pedig nem mutatott növekedést (F5. táblázat). Nyers adatok és statisztikai analízis: Figshare doi:10.6084/m9.figshare.15145020.

### **5.6 A kereskedelmi, mikózyst okozó, és mikózyst nem okozó *S. 'boulardii'* izolátumok extracelluláris virulencia faktorai (extracelluláris foszfolipáz és aszpartát proteáz termelés, hemolitikus aktivitás)**

Fenotípusos klaszterezés alapján két fő csoportot tudunk megkülönböztetni: Az egyikben kisebb volt a proteáz termelés és a  $\beta$ -hemolízis mértéke, valamint nagyobb volt a foszfolipáz termelés, a másikban ezek ellenkezője volt jellemző (9. A ábra). Azonban, ha a virulencia faktorokat külön értékeltük, statisztikailag szignifikáns eltéréseket találtunk az egyes csoportok között. A Tukey HSD teszt alapján a mikózyst nem okozó klinikai izolátumok szignifikánsan ( $p < 0,05$ ) kisebb  $Prz$  (proteáz zóna) értékekkel rendelkeztek, mint a kereskedelmi izolátumok, tehát nagyobb volt a proteáz termelésük (9. B ábra, 7. táblázat). Ugyanezeknél az izolátumoknál a  $Pz$  (foszfolipáz zóna) értékek átlaga szignifikánsan nagyobb volt ( $p < 0,01$ ), ami azt jelenti, hogy ennél a csoportnál volt a legkisebb a lipáz termelés mértéke (9. C ábra, 7. táblázat). A csoportok között nem volt szignifikáns eltérés az  $\alpha$ -hemolízis esetében, de a  $\beta$ -hemolitikus aktivitás a mikózyst okozó klinikai izolátumoknál szignifikánsan nagyobb volt ( $p < 0,01$ ) a kereskedelmi és mikózyst nem okozó izolátumokkal összehasonlítva (9. D ábra, 7. táblázat) .

**7. táblázat.** Az izolátumcsoportok statisztikai összehasonlítása foszfolipáz és aszpartát proteáz szekréció, valamint hemolitikus index tekintetében. Jelölések: C:kereskedelmi izolátumok; M: mikózist okozó izolátumok; NM: mikózist nem okozó izolátumok; n.s: a különbség nem szignifikáns.

	Szekretált enzimatikus virulencia faktorok		Hemolitikus index, 37 °C			
	Foszfolipáz szekréció, <i>Pz</i> érték, 37 °C	Aszpartát proteáz szekréció, <i>Prz</i> érték, 37 °C	$\alpha$ -hemolízis, 1. nap	$\alpha$ -hemolízis, 2. nap	$\beta$ -hemolízis, 2. nap	$\beta$ -hemolízis, 3. nap
ANOVA <i>p</i> érték	<0,0001	0,00577	0,03899	0,36651	0,91412	0,00182
kereskedelmi vs. mikózist okozó (Tukey HSD)	n.s. ( $p \geq 0,05$ )	n.s. ( $p \geq 0,05$ )	C > M ( $p < 0,05$ )	n.s. ( $p \geq 0,05$ )	n.s. ( $p \geq 0,05$ )	C < M ( $p < 0,01$ )
kereskedelmi vs. mikózist nem okozó (Tukey HSD)	C < NM ( $p < 0,01$ )	C > NM ( $p < 0,05$ )	n.s. ( $p \geq 0,05$ )	n.s. ( $p \geq 0,05$ )	n.s. ( $p \geq 0,05$ )	n.s. ( $p \geq 0,05$ )
mikózist okozó vs. mikózist nem okozó (Tukey HSD)	M < NM ( $p < 0,01$ )	n.s. ( $p \geq 0,05$ )	n.s. ( $p \geq 0,05$ )	n.s. ( $p \geq 0,05$ )	n.s. ( $p \geq 0,05$ )	M > NM ( $p < 0,01$ )



**9. ábra** Extracelluláris virulencia faktorok összehasonlítása (foszfolipáz és proteáz termelés, hemolízis): A) Az izolátumok fenotípusos klaszterezése és az eredmények “heatmap” ábrázolása. Az izolátum csoportokat színkóddal láttuk el. A hemolitikus aktivitáshoz a 2. napon ( $\alpha$ -hemolízis) és 3. napon ( $\beta$ -hemolízis) mért HI értékeket vettük figyelembe. B)-D) Box plot ábrák a virulencia faktorokról izolátumcsoportonként. B) extracelluláris proteáz; C) extracelluláris lipáz; D) hemolitikus indexek. A szignifikáns különbségeket a következőképpen jelöltük: \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,001$ .

### 5.7 Antifungális szerekekkel szembeni érzékenység

Az antifungális szerekekkel szembeni érzékenység tesztelésekor a kereskedelmi izolátumok nagyobb kaszopfungin MIC értékeket mutattak a mikózt nem okozó izolátumokhoz képest (F5. táblázat). Az MIC értékek alapján a minták két klaszterbe sorolhatóak. Az amfotericin B-nél kapott értékek 0,125–0,25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  között voltak (a nagyobb érték a PY0003 kivételével az összes izolátumra igaz volt). A flukonazol esetében az értékek 2–8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  között változtak (az izolátumok felénél az MIC érték 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  volt), míg a kaszopfunginnál kapott értékek 0,25 vagy 0,5 voltak (F5. táblázat). Nyers adatok és statisztikai analízis: Figshare doi:10.6084/m9.figshare.15145020 [Társszerzői eredmény (érzékenység tesztelése antifungális szerekre): Dr. Kovács Renátó, Orvosi Mikrobiológiai Intézet].



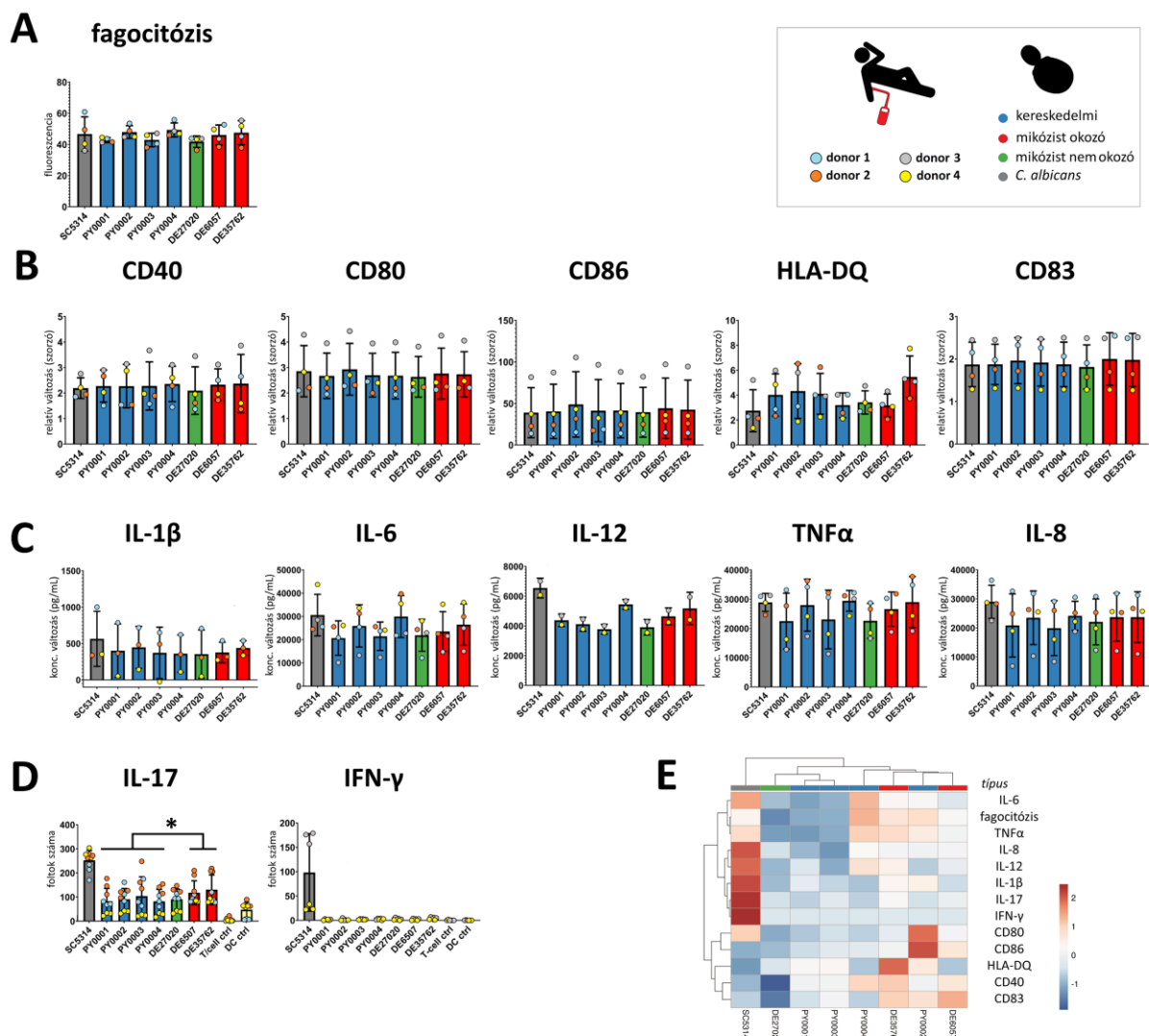
a HLA-DQ antigén prezentáló fehérje (11. B ábra). Ebben az esetben is vizsgáltuk a donorfüggő különbségeket, valamint összehasonlítottuk a kereskedelmi és mikózist okozó izolátumoknál kapott fluoreszcencia változásokat [Immunológiai Intézet munkatársaival (Dr. Pázmándi Kitti, Dr. Fekete Tünde) közösen kapott eredmények]. A HLA-DQ kivételével azt találtuk, hogy a különböző donorokból származó DC-k eltérően reagáltak az élesztőkkel történő együttinkubálásra, tehát a sejtfelszíni molekulák mennyisége nagyban függött a donortól (11. B ábra, 8. táblázat). A két izolátumcsoport összehasonlításakor nem találtunk szignifikáns különbséget egyik DC sejtfelszíni marker esetében sem. Meghatároztuk a proinflammatorikus citokinek (IL-6, IL-12, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) és az IL-8 kemokin koncentráció változásait is a sejtek felülúszójában (11. C ábra). A különböző donoroktól származó DC-k között szignifikáns eltérések voltak, azonban a kereskedelmi és mikózist okozó izolátumcsoportok összehasonlításakor nem találtunk szignifikáns eltérést (8. táblázat).

A T-sejt aktivációs és polarizációs tesztek nemcsak szignifikáns donor dependens különbségeket tártak fel, hanem azt is, hogy a mikózist okozó izolátumok szignifikánsan indukálták (kétmintás T- próba,  $p < 0,05$ ) az IL-17 termelést a kereskedelmi izolátumokkal összehasonlítva (11. D ábra, 8. táblázat). Az ELISPOT assay-kről készült fotók a Figshare-n (doi:10.6084/m9.figshare.15145020) találhatóak meg. [Társszerzői eredmények (citokinek és T-sejt aktiváció vizsgálata): Dr. Pázmándi Kitti, Dr. Fekete Tünde, Immunológiai Intézet].

Az immunológiai vizsgálatok alapján a fenotípusos klaszterezés egyértelműen megkülönböztette a kontroll *C. albicans*-t a *S. 'boulardii'* izolátumoktól, utóbbit pedig két klaszterre bontotta. A magasabb immun aktivációt kiváltó klaszterbe két kereskedelmi és a két mikózist okozó izolátum tartozott (11. E ábra).

**8. táblázat** Az izolátumcsoportok és donorok statisztikai összehasonlítása a DC és T-sejt aktivációs, valamint a DC fagocitózis vizsgálatoknál. Jelölések: D: donor; n.s.: a különbség nem volt szignifikáns.

Statisztikai próba	Fagocitózis	CD40	CD80	CD86	CD83	HLA- DQ	IL-6	IL-8	TNF $\alpha$	IL-12	IL-1 $\beta$	IL-17	IFN- $\gamma$	
ANOVA/T-teszt <i>p</i> -érték	0,10721	<0,00010	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,54060	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,07714 (T-teszt)	<0,0001	<0,0001	0,00026 (T-test)	
Donorok összehasonlítása	n.s.	D1 < D3 ( <i>p</i> < 0,01)	D1 < D3 ( <i>p</i> < 0,01)	D1 < D2 ( <i>p</i> < 0,01)	D1 > D2		D1 > D3	D1 > D2 ( <i>p</i> < 0,05)	D1 > D3 ( <i>p</i> < 0,01)		D1 > D2 ( <i>p</i> < 0,01)	D1 < D2 ( <i>p</i> < 0,01)	D3 > D4 (T-test)	
		D2 < D3 ( <i>p</i> < 0,01)	D1 < D4 ( <i>p</i> < 0,01)	D1 < D3 ( <i>p</i> < 0,01)	D1 < D3 ( <i>p</i> < 0,0)		D2 > D3 ( <i>p</i> < 0,0)	D1 > D3 ( <i>p</i> < 0,01)	D1 > D4 ( <i>p</i> < 0,01)		D1 > D4 ( <i>p</i> < 0,01)	D1 > D4 ( <i>p</i> < 0,01)		
		D3 > D4 ( <i>p</i> < 0,01)	D2 < D3 ( <i>p</i> < 0,01)	D1 < D4 ( <i>p</i> < 0,01)	D1 > D4		D3 < D4	D1 > D4 ( <i>p</i> < 0,01)	D2 > D3 ( <i>p</i> < 0,01)		D2 > D4 ( <i>p</i> < 0,01)	D2 > D4 ( <i>p</i> < 0,01)		
			D2 < D4 ( <i>p</i> < 0,01)	D2 < D3 ( <i>p</i> < 0,01)	D2 < D3		n.s.		D2 > D3 ( <i>p</i> < 0,01)	D2 > D4 ( <i>p</i> < 0,01)		n.s. (T-teszt)		
				D3 > D4 ( <i>p</i> < 0,01)	D2 < D4 ( <i>p</i> < 0,01)	D2 > D4 ( <i>p</i> < 0,0)			D3 < D4 ( <i>p</i> < 0,01)					
						D3 > D4 ( <i>p</i> < 0,01)	D3 > D4							
kereskedelmi vs. mikóizist okozó	T-teszt	0,64298	0,87434	1,0000	0,98422	0,70758	0,56780	0,88993	0,65003	0,54811	0,31408	0,89588	0,03792* (C < M)	0,11320

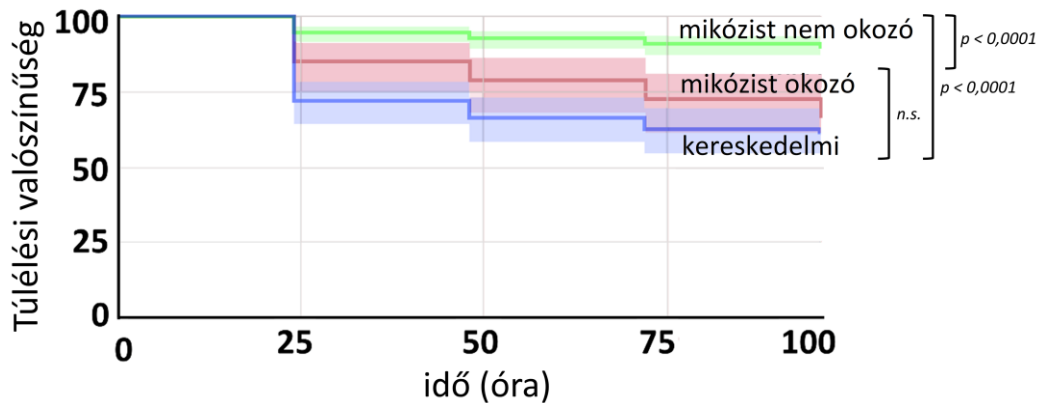


**11. ábra** Immunológiai interakciók. A) A moDC-k fagocitózis aktivitása a különböző élesztő izolátumok esetén. A moDC-k fagocitózis aktivitását (fluoreszcencia) az élesztővel nem fertőzött és 4 °C-os kontrollal korrigáltuk mindegyik donor esetén. B) Mennyiségi változások az moDC markerekben. A CD83 marker esetén a CD83 pozitív sejtek arányának növekedése került feltüntetésre. C) Citokin/kemokin termelés. A koncentráció változását (pg/mL) ábrázoltuk mindegyik citokin/kemokin esetében. D) T-sejt aktiválás a moDC-k által. Az ELISPOT assay segítségével leolvasott foltok számát ábrázoltuk. A)-D) Az oszlopdigrammok oszlopai az átlagokat mutatják, a hibasávok pedig a szórást. Az adatpontok eltérő színei a különböző donorokat jelentik, az oszlopok színei pedig az egyes izolátumcsoportokat jelentik. E) Az izolátumok fenotípusos klaszterezése az immunológiai kölcsönhatások alapján. A klaszterezéshez a donoronkénti átlagokat használtuk fel.

### 5.10 *G. mellonella* lárva infekciók

A *G. mellonella* lárvamodellt használva összehasonlítottuk a 14 probiotikum izolátum, és az izolátumcsoportok (kereskedelmi, mikózist nem okozó, mikózist okozó) patogenitását a PBS és patogén *C. albicans* kontrollokkal. A mikózist nem okozó izolátumok szignifikánsan alacsonyabb patogenitást mutattak, mint a mikózist okozó vagy a kereskedelmi izolátumok (12. ábra). Ezen csoporton belül az izolátumok között két esetben volt statisztikailag jelentős különbség. Minkét ilyen eset során az egyik szignifikánsan eltérő izolátum a mikózist nem okozó 2251/2018 volt, melynél

nagyon jelentős volt a lárvatúlélés (Nyers adatok és statisztikai analízis: Figshare doi:10.6084/m9.figshare.15145020).



**12. ábra** A kereskedelmi, mikózt nem okozó és mikózt okozó izolátumokkal beoltott *Galleria* lárvák túlélési görbéi. A csoportok közötti különbségek szignifikancia értékeit az ábra jobb oldalán jelöltük a Kaplan-Meier analízis alapján, n.s. azt jelenti, hogy a különbség nem volt statisztikailag szignifikáns. A beszínezett sávok a 95%-os log konfidencia intervallumot mutatják.

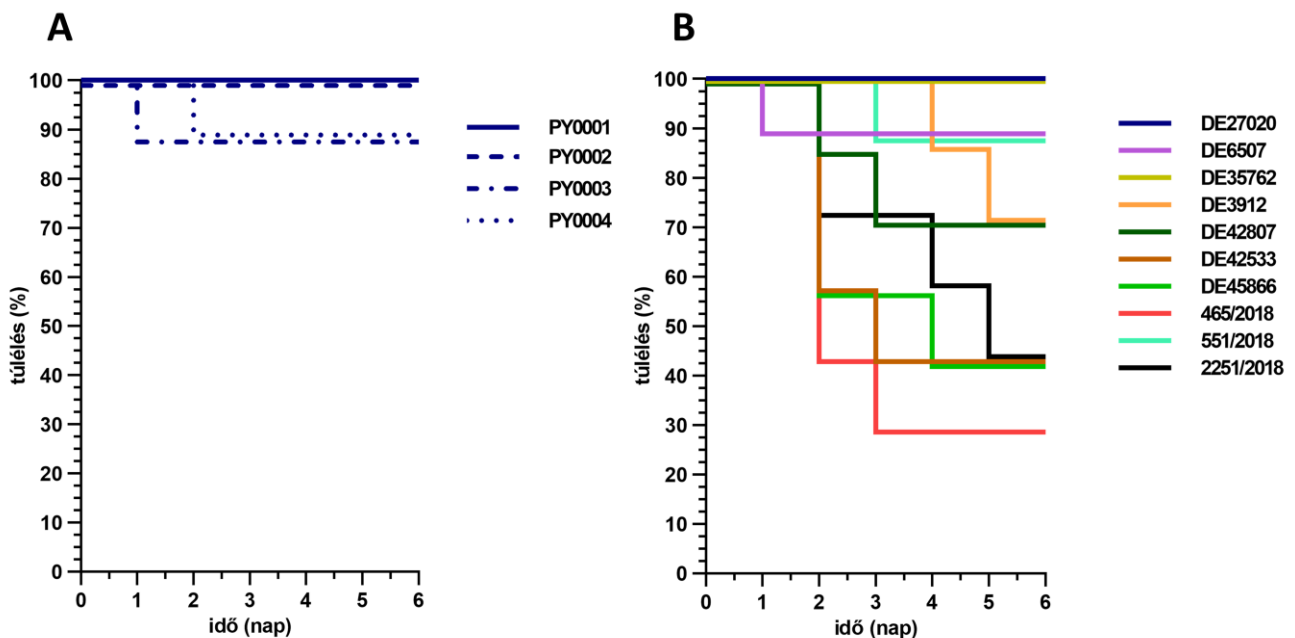
### 5.11 Virulencia és túlélés immunszuppresszált BALB/c egérmodellben

Az egérkísérleteknél a kereskedelmi izolátumok között nem volt szignifikáns a különbség ( $p > 0,05$ ) (13. ábra, 9. táblázat), a klinikai izolátumokat egymással összehasonlítva viszont szignifikáns különbségeket találtunk ( $p < 0,01$ ; 13. ábra, 9. táblázat). Egyes izolátumok kifejezetten magas virulenciával rendelkeztek: 465/2018 (28% túlélés), DE45866, DE42533, 2251/2018 (42% túlélés).

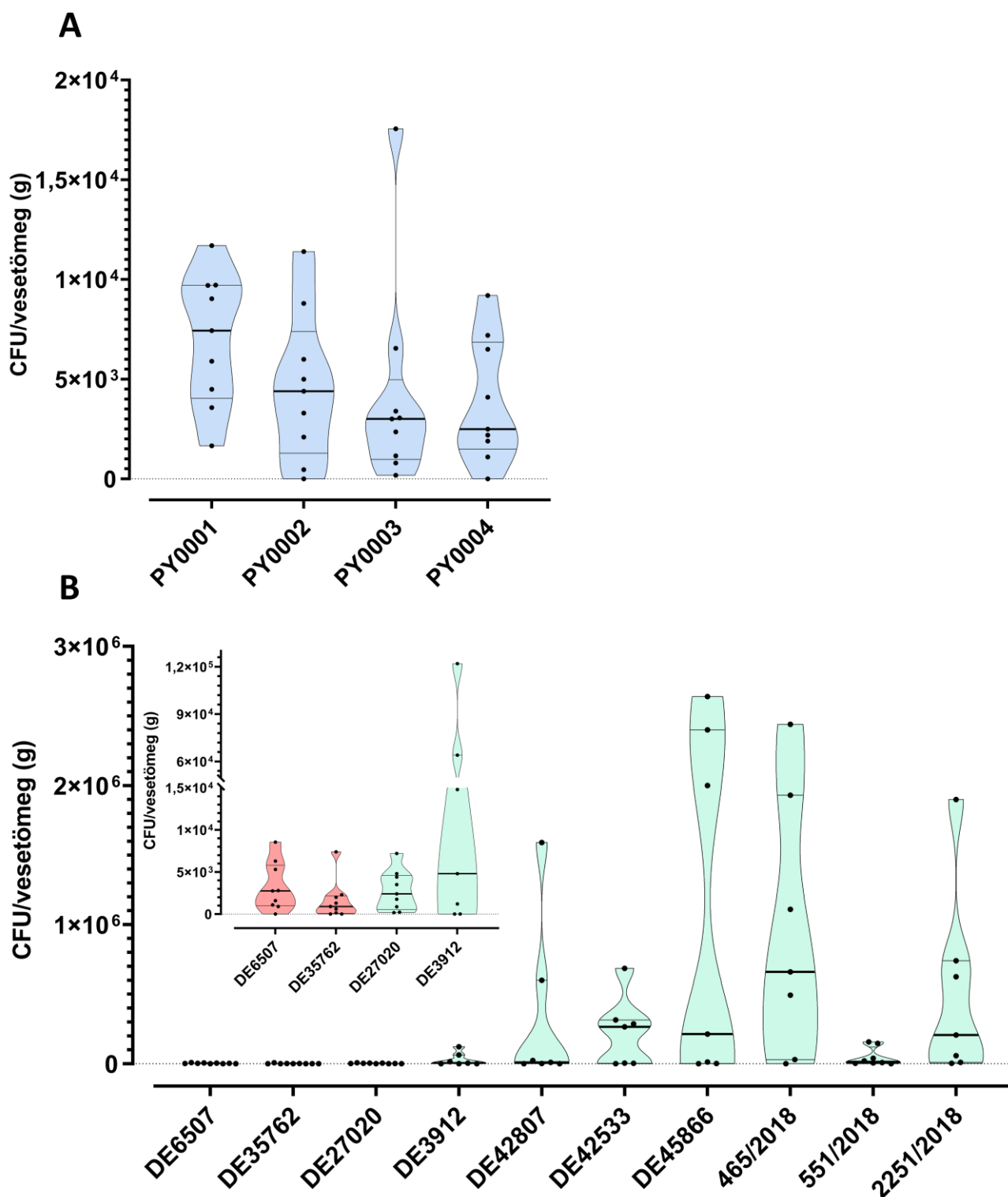
A vesék gombaterhelése nem különbözött szignifikánsan a kereskedelmi izolátumok esetében ( $p > 0,05$ ), a klinikai izolátumok közül viszont a DE27020, DE6507 és a DE35762 izolátumok esetében a CFU értékek szignifikánsan [ $p < 0,01$  (DE27020);  $p < 0,01$  (DE6507);  $p < 0,01$  (DE35762)] alacsonyabbak voltak, mint a 2251/2018 izolátum esetében (14. ábra, 9. táblázat). A kereskedelmi és klinikai törzsek nem különböztek statisztikailag szignifikánsan egymástól, azonban az egyes izolátumcsoportok már igen. A mikózt nem okozó izolátumok esetében szignifikánsan [ $p < 0,01$  (C);  $p < 0,001$  (M)] nagyobb CFU értékek voltak megfigyelhetőek a kereskedelmi és mikózt okozó izolátumokhoz képest (14. ábra, 9. táblázat) [Társszerzői eredmény (egérfertőzések): Dr. Kovács Renátó, Orvosi Mikrobiológiai Intézet].

**9. táblázat** A felhasznált 14 probiotikum izolátum virulenciájának és a vesék gombaterhelésének statisztikai elemzése. A Kruskal-Wallis teszt esetében Bonferroni korrekciót alkalmaztunk, így az  $^1\alpha = 0,005$  és  $^2\alpha = 0,01667$  küszöbértékeket alkalmaztuk (ábrán index számokkal jelölve), a szignifikáns eredményeket csillaggal (\*) jelöltük. C: kereskedelmi izolátumok; M: mikózist okozó izolátumok; NM: mikózist nem okozó izolátumok.

Egértúlélés		Vesék gombaterhelése			
Log-rank (Mantel-Cox) teszt		Páronkénti összehasonlítások (Kruskal-Wallis teszt)		Csoport szintű összehasonlítások	
kereskedelmi izolátumok	klinikai izolátumok	kereskedelmi izolátumok	klinikai izolátumok	C vs. M vs. NM (Kruskal-Wallis teszt)	kereskedelmi vs. klinikai (Mann Whitney teszt)
0,5283	**0,0026	0,145206	<sup>1</sup> *0,001161	<sup>2</sup> *0,00009186	0,145708
			<sup>1</sup> *0,003604 (DE27020 < 2251/2018)	<sup>2</sup> *0,006384 (C > M)	
<i>p</i> -értékek			<sup>1</sup> *0,002555 (DE6507 < 2251/2018)	<sup>2</sup> *0,005217 (C < NM)	
			<sup>1</sup> *0,001234 (DE35762 < 2251/2018)	<sup>2</sup> *0,000319 (M < NM)	



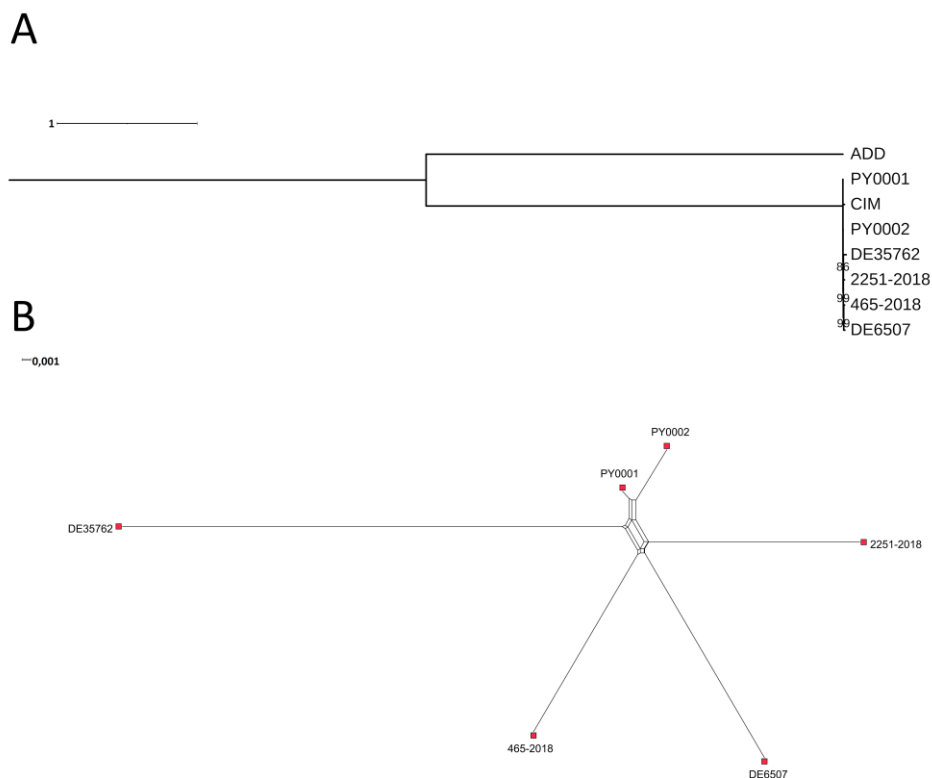
**13. ábra** A *S. 'boulardii'* izolátumok virulenciája immunszuppresszált BALB/c egérmodellben. A) kereskedelmi izolátumok; B) klinikai izolátumok



**14. ábra** A vesék gombaterhelése a *S. 'boulardii'* kereskedelmi, mikóizist okozó és mikóizist nem okozó izolátumok esetében. A) kereskedelmi izolátumok (kék); B) klinikai izolátumok [mikóizist okozó vérizolátumok (piros), mikóizist nem okozó izolátumok (zöld)]. A vékony vízszintes vonalak a kvartiliseket, a vastag vízszintes vonalak az adatok mediánját jelentik.

## 5.12 A génkiütéses kísérletekben vizsgált probiotikus élesztők genomi háttérének összehasonlítása

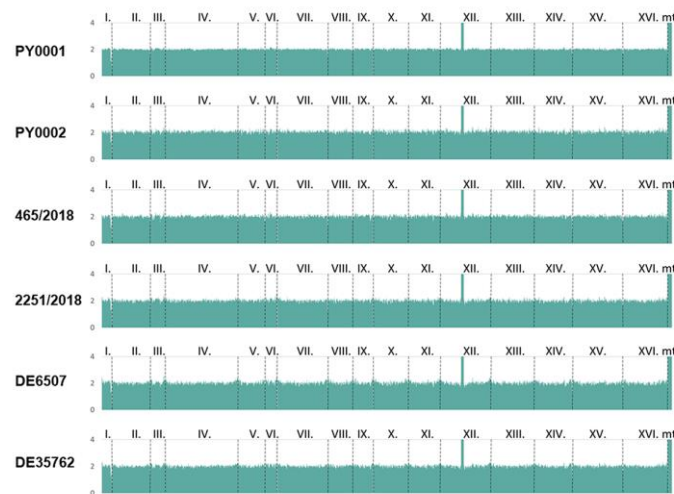
A filogenomikai dendrogram és SNP-hálózat egyaránt megmutatta, hogy a *S. 'boulardii'* izolátumok nagymértékben hasonlóak egymáshoz, valamint Peter és mtsai. [4] *S. 'boulardii'* CIM törzséhez (15. ábra). Az izolátumok a PY0001 referenciához képest nagyjából 3000 variáns pozíciót tartalmaznak a több mint 11 millió bp-t kitevő genomban, melyek nagy része heterozigóta SNP volt. Megjegyzendő, hogy a PY0001 rövid olvasatainak elemzése is mutatott ki SNP-eket a PY0001 referenciára való térképezéskor, ezek gyakorlatilag minden esetben heterozigóta pozíciók voltak (melyek a haploid genomösszeillesztés használata miatt SNP-kként jelentkeztek a valójában diploid élesztő térképezése után). A két kereskedelmi izolátum mutatkozott a leghasonlóbbnak az izolátumok közül (15. B ábra) [Társszerzői eredmény (Maximum Likelihood filogénia): Dr. Pfliegler Valter Péter, Molekuláris Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszék].



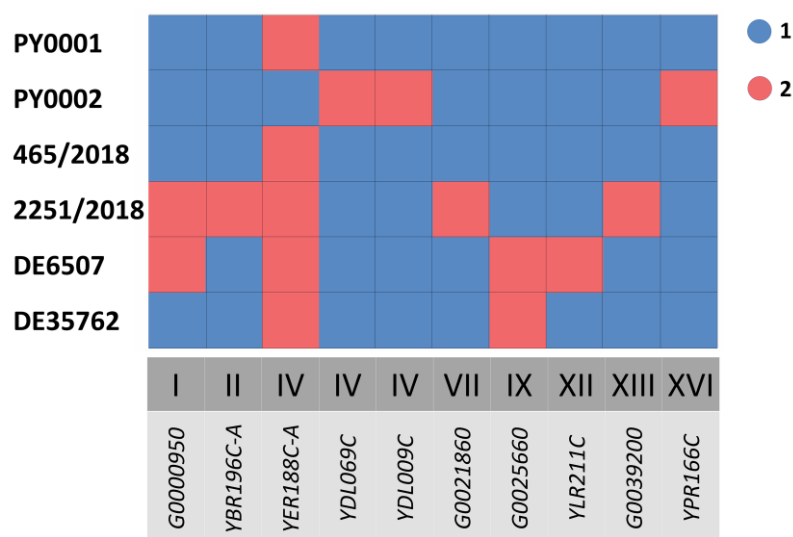
**15. ábra** A szekvenált genomok rokonsági viszonyai. A) A teljes genomon alapított Maximum Likelihood dendrogram. Az egyes elágazások 80%-nál magasabb bootstrap megközelítés általi támogatottsága feltüntetésre került. B) A teljes genom SNP-ire épített hálózat, mely a heterozigóta pozíciókat is figyelembe veszi (a két haplotípus korrigálatlan P távolságának átlagolása által).

A térképezési fájllokból létrehozott lefedettség ábrák, illetve a kromoszómákra ábrázolt allélarányok alapján megállapítottuk, hogy mind a hat izolátum diploid, euploid genommal rendelkezik, és nem mutatnak szegmentális duplikációkat vagy nagy deléciókat (16. ábra). Az egyes PY0001 referenciában megtalálható gének, illetve a környezetükben megtalálható gének medián

lefedettsége alapján meghatároztuk mind a 6 izolátumban a gének kópiaszámát. Mindössze 10 génben találtunk kópiaszám-eltéréseket (1 vagy 2 kópia haploid genomonként), melyek nyolc különböző kromoszómán helyezkedtek el, és izolátumonként 1–5 ilyen gén volt jelen a genomban (17. ábra). A CNV-ben érintett gének közül hét kétséges ORF, illetve nem jellemzett gén volt. Emellett a *YDL069C* (*CBS*; mitokondriális légzési lánc III. komplex összeszerelése), a *YLR211C* (*ATG38*; makroautofágiával kapcsolatos gén) és a *YPR166C* (*MRP2*; mitokondriális transzlációban szerepet játszó) géneknél voltak kópiaszámbeli különbségek (17. ábra). A *HMX1* egykópiás gén volt (haploid genomra nézve) mindegyik élesztőben.

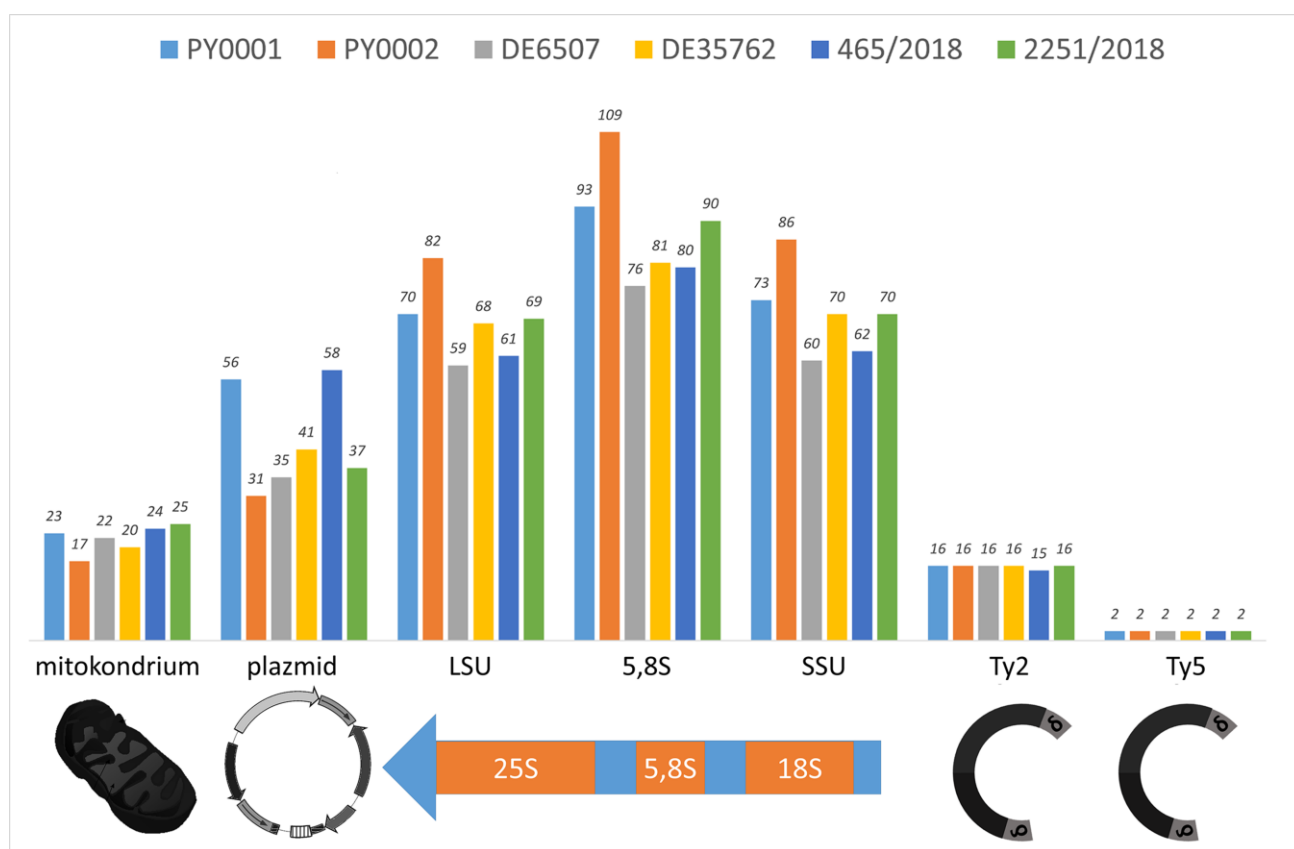


**16. ábra** Az egyes szekvenált izolátumok lefedettségi adatai 10 000 bp-os, 5000 bp-onként csúszó ablakokkal. Megfigyelhető mind a 16 kromoszóma esetén a diszómia, valamint látható a riboszomális DNS repeat-ek által okozott csúcs a XII. kromoszómán. A mitokondrium lefedettsége a magas kópiaszám miatt magasabb. Az x tengelyen a kromoszómák, az y tengelyen a lefedettségéből számított kópiaszám látható.



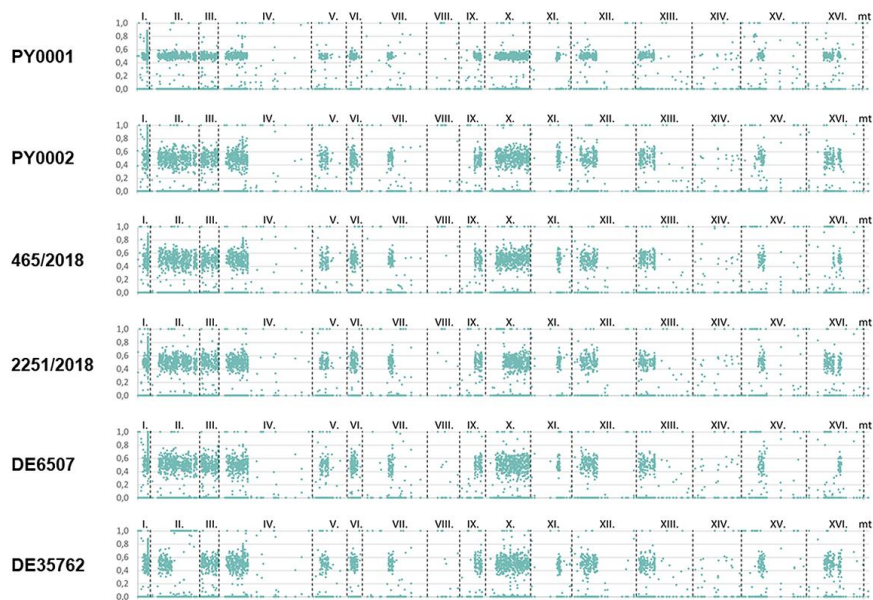
**17. ábra** Az izolátumok között megfigyelt gének kópiaszámbeli különbségei. Kópiaszám-eltérést mindössze 10 génben, 8 különböző kromoszómán azonosítottunk a lefedettségi adatok alapján, a kópiaszámok 1 és 2 között variáltak haploid genomra vonatkoztatva.

Peter és mtsai. [4] munkája alapján a teljes pángenom ORF-gyűjteményre való térképezésből megállapítottuk a sejtenként, haploid genomra kalkulált mitokondrium, 2 $\mu$  plazmid, rDNS és transzpozon kópiaszámot. Az izolátumokban 17–25 mitokondriális genom jelenlétét kalkuláltuk haploid genomonként, a plazmidszám nagyobb skálán, 31 db és 58 db között változott. Az rDNS kópiái a legtöbb esetben 60–90 közé estek. A Ty2 retrotranszpozonokból 15–16 kópiát állapítottunk meg, a Ty5-ből egységesen 2-t minden izolátumban (18. ábra). A 6 izolátum tehát a gének és egyéb jellemzők kópiaszámát tekintve is nagyfokú hasonlóságot mutatott.



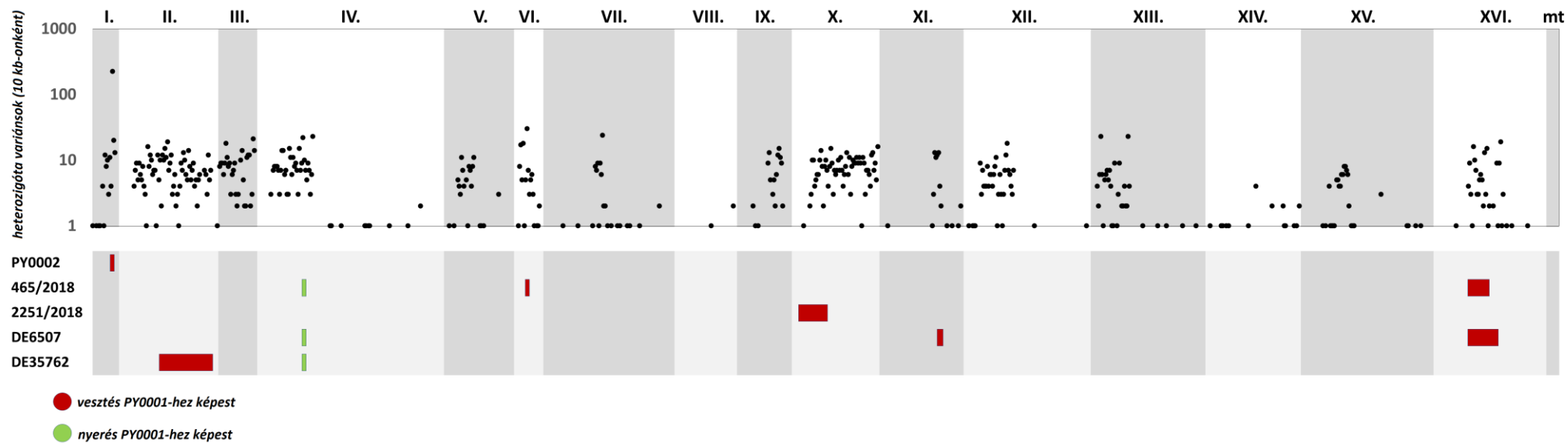
**18. ábra** A szekvenált izolátumok között tapasztalt haploid genomra vonatkoztatott mitokondrium, 2 $\mu$  plazmid, valamint rDNS-elem és a retrotranszpozon kópiaszám eltérések.

A variánsanalízis során meghatározott allélek AD értékei, valamint a szoftver által identifikált genotípusok alapján ábrázoltuk az allél lefedettségi arányok változásait a kromoszómákon (19. ábra). Valamennyi esetben a heterozigóta pozíciók csoportosulása volt megfigyelhető elsősorban a I–VI kromoszómákon, illetve a X, XII, XIII. kromoszómán. A VIII. és XIV. kromoszómák viszont gyakorlatilag teljesen homozigóták voltak.



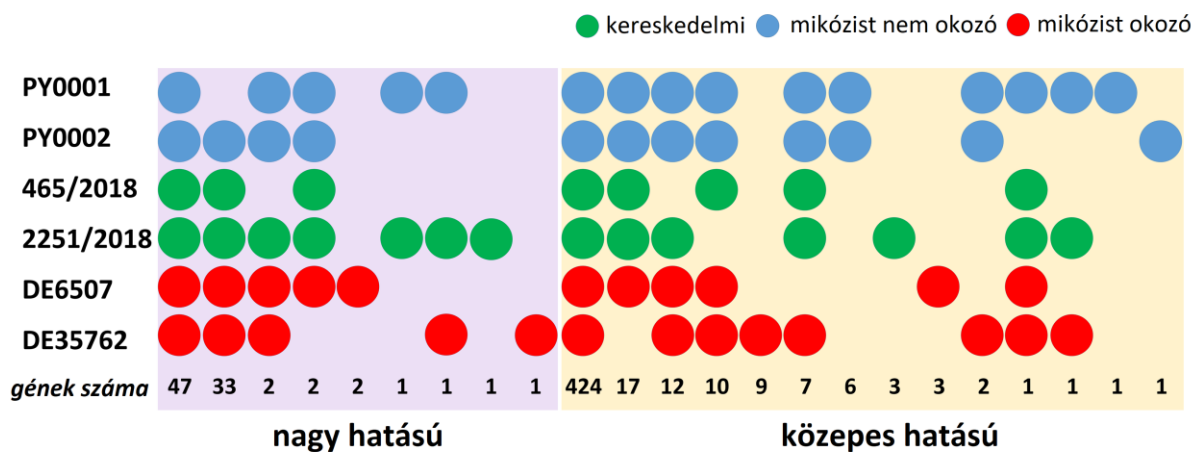
**19. ábra** A szekvenált izolátumok egyes kromoszómaszakaszain (x tengely) identifikált variánsok (INDEL és SNP variánsok) AD értékeinek aránya (y tengely). Az egyes pontok a különálló variánsok AD arányait mutatják. Jelentős eltérés figyelhető meg az egyes kromoszómák heterozigóta variánsainak számában.

A genotípus értékek alapján meghatároztuk, hogy hol vannak a PY0001 izolátumhoz képest olyan helyek az 5 másik törzs genomjában, melyek hosszabb LOH vagy GOH eseményekre utalnak. A megszekvenált és összeállított PY0001 izolátum heterozigóta pozíciói nagyrészt az I-VI (a IV. kromoszóma esetében csak a kromoszóma bal karján), X, XII és XIII kromoszómán csoportosultak (20. ábra). Összességében nézve a kromoszómákon csekély volt a heterozigóta pozíciók aránya és nagyméretű homozigóta régiók voltak alapvetően jellemzőek a genomra (például a VIII és XIV kromoszómák majdnem teljesen homozigóták voltak). A többi 5 izolátum mindegyikénél találtunk GOH, illetve LOH régiókat 7 különböző kromoszómán (20. ábra). A PY0002 esetében ez mindössze egy rövid régiót jelentett, a többi négy, klinikai izolátumnál ennél jelentősen több, illetve hosszabb allélarány-változásokat találtunk (20. ábra). Összességében a heterozigótaságra vonatkozó eredmények különböztek a 6 izolátum között [Társszerzői eredmény (allélarány-változások vizsgálata): Dr. Pfliegler Valter Péter, Molekuláris Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszék].



**20. ábra** Heterozigóta variánsok sűrűsége a kromoszómákon (10 kb-onként) a PY0001 izolátum esetében (fent) és az allélarányok változásai, azaz a heterozigóta régiók nyerése és elvesztése a másik öt izolátumban (alul).

Végül mind a hat szekvenált törzs esetén meghatároztuk, hogy mely variánsok okoznak a proteinkódoló génekben jelentős változásokat (pl. korai stop kodon, stop kodon elvesztése, leolvasási keret eltolódása) homo- vagy heterozigóta formában. A nagy hatású mutációk összesen 90 gént érintettek, az összes izolátumot figyelembe véve (21. ábra, F6. táblázat). A PY0001-ben az érintett gének azok voltak, amelyek heterozigóta mutációkat tartalmaztak (megjegyzendő, hogy a térképezéshez használt referenciagenom a PY0001 sajátja volt, ezért ennél az élesztőgenomnál csak heterozigóta variánsok várhatók). Ebből a 90 génből 43 nem volt érintett mind a hat izolátumban egyszerre (21. ábra, F6. táblázat), és így a genetikai háttér különbségeit mutatja. Ezek közül összesen 30-hoz rendelhető jól körülhatárolt funkció az S288c referencia szekvenciával való homológia alapján. Az érintett gének közül a *GLT1* és az *SLX5* kölcsönhatásba lépnek a *HMX1*-gyel az *Saccharomyces* Genome Database (SGD) alapján. Az előbbi génben a mutáció minden izolátumban heterozigóta formában volt, míg az *SLX5* nem volt érintett a PY0001-ben, és homozigóta volt a másik öt genomban (10. táblázat).



**21. ábra** A nagy és közepes hatású mutációk által érintett fehérjekódoló gének eloszlása. Az izolátumokban érintett gének teljes száma az ábra alsó részén látható, minden genomot az izolátum típusának megfelelő (kereskedelmi, mikózist nem okozó, mikózist okozó) színezett kör jelöl.

A génfunkciót befolyásoló mutációs hatások elemzésekor 497 gént azonosítottunk (ebből 30 kétes ORF volt), melyek mérsékelt mutációkat (pl. egyetlen aminosav szubsztitúció) tartalmaztak (F7. táblázat). A nagy hatású mutációkhoz hasonlóan az azonosított variánsok többsége minden izolátumban megtalálható volt (a PY0001 esetében kizárólag heterozigóta, a többi izolátumnál pedig leggyakrabban heterozigóta formában). Összesen 73 olyan gén volt, ami csak egyes, de nem minden izolátumban volt érintve (F7. táblázat). A közepes hatású mutációkkal rendelkező gének közé tartozik a *CHK1*, *ESS1*, *GLT1*, *IME1*, *KCH1*, *LGE1*, *MXR1*, *PPR1*, *SPB4* és *CST6*, melyek kölcsönhatásba lépnek a *HMX1*-gyel az SGD alapján. A közepes hatású mutációkat tartalmazó gének heterozigóta formában voltak meg az izolátumok többségében, de a DE35762 homozigóta volt a *CHK1*, a DE6507 pedig az *LGE1* mutációra (10. táblázat). A *HMX1*-et és annak közvetlen upstream régióját nem

befolyásolta semmilyen módosító, közepes vagy nagy hatású mutáció a variáns annotáció szerint egyik izolátumban sem.

A *HMX1*-el kölcsönhatásban lévő, nagy, vagy közepes mutációk által érintett 11 gén esetében a GO Term analízis a sejtmagban található fehérjék feldúsulását ( $p < 0,05$ ) mutatta ki. Ezen felül a *HMX1*-gyel kölcsönhatásba lépő géneket nem érintik szignifikánsan nagyobb vagy kevesebb eséllyel mutációk, mint a vele nem kölcsönhatásban lévő géneket (Fischer-egzakt teszt,  $p > 0,05$ ).

**10. táblázat** A *HMX1*-gyel kölcsönhatásban lévő gének mutációinak listája. Az egyes kölcsönhatásba lépő génekben lévő mutációk mind a hat vizsgált genomra. A heterozigóta géneket „het. z.”-vel, a homozigóta géneket „homoz.”-vel jelöltük.

Másodlagos azonosító	Gén név	Leírás	Interakció típusa	Mutáció hatása	Pozíció a kromoszómán	Mutáció típusa	PY0001	PY0002	465/2018	2251/2018	DE6507	DE35762	
<i>YBR274W</i>	<i>CHK1</i>	szerin/treonin kináz és DNS károsodás ellenőrzőpont effektor	genetikai	közepes	729 433	misszensz	het. z.	het. z.	het. z.	het. z.	het. z.	homoz.	
<i>YJR017C</i>	<i>ESS1</i>	peptidilprolil-cisz/transz-izomeráz (PPIáz)	genetikai	közepes	471 176	misszensz	het. z.	het. z.	het. z.	het. z.	het. z.	het. z.	
				közepes	471 227	misszensz	het. z.	het. z.	het. z.	het. z.	het. z.	het. z.	het. z.
<i>YDL171C</i>	<i>GLT1</i>	NAD <sup>+</sup> -függő glutamát szintáz (GOGAT)	genetikai	nagy	156 574	kereteltolódás	het. z.	het. z.	het. z.	het. z.	het. z.	het. z.	
				nagy	156 577	kereteltolódás	het. z.	het. z.	het. z.	het. z.	het. z.	het. z.	het. z.
				közepes	160 753	misszensz	het. z.	het. z.	het. z.	het. z.	het. z.	het. z.	het. z.
<i>YJR094C</i>	<i>IME1</i>	a meiózis fő szabályozója, amely csak a meiotikus események során aktív	genetikai	közepes	597 121	misszensz	het. z.	het. z.	het. z.	het. z.	het. z.	het. z.	
				közepes	597 137	misszensz	het. z.	het. z.	het. z.	het. z.	het. z.	het. z.	het. z.
				közepes	597 835	misszensz	het. z.	het. z.	het. z.	het. z.	het. z.	het. z.	het. z.
<i>YJR054W</i>	<i>KCH1</i>	Kálium transzporter (K <sup>+</sup> beáramlás)	genetikai	közepes	529 412	misszensz	het. z.	het. z.	het. z.	het. z.	het. z.	het. z.	
				közepes	530 009	misszensz	het. z.	het. z.	het. z.	het. z.	het. z.	het. z.	het. z.
				közepes	530 230	misszensz	het. z.	het. z.	het. z.	het. z.	het. z.	het. z.	het. z.
<i>YPL055C</i>	<i>LGE1</i>	hiszton H2B ubikvitinációjában részt vevő fehérje	genetikai	közepes	441 438	misszensz	het. z.	het. z.	het. z.	het. z.	homoz.	het. z.	
				közepes	441 813	misszensz	het. z.	het. z.	het. z.	het. z.	het. z.	homoz.	het. z.
<i>YER042W</i>	<i>MXR1</i>	metionin-S-szulfoxid reduktáz	genetikai	közepes	231 971	misszensz	het. z.	het. z.	het. z.	het. z.	het. z.	het. z.	
<i>YLR014C</i>	<i>PPR1</i>	cink-ujj transzkripciósfaktor	genetikai	közepes	158 716	misszensz	het. z.	het. z.	het. z.	het. z.	het. z.	het. z.	
<i>YDL013W</i>	<i>SLX5</i>	az Slx5-Slx8 SUMO-targetált Ub ligáz (STUBL) komplex alegysége	genetikai	nagy	436 686	kereteltolódás	hiányzik	homoz.	homoz.	homoz.	homoz.	homoz.	

<i>YFL002C</i>	<i>SPB4</i>	feltételezett ATP-függő RNS helikáz	genetikai	közepes	121 701	misszensz	het. z.	het. z.	het. z.	het. z.	het. z.	het. z.
				közepes	122 057	misszensz	het. z.	het. z.	het. z.	het. z.	het. z.	het. z.
<i>YIL036W</i>	<i>CST6</i>	alapvető leucin cipzár (bZIP) transzkripció faktor az ATF/CREB családból, részt vesz a stressz-válasz szabályozó hálózatban	transzkripció regulátor	közepes	264 026	misszensz	het. z.	het. z.	het. z.	het. z.	het. z.	het. z.
				közepes	264 770	misszensz	het. z.	het. z.	het. z.	het. z.	het. z.	het. z.
				közepes	264 849	misszensz	het. z.	het. z.	het. z.	het. z.	het. z.	het. z.

### 5.13 A *HMXI* sikeres, CRISPR/Cas9-rendszeren alapuló deléciója

Az Anyagok és Módszerek fejezetben ismertetett előkészületek és transzformálás után telepeket izoláltunk a kísérletbe bevont, transzformált élesztőkből, majd a *HMXI* géndeléción sikerességét PCR-rel ellenőriztük, mely során egyrészt a teljes ORF amplifikálását elvégeztük (a géndeléción tényének igazolására) (F5. A ábra), másrészt a "repair" DNS kazetta (rDNS) helyes beépülését is igazoltuk, egy kazettára specifikus primer használatával (F5. B ábra). Gélelektroforézissel igazoltuk, hogy a *HMXI* gén csak a vad típusú izolátumokban található meg, amit egy 1553 bp méretű sáv jelzett. A deléciós mutánsok esetében egy sokkal rövidebb, 682 bp hosszú sáv volt látható (F5. A ábra). Ennek az az oka, hogy az ellenőrzéshez használt primerek a *HMXI* ORF-től "upstream" és „downstream” helyezkednek el, így a deléciós törzseknél is lesz PCR termék, viszont a gélelektroforézisnél kapott sáv rövidebb mérete jelzi a géndeléción sikerességét. A rDNS beépülésének ellenőrzésére olyan primereket használtunk, melyek a kazetta "upstream" régióját amplifikálták (a "forward" primer az inzerációs kazettától -417 bp távolságra, a "reverse" primer pedig a kazettához kötődött). Ennek a primerpárnak az alkalmazásakor a vad típusú izolátumok esetében nem jelent meg sáv a gélen, szemben a deléciós törzsekkel, amiknél egy 437 bp méretű sáv volt látható (F5. B ábra). Tehát, a gélelektroforézis igazolta, hogy a gén kiütése mind a hat izolátumban sikeres volt.

### 5.14 A *HMXI* deléciója csökkentette a *S. 'boulardii'* izolátumok szaporodási képességét vashiányos körülmények között

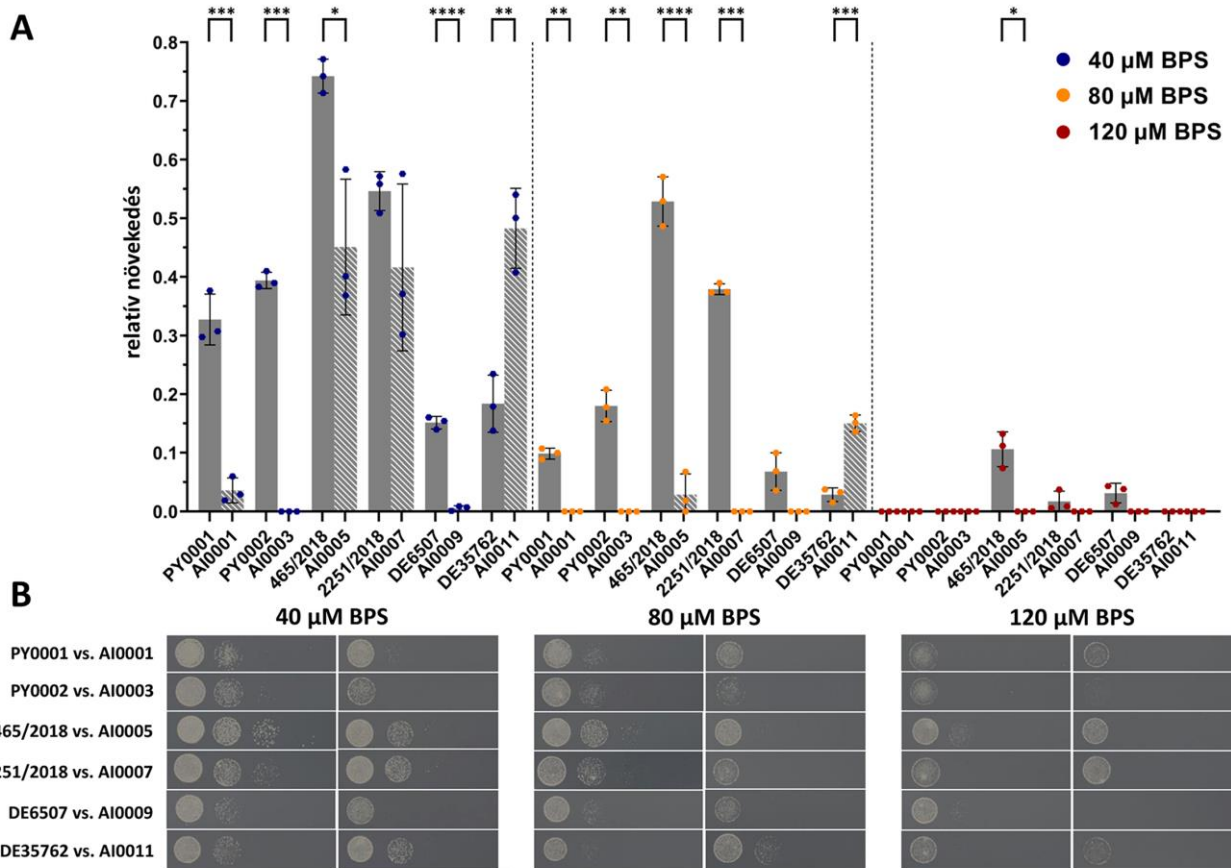
Korábbi tanulmányok kimutatták, hogy a *HMXI* deléciója zavart okoz a *S. cerevisiae* vasmetabolizmusában [226,227], emiatt vaséhezés esetén a sejtek nem képesek a sejten belüli hem tartalmú molekulákat vasforrásként használni [227]. Ezért megvizsgáltuk a deléciós mutánsok szaporodását vaséhezés közben. Az alább ismertetett eredmények a "spot-plate" második,  $5 \times 10^3$  db sejtet tartalmazó telepeire vonatkoznak.

40  $\mu$ M BPS alkalmazásakor a legtöbb mutáns törzs telepei (AI0001, AI0003, AI0005 és AI0009) szignifikánsan ( $p < 0,001$ ;  $p < 0,001$ ;  $p < 0,05$  és  $p < 0,001$ ; ebben a sorrendben) kisebbek voltak a vad típusú izolátumokkal összehasonlítva (22. A, B ábra). Az AI0007 törzs telepei szintén kisebbek voltak, mint a 2251/2018 izolátumé, azonban ez a különbség nem volt szignifikáns ( $p > 0,05$ ) (22. A, B ábra). Érdekes módon az AI0011 deléciós mutáns szaporodása szignifikánsan nagyobb volt, mint a DE35762 vad típusú izolátumé, amiből származott (22. A, B ábra). A mutáns törzsek közül az AI0001, AI0003, AI0005 és AI0007 szaporodása szignifikánsan ( $p < 0,01$ ;  $p < 0,01$ ;  $p < 0,001$ ;  $p < 0,001$ ) gyengébb volt a vad típusú izolátumokhoz képest 80  $\mu$ M BPS hozzáadása esetén. A telepek növekedésbeli különbsége nem volt szignifiáns ( $p > 0,05$ ) a DE6507 és AI0009 törzsek között, de utóbbi növekedése gyengébb volt (22. A, B ábra). Az előző körülményekhez hasonlóan az AI0011 szaporodása jelentősen ( $p < 0,001$ ) nagyobb volt az eredeti törzsszel (DE35762)

összehasonlítva. 120  $\mu\text{M}$  BPS alkalmazásakor a legtöbb törzs nem szaporodott, vagy szaporodásuk elhanyagolható volt (22. A, B ábra). A 465/2018 izolátum kivétel volt, mivel szaporodóképes volt (22. B ábra). Az ebből az izolátumból származó *HMX1* deléciós mutáns (AI0005) nem volt képes szaporodni, így a telepek növekedése szignifikánsan különbözött ( $p < 0,05$ ) a 465/2018 izolátumétól (22. A, B ábra). Az eredmények alapján a vaséhezés a deléciós törzsek többségénél gyengébb szaporodással társult. Az AI0011 törzs esetében ez nem volt igaz, mivel szaporodási képessége szignifikánsan nagyobb volt, mint a vad típusú DE35762 izolátumé. Ennek oka feltételezhetően az eltérő genetikai háttér lehet.

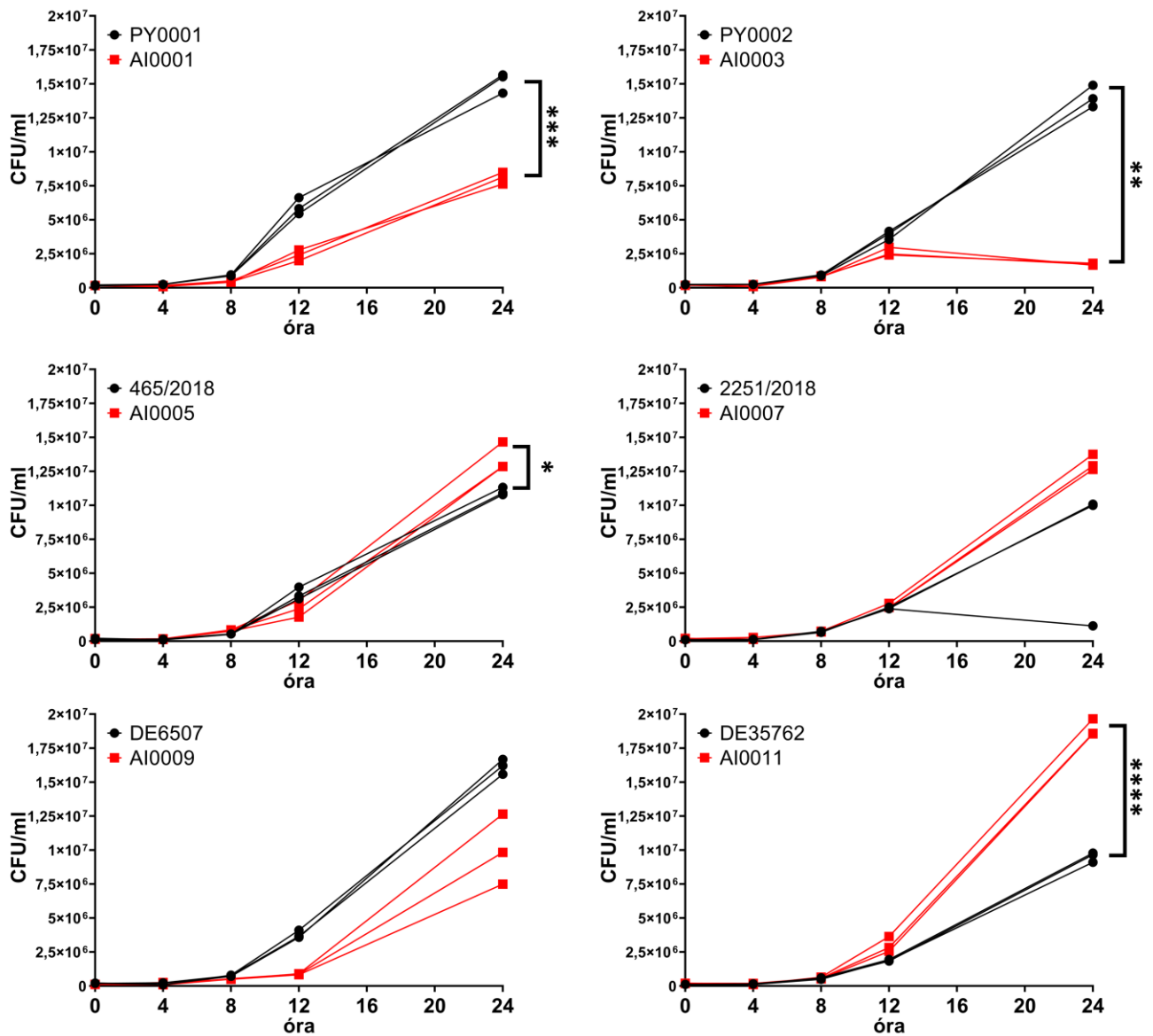
Mindezen felül az izolátumcsoportokat is összehasonlítottuk. A vad típusú izolátumok összehasonlításakor azt találtuk, hogy a mikózist nem okozó izolátumok jelentősen jobban nőttek a kereskedelmi és mikózist okozó csoportokhoz képest, mindegyik BPS koncentráció alkalmazásakor (40  $\mu\text{M}$ :  $p < 0.01$ ; 80  $\mu\text{M}$ :  $p < 0.01$ ; 120  $\mu\text{M}$ :  $p < 0.05$ ). A  $\Delta\Delta HMX1$  mutáns törzseknél szignifikáns ( $p < 0,05$ ;  $\Delta\Delta C < \Delta\Delta NM$ ) különbségeket találtunk a  $\Delta\Delta$ kereskedelmi és  $\Delta\Delta$ mikózist nem okozó csoportok között 40  $\mu\text{M}$  BPS koncentráción. Amikor 80 vagy 120  $\mu\text{M}$  BPS-t használtunk, nem volt szignifikáns eltérés a deléciós csoportok között. (Nyers eredmények: 10.6084/m9.figshare.17000254) [293].

A vad típusú izolátum csoportokat összehasonlítottuk a hozzájuk tartozó deléciós csoportokkal, és a szaporodásukra ugyanaz volt a jellemző, mint amikor a törzseket páronként hasonlítottuk össze: a deléciós csoportok szaporodóképessége kisebb volt a vad típusú izolátum csoportokhoz képest. Szignifikáns eltéréseket találtunk az összehasonlítások során az összes alkalmazott BPS koncentráción, melyek a következők voltak: 40  $\mu\text{M}$  BPS:  $p < 0,001$ ,  $C > \Delta\Delta C$ ;  $p < 0,01$ ,  $NM > \Delta\Delta NM$ ; 80  $\mu\text{M}$  BPS:  $p < 0,001$ ,  $C > \Delta\Delta C$ ;  $p < 0,01$ ,  $NM > \Delta\Delta NM$ ; és 120  $\mu\text{M}$  BPS:  $p < 0,05$ ,  $NM > \Delta\Delta NM$ . Hasonlóképpen, amikor az összes vad típusú izolátumot hasonlítottuk össze az összes deléciós mutánsal, az utóbbi csoport gyengébb szaporodást mutatott, és ez a különbség 80  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,001$ ) és 120  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,001$ ) BPS mellett volt szignifikáns. Tehát, az izolátum csoportok összehasonlítása alapján a *HMX1* gén kiütése a legtöbb esetben gyengítette a törzsek szaporodási képességét vaséhezés esetén, habár ezek a különbségek nem mindig voltak szignifikánsak (Nyers eredmények: 10.6084/m9.figshare.17000254) [293].



**22. ábra** Relatív (kontrolhoz képest) szaporodás vaséhezéskor. A) A szürke (vad típusú izolátumok) és csíkozott ( $\Delta\Delta HMX1$  mutáns törzsek) oszlopok az adatok átlagát mutatják (a sorban balról a második, 5 000 sejtet tartalmazó spot alapján). Az egyes adatpontokat késsel (40  $\mu\text{M}$  BPS), narancssárgával (80  $\mu\text{M}$  BPS) és pirossal (120  $\mu\text{M}$  BPS) jelöltük, a hibásávok pedig a szórást mutatják. A statisztikailag signifikáns különbségeket a következőképpen jelöltük: \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*:  $p < 0,0001$ . B) Fotók a vaséhezés spot plate assay-ról. Az egyes oszlopokban a vad típusú mutánsok láthatók összehasonlítva a  $\Delta\Delta HMX1$  mutáns törzsekkel mindegyik alkalmazott BPS koncentráció esetén.

A BPS mellett a vad típusú és *HMX1* deléciós mutánsok szaporodását 50% RPMI-1640-et és 50% humán szérumot tartalmazó folyékony tápközegben is összevetettük, amely az élesztő által felhasználható szabad vasat nem tartalmazott. Szignifikáns különbség volt megfigyelhető a PY0001, PY0002, 465/2018 és DE35762 izolátumok szaporodási képességében, összehasonlítva őket a génkiütött mutáns párjaikkal ( $p < 0,001$ ,  $p < 0,01$ ,  $p < 0,05$ , ill.  $p < 0,0001$ ; 23. ábra) [293]. Érdekes módon ezen izolátumok közül háromban (465/2018, 2251/2018 és DE35762) a mutáns törzsek szaporodása nagyobb volt 24 óra elteltével, míg a többi esetben a deléciós törzs szaporodási képessége gyengébb volt. A 2251/2018-as izolátum is gyengébb szaporodást mutatott, viszont a különbség statisztikailag nem volt szignifikáns az AI0007 mutáns törzshöz képest. Az AI0009 szaporodása minden ismétlésben kisebb volt, mint a DE6507 izolátumé, azonban a különbség nem volt szignifikáns [Társszerzői eredmény (szaporodás vizsgálata szérumban): Tóth Zoltán, Orvosi Mikrobiológiai Intézet].

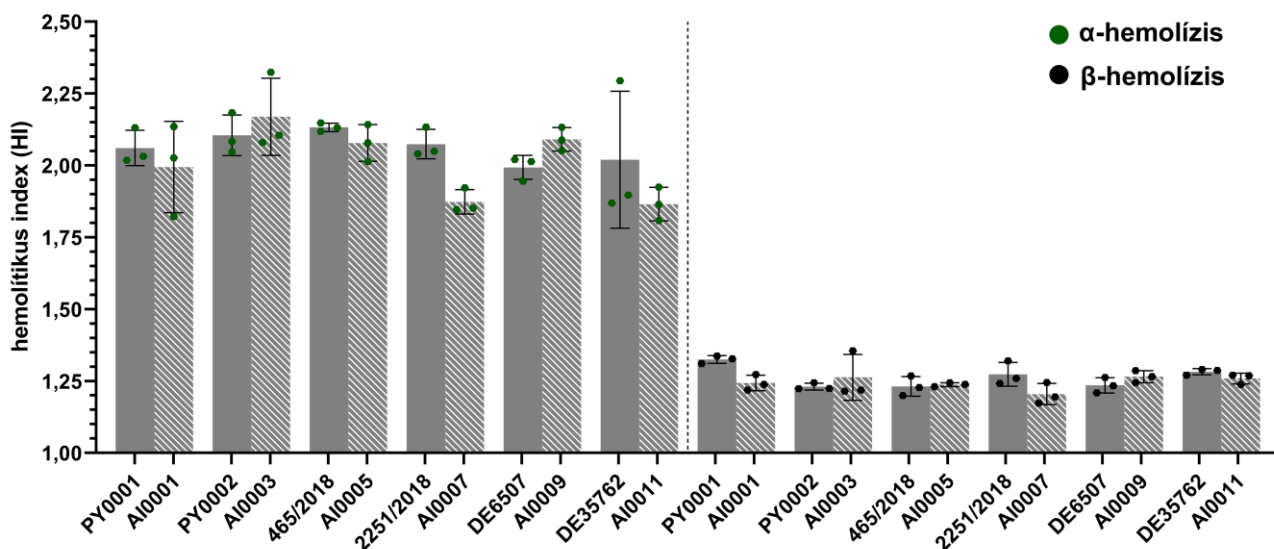


**23. ábra** A vad típusú izolátumok és a *HMX1* deléciós törzsek növekedési görbéinek összehasonlítása 50% RPMI-1640 és 50% humán szérumot tartalmazó tápközegben. A vad típusú izolátumokhoz tartozó egyes adatpontokat feketével, míg a knockout mutánsok adatait pirossal jelöltük. Az azonos ismétlésekhez tartozó adatpontokat vonal köti össze. A szignifikáns eltéréseket mutató összehasonlításokat a következőképpen jelöltük (\*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*:  $p < 0,0001$ ).

### 5.15 A hemolitikus aktivitást nem befolyásolta *HMX1* deléciója

A hemolitikus aktivitás mérésével azt kívántuk megvizsgálni, hogy az  $\alpha$ - és  $\beta$ -hemolitikus indexek alapján elkülöníthetőek-e, illetve azonosíthatóak-e virulens izolátumok, másrészt pedig a *HMX1* gén hiányának a hemolitikus aktivitásra gyakorolt hatását kívántuk felmérni. Amikor a deléciós mutáns törzseket a vad típusúakkal páronként hasonlítottuk össze, akkor a mikózt okozó 2251/2018 ( $p < 0,01$ ; 2251/2018 > AI0007;  $\alpha$ -hemolízis), a mikózt okozó DE6507 ( $p < 0,05$ ; DE6507 < AI0009;  $\alpha$ -hemolízis), és a kereskedelmi PY0001 ( $p < 0,01$ ; PY0001 > AI0001;  $\beta$ -hemolízis) izolátumok esetében találtunk szignifikáns különbséget a hemolitikus aktivitásban. Így a törzsszintű összehasonlítások nem tártak fel egyértelmű hatást, amit a *HMX1* hiánya okozott volna.

Az izolátumcsoportok összehasonlításakor sem az  $\alpha$ - sem a  $\beta$ -hemolízis értékekben nem volt szignifikáns különbség (24. ábra).



2

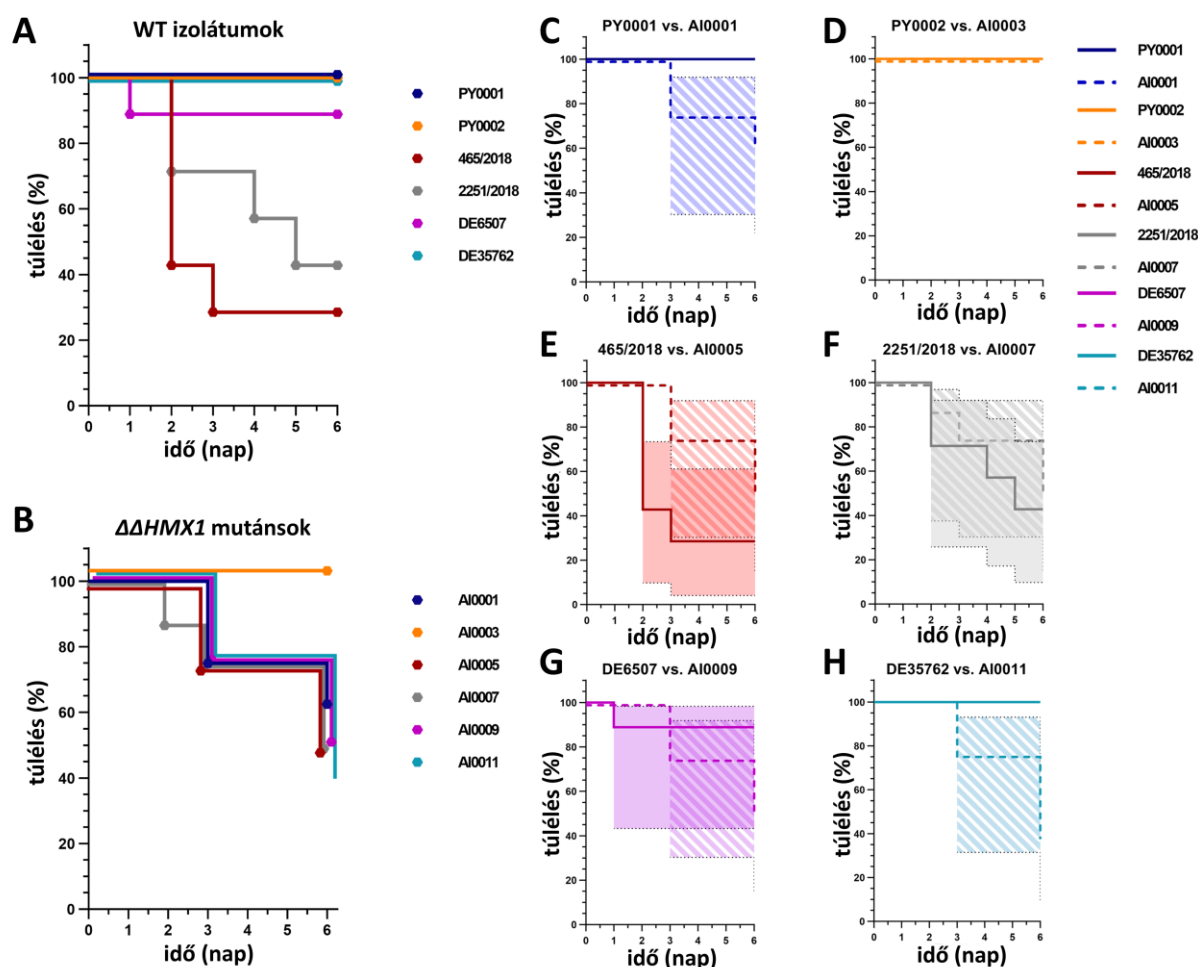
**4. ábra** Hemolitikus indexek. A szürke (vad típusú izolátumok) és csíkozott ( $\Delta\Delta HMX1$  mutáns törzsek) oszlopok az adatok átlagát mutatják. Az egyes adatpontokat zölddel ( $\alpha$ -hemolízis) és feketével ( $\beta$ -hemolízis) jelöltük, a hibasávok pedig az adatok szórását mutatják. A statisztikailag szignifikáns különbségeket a következőképpen jelöltük: \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*:  $p < 0,0001$ .

#### 5.16 A *HMX1* deléciója szignifikánsan magasabb gombaterhelést eredményezett immunszuppresszált BALB/c egerek veséjében

A vad típusú izolátumok az egérikísérletek során eltérő virulenciát mutattak, ami szignifikáns volt ( $p < 0,0001$ ) (25. A ábra, 11. táblázat). A legnagyobb halálozás (28% túlélés) a 465/2018 izolátum esetében volt megfigyelhető, de a 2251/2018 izolátum is kiemelkedő halálozást (<45% túlélés) okozott (25. A ábra). Érdekes módon a *HMX1* kiütése a törzsek közötti szignifikáns különbséget eltüntette ( $p > 0,05$ ) (25. B ábra, 11. táblázat). A vad típusú és deléciós törzsek páronkénti összehasonlításakor azt találtuk, hogy a génkiütés csak két izolátum (PY0001, DE35762) esetében okozott szignifikáns változást (mindkét esetben növekedést) a virulenciában (25. C, H ábra, 11. táblázat).

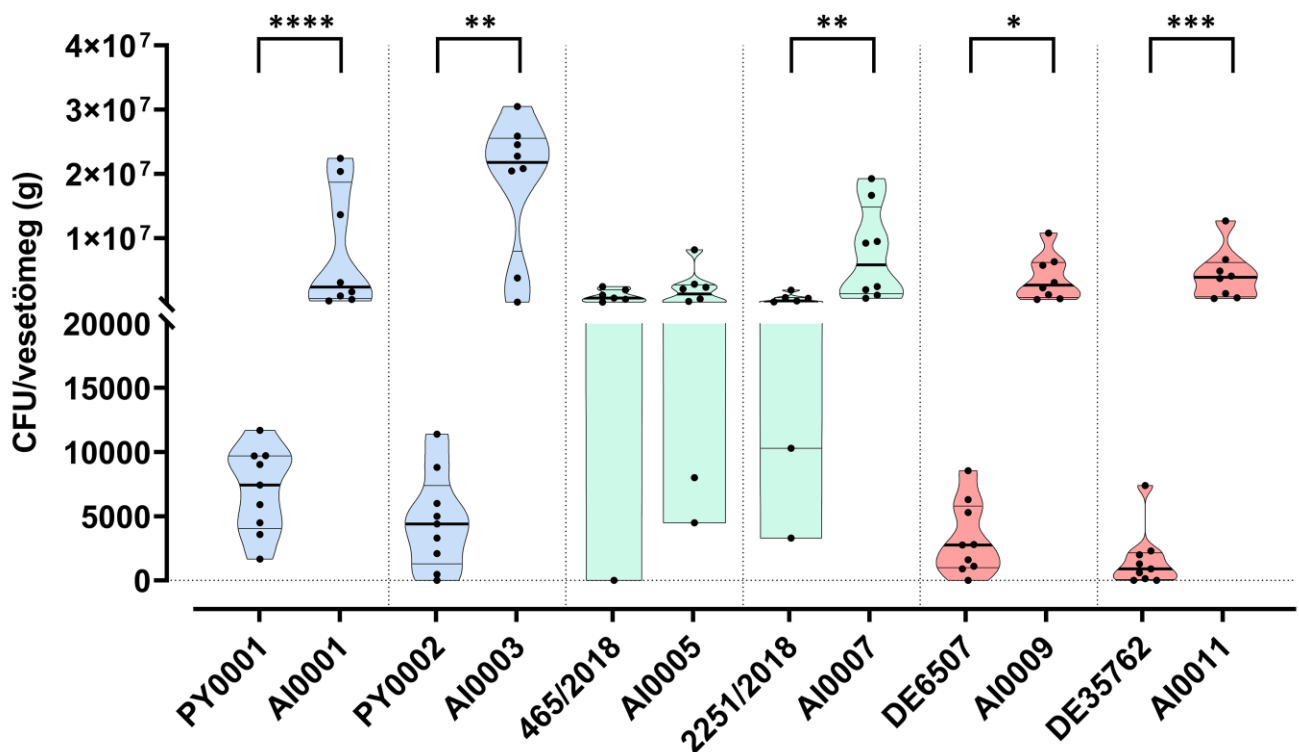
**11. táblázat** A *HMX1* deléciós kísérletekhez felhasznált 6 vad típusú (WT) izolátum és 6 deléciós törzs virulenciájának és a vesék gombaterhelésének statisztikai elemzése. Az egértúlélés esetében Long-rank (Mantel-Cox) tesztet, a vesék gombaterhelése esetében pedig Mann Whitney tesztet (PY0001 vs. AI0001; 465/2018 vs. AI0005; 2251/2018 vs. AI0007; DE35762 vs. AI0011), valamint T-tesztet (PY0002 vs. AI0003; DE6507 vs. AI0009) alkalmaztunk. A statisztikailag szignifikáns különbségeket a következő módon jelöltük: \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*:  $p < 0,0001$ .

Izolátumok és törzsek páronkénti összehasonlítása								
	WT	$\Delta\Delta HMX1$	PY0001 vs. AI0001	PY0002 vs. AI0003	465/2018 vs. AI0005	2251/2018 vs. AI0007	DE6507 vs. AI0009	DE35762 vs. AI0011
Egér túlélés [Log-rank (Mantel-Cox) teszt]	**** <0,0001	0,2445	*0,0485	>0,9999	0,1487	0,6177	0,1218	**0,006
Vesék gombaterhelése			**** <0,0001	**0,001831	0,612587	**0,002176	*0,02018	***0,000631



**25. ábra** Az élesztővel oltott immunszuppresszált BALB/s egerek túlélésének Kaplan-Meier analízise. A) Vad típusú kereskedelmi és klinikai *S. 'boulardii'* izolátumok. B)  $\Delta\Delta HMX1$  mutáns *S. 'boulardii'* törzsek. C)-H) A vad típusú és deléciós törzsek patogénitásának páronkénti összehasonlítása.

A vesékben lévő élő élesztő sejtek számát [vesék gombaterhelése, CFU/vesetömeg (g)] szintén meghatároztuk. A statisztikai analízis alapján a 465/2018 izolátumot kivéve, az összes vad típusú izolátum esetében a CFU értékek szignifikánsan kisebbek voltak, mint a deléciós mutánsok esetében (26. ábra, 11. táblázat). A mutáns törzsek közül az AI0003 törzs esetében voltak a legnagyobbak a CFU értékek (26. ábra) [Társszerzői eredmény (fertőzés vad típusú izolátumokkal): Dr. Kovács Renátó, Orvosi Mikrobiológiai Intézet]. A deléciós törzsekkel való fertőzést, illetve az egerek boncolását az Orvosi Mikrobiológiai Intézet munkatársaival (Dr. Kovács Renátó, Dr. Nagy Fruzsina, Tóth Zoltán, Forgács Lajos) együtt végeztem.



**26. ábra** Az életképes élesztő sejtek mennyisége [CFU/vesetömeg (g)] a vad típusú és *HMX1* deléciós élesztő törzsekkel oltott immunszuppresszált BALB/c egerek veséjében. A kísérlet közben elpusztult és a kísérlet végén leölt egerekből származó adatokat egyaránt ábrázoltuk. A vízszintes, vastagított fekete vonalak az adott adatsor mediánját, a vízszintes, vékony fekete vonalak pedig a felső és alsó kvartiliseket mutatják. A statisztikailag szignifikáns különbségeket a következő módon ábrázoltuk: \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*:  $p < 0,0001$ .

## 6. DISZKUSSZIÓ

### 6.1 A *S. 'boulardii'* kimutatása egy új PCR alapú módszerrel

A PCR alapú fajazonosítási módszerek, valamint a szubtipizálásra használt PCR-fingerprinting módszerek egyaránt alkalmazhatóak az élelmiszer és klinikai mikrobiológiában az időigényes diagnosztikai tesztek helyettesítésére vagy kiegészítésére [197]. Az élelmiszer és klinikai izolátumok fajon belüli diverzitása az utóbbi időben nagy figyelmet kapott. A *S. cerevisiae* széleskörben használt mikroba az élelmiszeriparban, azonban opportunista patogénként is számon tartják [4,197,294]. A klinikai mikológiai diagnosztikában ritkán alkalmaznak szubtipizálási módszereket, pedig ez előfeltétele lenne annak, hogy megértsük, hogyan és miért okoznak fertőzéseket az élesztő tartalmú probiotikumok.

Az általunk leírt új multiplex PCR módszer alkalmas a fertőzést okozó probiotikum (*S. 'boulardii'*) élesztők pontos és gyors azonosítására, így akár a mindennapi diagnosztikában is alkalmazható lehet. A különböző genotipizálási módszerek alkalmazása eltérő eredményekhez vezethet [252,254,295], ezért a pontosabb eredmény érdekében érdemes az egyes módszerek kombinálása egyetlen, multiplex reakcióban. A módszerünket a Debreceni Egyetem Klinika Központja izolátum gyűjteményének felhasználásával optimalizáltuk, *S. cerevisiae* sejtmagban megtalálható gén szekvenálásával, az interdelta régiók elemzésével, MSP fingerprintinggel és mikroszatellita tipizálással. Ezek közül az általunk publikált módszerben az interdelta, két mikroszatellita, valamint az ITS régiót amplifikáltuk egyetlen multiplex PCR reakcióban. Az interdelta primerek a Ty1 és Ty2 transzpozonok LTR régióira (hosszú terminális ismétlődés) nézve specifikusak. Előbbi transzpozoncsoporthiányzik a probiotikus élesztőből irodalmi adatok [135] és az általunk végzett genomannotáció alapján is, ami egyedi sávmintázatot eredményez a fingerprinting során. A vizsgálatainkban használt mikroszatellita allélok pedig specifikusak a *S. 'boulardii'* -ra [126,131]. Érdemes megjegyezni, hogy az MLST, ami egyébként egy időigényes módszer, kis felbontású és heterozigóta INDEL mutációk esetén csak korlátozottan alkalmazható. A probiotikus élesztőkről ismert, hogy bár a MAT lókuszra heterozigóták, nem képesek spórázni, és ez a mi *S. 'boulardii'* izolátumainkra is igaz volt (F4. táblázat).

A multiplex módszerünk használatával a probiotikum izolátumok esetében jellegzetes sávmintázat jelenik meg gélelektroforézis követően, ami gyors vizuális kiértékelést tesz lehetővé automatizált gélanalízis pipeline alkalmazása nélkül is (7. A ábra). A módszer pedig gyorsan alkalmazható, ha a fertőzést okozó mintákról már megállapításra került, hogy a *Saccharomyces* nemzetséghez tartozó élesztők. A MALDI-TOF a legelterjedtebb fajidentifikációs módszer a klinikai mikrobiológiai diagnosztikában. Mivel ehhez a módszerhez is élő mikroba telepeket használnak, a mi multiplex módszerünket közvetlenül lehet fajmeghatározásra, illetve szubtipizálásra alkalmazni a

MALDI-TOF analízist követően egy kolónia PCR, majd egy gélelektroforézis elvégzésével. Úgy becsüljük, hogy a teljes munkafolyamat 3 órán belül megvalósítható, miután a MALDI-TOF eljárás *S. cerevisiae*-ként azonosította az adott mintát. A gomba ITS specifikus primerek pozitív kontrollként szolgálnak a multiplex PCR-ben, arra az esetre, ha a mintát előzőleg hibásan identifikálták *Saccharomyces*-ként (7. A ábra).

Az általunk optimalizált multiplex PCR segítségével kimutattuk, hogy probiotikum eredetű klinikai élesztők gyakran előfordulnak a *S. cerevisiae* izolátumok között. Ezek az izolátumok különböző humán testtájokról és több betegből származtak: 16 páciensből izolált 16 élesztőt azonosítottak (DE342, DE722, DE3912, DE6507, DE10397, DE11595, DE22293, DE27020, DE27290, DE29607, DE35762, DE42533, DE42651, DE42807, DE43763, DE45866) *S. cerevisiae*-ként MALDI-TOF-al a Debreceni Egyetem Klinikai Központjában az általunk vizsgált időszakban, melyek közül az egyiket rosszul határozta meg a kiértékelő szoftver. A hét probiotikum eredetű izolátum három női és négy férfi páciensről származott. A páciensek kora jelentősen eltért, a csecsemőtől az idős korúig terjedt. A projekt időtartama alatt mindössze három fungémia fordult elő, ebből kettő probiotikum eredetű volt, a többi probiotikum eredetű izolátum pedig valószínűleg kolonizáló volt.

A probiotikumok hatását és biztonságosságát célzó kutatások még mindig elmaradnak a felhasználásuk mértékétől [11,296]. A mi multiplex PCR módszerünkkel rövid időn belül és egyszerűen kideríthető, hogy egy élesztő fertőzés probiotikum eredetű-e vagy sem. Ez általánosságban véve elősegítheti az élesztő probiotikumok értékelését biztonságosság szempontjából. A módszer alkalmazásával megállapítottuk, hogy a mikózist okozó, illetve nem okozó *Saccharomyces* izolátumok jelentős része probiotikum eredetű. Ez a megfigyelés nemcsak a klinikai mikológusok számára lehet jelentős, hanem azon kutatók számára is, akik kórházban kezelt betegek mikrobiomjának vizsgálatával, a mikrobiális diszbiózis jelenségével foglalkoznak, vagy éppen a probiotikus élesztők új terápiás alkalmazásait, felhasználási lehetőségeit kutatják, illetve fejlesztik.

## 6.2 A probiotikus élesztő interakciói a humán gazdaszervezettel

A probiotikum eredetű fertőzések előfordulásának ténye arra ösztönzött minket, hogy megvizsgáljuk a *S. boulardii* virulencia faktorait és gazda-mikroba interakcióit az Anoop és munkatársai [185] által javasolt komplex módszertannal. A kísérletekben a klasszikus virulencia faktorokat (foszfolipáz szekréció, aszpartát proteáz szekréció, és hemolitikus aktivitás), a magas hőmérséklet tűrést, az immunaktivációt, illetve az élesztők Caco-2 epitélium modellel való interakcióit (adhézió, károsítás, transzmigráció) vizsgáltuk. Ezeken kívül más fenotípusos tulajdonságokat is vizsgáltunk, illetve a *G. melonella* lárva fertőzési modellt és immunszuppresszált egér fertőzési modellt használtuk a patogenitás *in vivo* felmérésére. A vizsgálatokhoz 14 izolátumot

(kereskedelmi és klinikai izolátumokat egyaránt) használtunk, ami hasonló tanulmányokkal összehasonlítva kiemelkedően soknak számít. Utóbbiakban 1–2 probiotikum izolátum vizsgálata a jellemző [121]. A célunk az volt, hogy potenciális adaptációkat keressünk, mely elősegítheti a *S. 'boulardii'* túlélését, virulenciáját, és így patogén viselkedését az emberi szervezetben. Ennek az élesztőnek a fenotípusát, interakcióit humán epitélium-, illetve immunsejtekkel, patogén baktériumokkal és élesztőkkel, valamint kísérleti állatokkal korábbi tanulmányokban már részletesen vizsgálták. Ezen felül több tucat esettanulmány született, amik úgy írnak a probiotikus élesztőről, mint patogén ágensről. Azonban legjobb tudomásunk szerint ezidáig még nem volt olyan tanulmány, ami nemcsak a probiotikumként forgalmazott törzset jellemzi, hanem összehasonlítja azt más izolátumokkal, melyek a humán szervezetben potenciálisan evolválódtak (az egyik korábbi tanszéki munkát leszámítva, melyben egy probiotikum izolátum jellemzésre került [197]). A gombák fenotípusos tulajdonságai nem csak a kolonizációs és fertőzőési képességet határozzák meg, hanem szelekció alá is kerülnek a gazdaszervezet egyes anatómiai niche-eiben [297,298]. Kevés olyan kutatást végeztek, amelyben a *S. cerevisiae*-t ilyen tekintetben vizsgálták volna [197,299,300].

Az általunk felhasznált kereskedelmi és klinikai izolátumok egyetlen geográfiai régióból, Kelet-Magyarországról származtak. Ezekben a vizsgálatokban a multiplex módszerfejlesztésbe bevont élesztőkön kívül három további, szegedi klinikai izolátumot is fel tudtunk használni, így összesen tíz klinikai és négy kereskedelmi élesztőt vizsgáltunk. A törzsek fenntartásánál minimalizáltuk az átoltások számát (a kísérletek előtt csupán két átoltásra került sor) annak érdekében, hogy elkerüljük a mutációk és genom struktúra variációk akkumulációját a tenyésztés során. Továbbá, mivel a klonális heterogenitás jelen lehet akár egy adott sarzson belül is (kereskedelmi élesztő) [198], mindkét, Magyarországon kapható kereskedelmi probiotikus élesztőből két szubklón izolátumot használtunk. A részletes adatok a páciensekről és az izolátumokról lehetővé tették számunkra a mikózist okozó és nem okozó izolátumok összehasonlítását. Az eredmények alapján tett megállapításokat az alábbi fejezetekben részletesen kifejtjük.

#### 6.2.1 Nincs jelentős különbség az *in vitro* virulencia faktorok termelésében a *S. 'boulardii'* izolátumok csoportjai között

A 14 izolátum variabilitást mutatott egyes fenotípusos tulajdonságokban (F4. táblázat), valamint az opportunistá patogén *C. albicans* esetében ismert extracelluláris virulencia faktorok [301] esetében is. Az  $\alpha$ -hemolízis esetében a kereskedelmi izolátumok az első nap elteltével nagyobb hemolitikus aktivitást mutattak, mint a másik két csoport izolátumai. A mikózist okozó izolátumok csak a  $\beta$ -hemolízisben mutattak nagyobb aktivitást a kísérlet 3 napján. Ezen felül a kereskedelmi izolátumok szignifikánsan több foszfolipázt termeltek, mint a mikózist nem okozó izolátumok, amik viszont aktívabb extracelluláris proteáz termelést mutattak (9. ábra, 7. táblázat). Az eredmények alapján tehát a mikózist okozó izolátumok általánosságban véve nem voltak kiemelkedőek az

extracelluláris virulencia faktorok termelésében annak ellenére, hogy ezeket a tulajdonságokat fontosnak tartják az élesztő fertőzések kialakulásakor. Ez igaz volt a többi virulenciával összefüggésbe hozható tulajdonságra is, mint például a pszeudohifa képzés, valamint a magas hőmérséklet tűrése, mely utóbbi két kereskedelmi izolátumra (PY0001, PY0002) volt jellemző (F5. táblázat). Érdeemes megjegyezni, hogy a 2251/2018 mikózist nem okozó izolátum eltért a többi vizsgált élesztőtől: kicsi pszeudohifa képző képesség, és közepes termotolerancia jellemezte (27. ábra, F5 táblázat).

### 6.2.2 A *S. 'boulardii'* kiemelkedően rezisztens a flukonazollal szemben

Az antimikotikum rezisztencia vizsgálatok alapján az izolátumok többsége azonos érzékenységet mutatott az amfotericin B-vel és a kaszpofunginnal szemben. A *Candida* fajokra az amfotericin B CLSI MIC küszöbérték 1 µg/mL fölött van, ami négyszer nagyobb érték, mint a legnagyobb, amit a mi izolátumainknál mértünk. A kaszpofungin rezisztencia küszöbértékek a *Candida* fajoknál nagymértékben variábilisak, ami megnehezíti az összehasonlítást az általunk mért értékekkel. A flukonazol esetében a legtöbb *Candida* fajnál  $\geq 8$  µg/mL MIC érték mérésekor beszélhetünk rezisztenciáról. A mi esetünkben hét *Saccharomyces* izolátum érte el ezt a határértéket, melyek között mindkét verezizolátum is szerepelt.

### 6.2.3 Az élesztő és bélepitélum sejtek között a kimutatható kölcsönhatás elhanyagolható

Korábbi tanulmányokban *in vitro* Caco-2 epitélum modell segítségével demonstrálták, hogy sem a kereskedelmi, sem a klinikai *S. cerevisiae* izolátumok (beleértve egy *S. 'boulardii'* probiotikum mintát is) nem képesek áthatolni a bélepitélumon 48 óra elteltével [187,191]. Ez összhangban van az általunk kapott eredményekkel, mivel még 6 nap elteltével sem tapasztaltuk az élesztő sejtek átjutását az alkalmazott epitélum modellen (10. ábra). Két izolátum (DE3912, 551/2018) átjutott ugyan, de ennek mértéke elenyészően kicsi volt. Egy másik kutatásban azt találták, hogy kis mértékben bár, de a *S. cerevisiae* képes az epitélumon való átjutásra, de itt nem használtak *S. 'boulardii'* izolátumokat [302]. Fontos megjegyezni, hogy Klingberg és munkatársai [187] azt figyelték meg, hogy a polarizált, egyrétegű Caco-2 sejtrétegek TEER értéke nőtt a *S. cerevisiae* epitélumra leoltását követően, ami az epitélum "barrier" funkció megerősödését jelentheti és ezt fontos probiotikus tulajdonságként tartják számon. Azonban ugyanilyen kísérleti körülmények között mi azt találtuk, hogy a TEER érték növekedése pusztán az akkumulálódó, nem adherens élesztősejttömeg miatt történik, ami egy tápoldat cserénél könnyen leválik az epitéliumról. Emiatt a probiotikus élesztőnek valószínűleg nincs hatása az epitélum elhatároló képességére (10. ábra). Izolátumaink nem károsították az általunk alkalmazott epitélum modellt (10. ábra). Összességében tehát, az általunk tesztelt izolátumok patogén jellegű interakciói az epitéliummal elhanyagolhatóak voltak.



életbenmaradását és az élesztők általi kolonizációt is vizsgáltuk a vesék gombaterhelésének meghatározásával. A kereskedelmi izolátumok esetében nagy volt az egerek túlélési aránya, a klinikai izolátumok között viszont már voltak nagy virulenciával jellemezhető izolátumok: 465/2018 (28% túlélés), DE45866, DE42533, 2251/2018 (42% túlélés) (13. ábra, 9. táblázat). A várakozásokkal ellentétben tehát nem a vérizolátumok (DE6507, DE35762) mutattak nagy virulenciát egérben, hanem néhány, a mikózist nem okozó csoportba tartozó izolátum (13. ábra).

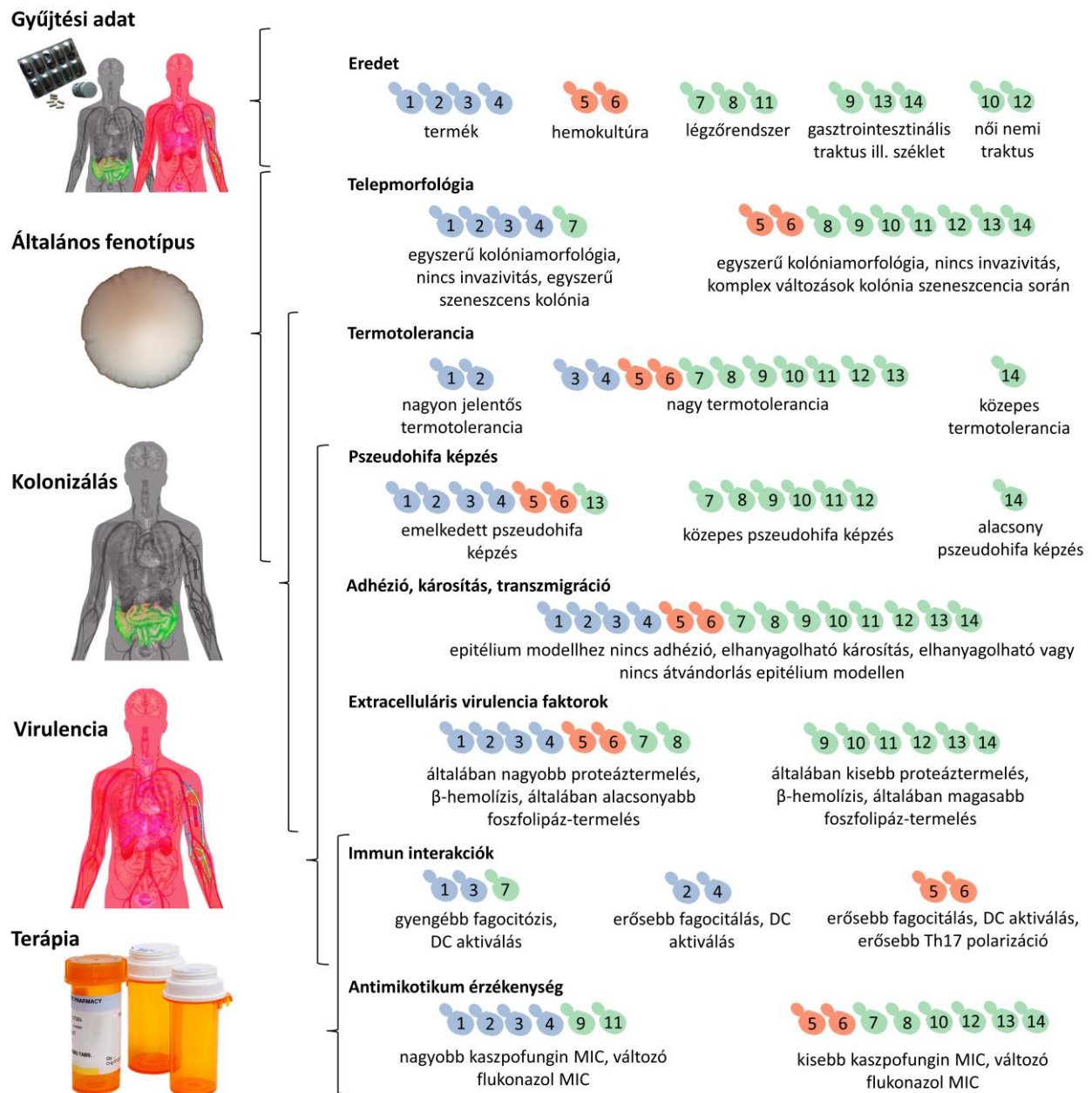
Mindezek alapján a lárva és egérmodellben kapott eredmények nem adtak hasonló eredményt. Fontos megjegyezni, hogy a *Saccharomyces* élesztőket vizsgáló tanulmányokban nem jellemző a lárva és az egérmodell együttes alkalmazása és tárgyalása. Nem tudunk olyan publikációról, ami a két *in vivo* modell egymásnak való megfeleltethetőségét vizsgálta volna *Saccharomyces* élesztők esetében, így egy ilyen, a két állatmodellt összehasonlító tanulmány mindenképpen hasznos lenne a későbbiekben. Ennek hiányában az egérmodell esetében kapott eredményeket sokkal relevánsabbnak tartjuk humán szemszögből.

#### 6.2.6 A *S. 'boulardii'* fungémia kialakulásának hátterében valószínűsíthetően a betegek egészségügyi állapota fontos tényező

Az egyik legérdekesebb eredményünk az volt, hogy azoknak a probiotikus izolátumoknak, amik mikózist okoztak, nem volt olyan fenotípusuk, ami elősegítette volna, hogy aktívan behatoljanak a vaszkuláris rendszerbe. Így a véráramba való behatolás és a szisztémás fertőzés kialakulásának folyamata még mindig nem teljesen tisztázott. Mindazonáltal korábbi kutatások több mechanizmust is valószínűnek tartanak. A probiotikus élesztő a normál orális úton kívül bejuthat levegőből is az emberi szervezetbe [119,174], vagy terjedhet emberről emberre [178]. Fungémia kialakulhat katéter használata [174], szándékos injektálás [308], vagy a gasztrointesztinális traktus betegsége miatt, illetve műtéti beavatkozás következtében kialakult sérüléseken keresztül [9]. Az immunszuppresszív kezelések szintén hajlamosítanak a gombás fertőzésekre, és a fentebb említett állapotokkal kombinálva növelik a fungémia kialakulásának kockázatát. Így az élesztő probiotikumok használata ellenjavallt súlyos egészségügyi állapotban lévő betegek számára. Mindezek ellenére sok esetben mégis részesülnek olyanok is *S. 'boulardii'* kezelésben, akiknek egészsége súlyosan kompromittált [8,10]. Ezeknél a betegeknél a legtöbb esetben például gasztrointesztinális diszbiózis esetén alkalmaznak probiotikus élesztőt. Ez további fertőzések megalágya lehet, mivel ilyen esetekben a bél "barrier" funkciója is valószínűleg károsodott [309–311]. Az a tény, hogy az élesztőt tartalmazó probiotikus termékek bizonyos esetekben veszélyesek lehetnek, a közelmúltban egyenesen arra készítetett egy kórházat, hogy eltávolítsa a gyógyszeres tárából a *S. 'boulardii'* termékeket [177].

A szakirodalomban publikált kutatások és a mi eredményeink is arra utalnak, hogy az élesztő probiotikumok bejutása a vérbe nem az élesztő saját virulencia faktorai révén következik be, hanem a szervezet aktuális állapotától függ. Így a probiotikum törzsek túlélése és reprodukciója a véráramban

és a szervezet más részein az élesztő más tulajdonságainak, nem a penetrációt elősegítő virulencia faktorainak tulajdonítható. További kutatások és lehetőleg több, virulenciában eltérő izolátum lenne szükséges ahhoz, hogy feltárjuk a probiotikus élesztők patogénné válásának molekuláris folyamatait és okait. A kutatásunkban vizsgált kereskedelmi, kommenzalista (mikózt nem okozó) és mikózt okozó izolátumok között talált fenotípusos, illetve virulenciafaktorbeli különbségeket a 27. ábrán összegeztük.



**27. ábra** A *S. 'boulardii'* izolátumok klaszterezése a fenotípusos eltérések, virulencia faktorok, az epitélium modellel és az immunsejtekkel való kölcsönhatás, és antimikotikum érzékenység alapján. Bal oldal: Egy probiotikum fertőzés legfontosabb lépései, illetve a probiotikus élesztők jellemzői. Jobb oldal: az 5. táblázat alapján számozott egyes izolátumok (kék: kereskedelmi, piros: mikózt okozó (vérizolátumok), zöld: mikózt nem okozó), különböző kategóriákba sorolva egyszerű összehasonlítás és fenotípusos klaszterezés alapján.

### 6.3 *HMX1* gén potenciális szerepe a probiotikus élesztő patogenitásában

Számos publikáció leírja, hogy a probiotikus élesztőgombák mikózist okozhatnak, ami életveszélyes egészségügyi állapotokat idézhet elő [8,177,179,312]. Azonban sokkal kevesebb adat áll rendelkezésre arról, hogy az élesztő genetikai tulajdonságai hogyan járulnak hozzá az ilyen fertőzések kialakulásához. Így az egyik célunk az volt, hogy felfedjük ezeket, első körben az élesztő *HMX1* gén funkcióvesztése miatt bekövetkező változások vizsgálatával. A gén már a multiplex PCR fejlesztési tanulmányunk MLST adatai alapján is invariábilisnak bizonyult a probiotikus élesztőink között, a teljes genom-összeállítást követően pedig a gén környezetét is megvizsgáltuk, lehetővé téve a CRISPR/Cas9 alapú génkiütés megtervezését. A *HMX1* központi szerepet tölt be a *S. cerevisiae*, így a *S. 'boulardii'* vasmetabolizmusában is, amikor a sejtek környezetében kicsi a hasznosítható vas koncentrációja. A vashiányos környezet kialakítása és fenntartása a patogén mikroorganizmusok körül általános védekezési stratégia az emberi szervezetben [218,220–224]. A *HMX1* gén ilyen körülmények között fontos szerepet játszhat az élesztő túlélésében a hem lebontása miatt [226], így az volt a hipotézisünk, hogy a *HMX1* hozzájárulhat a probiotikus élesztő patogenitásának kialakításához és a vérben való túléléshez. Teszteltük a gén deléciójának hatását különböző genetikai háttérrel rendelkező (17, 20, 21. ábra) *S. 'boulardii'* izolátumok esetében. A gén sikeres delécióját követően vashiányos körülmények (szintetikus BPS vaskelátort tartalmazó táptalaj, illetve 50% humán szérum) között teszteltük a törzsek és izolátumok szaporodását, és felmértük  $\alpha$ - és  $\beta$ -hemolitikus aktivitásukat (22, 23, 24. ábra). Ezen felül állatkísérleteket végeztünk, hogy meghatározzuk az élesztők virulenciáját és a túlélését immunszuppresszált egérmodellben (25, 26. ábra).

#### 6.3.1 A génkiütéshez kiválasztott izolátumok genetikai különbségei

Az egyik kereskedelmi izolátum újonnan összeállított és annotált genomját referenciaként használva megállapítottuk, hogy az izolátumok valóban közeli rokonok, de egyedi mutációkat tartalmaznak, és így különböző genetikai hátteret képviselnek. Nagymértékű genomszerkezeti eltéréseket nem találtunk, azonban többszáz mutáció befolyásolta a fehérjefunkciókat az izolátumokban, és nagy méretű heterozigótaság-vesztés is megfigyelhető volt. A *HMX1*-gyel interakcióba lépő gének közül 11 olyan volt, melyben nagy (két gén) vagy közepes (tíz gén) hatású, fehérjefunkciót is befolyásoló mutációk voltak (10. táblázat). Ezen felül számos más génben is találtunk hasonló mutációkat (43 génben nagy hatású, 73 génben közepes hatású mutációkat), melyek azonban nem mindegyik izolátumban voltak megtalálhatóak (21. ábra, F6, F7. táblázat). A mutációkban érintett gének ez utóbbi, nagyobb csoportja rávilágít arra, hogy a genetikai háttér mennyire eltérő lehet még a közeli rokon probiotikus élesztőgombák között is. Ezek az eredmények hasonlóak a McCullough és munkatársai által bemutatott virulencia adatokra [121], akik kimutatták,

hogy a virulencia (betegségokozó képesség) eltérő lehet ugyanazon termék két különböző sarzsa esetében. A genetikai háttér ilyen eltérései magyarázhatják a vaséhezési és az egérfertőzési kísérletek eltérő kimenetelét, hasonlóan ahhoz, ahogy egy nemrégiben végzett tanulmány kimutatta, hogy a *S. cerevisiae* genetikai háttérének eltérései lényegesen befolyásolják a funkcióvesztéssel járó mutációk hatásait az élesztő fitnessére [313]. Például a hem oxigenáz gén deléciójának más hatása volt egyes törzseknél [általánosságban véve csökkentette az adott izolátum fitnessét vaséhezés során, azonban egy esetben (DE35762) előnyös mutációnak bizonyult].

Megvizsgáltuk a génkiütéses kísérletekben vizsgált probiotikus élesztők egyéb genomi jellemzőit is (SNP analízis, ploidia, CNV analízis, mitokondriális DNS, 2 $\mu$  plazmid, rDNS, Ty2 és Ty5 transzpozonok kópiaszáma, LOH és GOH események) (15–20. ábra). Az izolátumok egyes tulajdonságokban eltértek egymástól, például génkópiaszámváltozás 10 gén esetében fordult elő.

Összességében, a genomikai analízis során a klinikai törzsekre, vagy az állatmodellben magas virulenciát mutató törzsekre specifikusan jellemző adaptációkat és eltéréseket nem találtunk. Az eredmények szemléltették, hogy bár minden, génkiütésre kiválasztott izolátum kifejezetten közeli rokon *S. 'boulardii'*, mégis eltérő genetikai háttérrel képviselnek.

### 6.3.2 A vaséhezéssel szembeni tolerancia lehetséges virulencia faktor a *S. 'boulardii'* esetében

Az izolátumok és mutáns törzsek vaséhezéssel szembeni toleranciája változékony volt a BPS vaskeletort tartalmazó táptalajon és 50% humán szérumban, 50% RPMI-1640-t tartalmazó folyékony tápközegben. A kapott CFU értékek az 50%-os humán szérumban az AI0001, AI0003 és AI0009 deléciós törzsek esetében kisebbek voltak, mint a vad típusú izolátumoknál (bár az AI0009 esetében a különbség nem volt szignifikáns). Érdekes módon az AI0011 törzs szaporodási képessége szignifikánsan nagyobb volt a DE35762 izolátummal összehasonlítva (23. ábra). Ezek az eredmények nagyon hasonlóak voltak a BPS-sel végzett "spot-plate" kísérlet eredményeihez (22. ábra). Az AI0005 és AI0007 törzsnél ellentétes eredményeket kaptunk, mivel a "spot-plate" kísérletnél gyengébb, szérumban viszont erősebb szaporodást mutattak a 465/2018 és 2251/2018 izolátumokkal összehasonlítva. Utóbbi esetében nem volt szignifikáns a különbség (23. ábra).

Ezen felül szignifikáns különbséget találtunk a három vizsgált csoport (kereskedelmi, mikózist okozó, mikózist nem okozó) között a spot-plate kísérlet esetében. A mikózist nem okozó csoport mutatta a legmagasabb toleranciát a másik két csoporttal összehasonlítva függetlenül attól, hogy ki volt-e ütve a *HMX1* vagy sem (22. A, B ábra). Érdekes megjegyezni, hogy a mikózist nem okozó csoport tagjai magas egérhalálozást okoztak (13. ábra), miközben a hemolitikus aktivitás alapján nem lehetett megkülönböztetni a törzseket (24. ábra) annak ellenére, hogy ez utóbbi módszert gyakran használják a patogén élesztők virulenciájának [237,238,314] és probiotikus élesztők biztonságosságának felmérésére [241,242,315]. Az eredményeink alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a vaséhezéssel szembeni tolerancia tesztelése jobb módszer lehet a virulencia

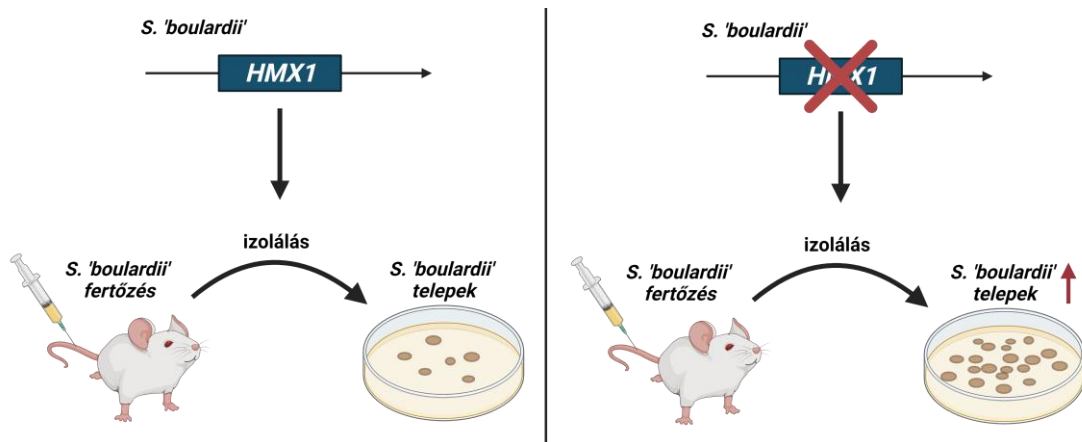
felmérésére, mint a hemolitikus aktivitás agarlemeztes tesztelése, mivel utóbbi nem volt alkalmas a virulens, egérben magas halálozást okozó izolátumok azonosítására, elkülönítésére.

### 6.3.3 A *S. 'boulardii'* hem oxigenáz-1 (*HMX1*) gén, mint lehetséges antivirulencia faktor

A vad típusú törzsek közül a 465/2018 és a 2251/2018 szignifikánsan ( $p < 0,0001$ ) csökkentették az egerek túlélését, így a vizsgált izolátumok közül ezek voltak a legvirulensebbek (25. A ábra, 11. táblázat). A PY0001, PY0002 és DE35762 avirulensnek bizonyultak, míg a DE6507 mérsékelt virulenciát mutatott (25. A ábra). A feltételezésünk az volt, hogy ha deletáljuk a *HMX1* gént az egerek túlélési százaléka jelentősen nőni fog, amiatt, hogy az élesztősejtek nem lesznek képesek a sejten belül található vas tartalmú hem hasznosítására. Ezzel ellentétben, amikor a *HMX1* deléciós törzseket oltottuk az egerekbe, a túlélés változása az adott törzstől függött (25. B–H ábra), annak ellenére, hogy a törzsek genetikailag nagyon közeli rokonok (probiotikum eredetű törzsek, melyek feltételezhetően csak gazdaszervezeten belüli mikroevolúción mentek keresztül) [176,197,214]. A virulencia csökkent az AI0005 és AI0007 törzseknél, de ez a változás nem volt szignifikáns az eredeti vad típusú törzsekkel (465/2251 és 2251/2018) összehasonlítva. Az AI0001, AI0009 és AI0011 virulenciája magasabb volt a vad típusú törzsekhez képest, viszont az AI0009 esetében ez nem volt szignifikáns. Az AI0003 törzsnél az egerek túlélési százaléka nem változott a vad típusú PY0002 törzshöz képest (25. C–H ábra, 11. táblázat). Azonban a *HMX1* elvesztése a CFU értékek szignifikáns növekedését eredményezte a vesék gombaterhelésének felmérésekor a vizsgálatban használt összes törzs esetében az AI0005 törzs kivételével (26. ábra, 11. táblázat). Érdekes módon ennek a törzsnak a vad típusú izolátuma okozta a legnagyobb mértékű egérhalálozást (25. A ábra). Az adatok alapján az is megfigyelhető volt, hogy a CFU értékek törzsenként erősen szórtak. Ennek ellenére a CFU értékek és a túlélési adatok statisztikai összehasonlítása azt az eredményt adta, hogy a *HMX1* deléciója szignifikánsan növelte probiotikum törzsek életképes sejtszámát a vesében (25, 26. ábra, 11. táblázat).

A virulencia faktorok a gomba patogének olyan tulajdonságai, amelyek károsítják a gazdaszervezetet (közvetlenül, vagy a gazdaszervezet válaszában keresztül), vagy elősegítik a gomba szaporodását és túlélését a fertőzés közben. Utóbbiakat virulencia determinánsoknak is nevezik [316]. Az eredményeink azt mutatják, hogy a *C. albicans* homológjával ellentétben [231] a *Saccharomyces*-ekben lévő *HMX1* nem tekinthető virulencia faktor génnek. A deléciós törzsek megnövekedett fitnessze a fertőzött egerek veséjében arra enged következtetni, hogy az élesztő hem oxigenáza potenciális antivirulencia faktornak tekinthető. Ezt a jelenséget a közelmúltban definiálták humán patogén gombák esetében [316]. Az ilyen gének elvesztése vagy deléciója megnövekedett virulenciához vezet, vagy a gazdaszervezet válaszában befolyásolása következtében, vagy akár a gombasejt kompenzáló stresszválaszai miatt, ami túlkompensálja a génvesztés káros hatását, és fitness növekedéshez vezet a stresszt jelentő környezetben, amit a gazda szervezete jelent (28. ábra). Az

esetünkben fennálló jelenség (a vesék gombaterhelésének növekedése) mögött meghúzódó folyamatok pontos mechanizmusának feltárásához további vizsgálatok szükségesek.



**28. ábra** A *HMX1* gén deléciójának hatása a probiotikus élesztő *in vivo* túlélésére. Ábrakészítő alkalmazás: Biorender (<https://biorender.com/>)

Az itt bemutatott eredmények az első bizonyítékai egy lehetséges antivirulencia gén jelenlétének a *S. 'boulardii'*-ban, ami arra utal, hogy nem kizárólag egy virulencia faktor megszerzése, hanem egy funkcióvesztéssel járó mutáció is hozzájárulhat a probiotikus élesztő fitnessének növekedéséhez emlős gazdaszervezetben. Ehhez hasonló eredményeket csak a sejtfal összetétel és nagyobb virulencia (*SSD1* gén), valamint a sejtfal összetétel és magasabb *in vitro* immunaktiváció (*MCD4* gén) kontextusában figyeltek meg korábban a *S. cerevisiae* esetében [317,318]. Ez felhívja a figyelmet arra a tényre, hogy egy gén deléciója váratlan adaptív előnyökkel járhat, amelyek potenciálisan elősegítik a patogenitást. A vizsgálataink során az általunk alkalmazott emlős patogenitási modell esetében ezt a hatást a vesék szignifikánsan nagyobb gombaterhelése mutatta. Az *in vitro* kísérletek, beleértve a szérumos szaporodási teszteket is, nem mutattak korrelációt ezzel az eredménnyel, rávilágítva arra, hogy az emlősmodellek alkalmazása mindenképpen javasolt a *Saccharomyces* törzsek potenciális patogenitásának vizsgálatakor. A *S. 'boulardii'* probiotikus élesztő "genetic engineering"-jét és törzsfeljesztését tehát körültekintéssel kell végezni szem előtt tartva azt, hogy a jövőben ezek a fejlesztések egészségügyi problémák forrásai lehetnek. Ezért erősen ajánlott az új, módosított probiotikus törzsek virulenciájának tesztelése *in vivo* állatmodellek alkalmazásával.

## ÖSSZEFOGLALÁS

A *S. 'boulardii'* (*S. 'boulardii'* CNCM I-745) az egyik legkeresettebb probiotikum [113], melynek tulajdonságait több mint 80 randomizált klinikai vizsgálatban igazolták [7]. Vitathatatlan egészségügyi előnyei ellenére fennáll a fungémia veszélye immunhiányos vagy súlyosan beteg pácienseknél, csecsemők és idősek körében. Az elmúlt években növekedett az ilyen fertőzéses esetek száma [8,177,179,319].

A szakirodalom tanulmányozása során felderítettük, hogy *Saccharomyces* fungémia esetén ritkán, mindössze a leírt esetek felénél végeztek tipizálási módszert annak érdekében, hogy kiderítsék probiotikum eredetű volt-e a fertőzés, és még ezekben az esetekben is az időigényesebb, módszerek kerültek alkalmazásra [176]. A már létező tipizálási módszerek (ITS, mikroszatellita és interdelta analízisek) kombinálásával egy multiplex PCR módszert fejlesztettünk ki, amivel rövid időn belül (3 óra), megbízhatóan kideríthető, hogy egy élesztő fertőzést a *S. 'boulardii'* probiotikum okozott-e vagy sem. Ez elősegítheti az élesztő probiotikumok biztonságosságának felmérését, valamint egyszerű kivitelezhetősége miatt a klinikai diagnosztikában is alkalmazható. Ezen felül törzsgyűjteményünk és a multiplex PCR alkalmazásával megállapítottuk, hogy a klinikai *Saccharomyces* izolátumok jelentős része probiotikum eredetű.

Analizáltuk az izolátumok fenotípusát, a bélepitélium modellel való interakciókat, és az immunaktivációban bekövetkező változásokat 14 *S. 'boulardii'* izolátum vonatkozásában. Az egyes élesztő izolátumoknak különböző fenotípusuk volt, de egyértelműen nem lehetett különbséget tenni a kereskedelmi és klinikai vagy a klinikai mikózist nem okozó és klinikai mikózist okozó minták között. Ez azt mutatja, hogy a *S. 'boulardii'* képes túlélni az emberi gazdaszervezetben hosszabb ideig anélkül, hogy olyan tulajdonságokra tenne szert, amelyeket a korábbi tanulmányok a patogenitással kapcsolatosak össze. Érdekes még megjegyezni a probiotikum termékek flukonazollal szembeni jelentős rezisztenciáját.

CRISPR/Cas9 géndeléciónal megvizsgáltuk, hogy a *HMX1* gén szerepet játszik-e a probiotikus élesztő patogenitásának kialakításában és a vérben való túlélésben. Az adatok alapján a *HMX1* gén lehet az első leírt potenciális antivirulencia gén a *S. 'boulardii'*-ban. Tehát, nem csak egy virulenciafaktor kialakulása, hanem egy funkcióvesztéssel járó mutáció is hozzájárulhat a patogenitáshoz. Ez felhívja a figyelmet arra, hogy egy gén deléciónja és az ezt követő metabolikus változások váratlan adaptációs előnyöket okozhatnak, amelyek potenciálisan elősegítik a patogenitást. Emiatt a *S. 'boulardii'* probiotikus élesztő "genetic engineering"-jét és törzsfelnevelését körültekintéssel kell végezni, azt is szem előtt tartva, hogy a jövőben egészségügyi problémák forrása lehet. Ezért a törzsfelnevelésen átesett probiotikumok biztonságosságának és virulenciájának ellenőrzése erősen ajánlott, mégpedig *in vivo* állatmodellek alkalmazásával.

## SUMMARY

*S. 'boulardii'* (*S. 'boulardii'* CNCM I-745) is one of the most sought-after probiotics [113], the properties of which have been demonstrated in more than 80 randomized clinical trials [7]. Despite its undeniable health benefits, there is a risk of fungemia in immunocompromised or severely ill patients, infants and the elderly. The number of such infections has increased in recent years [8,177,179,319].

Studying the literature, we revealed that in the case of *Saccharomyces* fungemia, typing methods were performed rarely (in only half of the cases) to determine if the infection was of probiotic origin, and even in these cases, mostly time-consuming methods were used [176]. Combining existing typing methods (ITS, microsatellite, and interdelta analyzes), we developed a multiplex PCR method that can reliably determine in a short time (within 3 hours) whether or not a yeast infection was caused by the probiotic *S. 'boulardii'*. This may facilitate the assessment of the safety of yeast probiotics and, due to its simple feasibility, may be used in clinical diagnostics. In addition, using our strain collection and the multiplex PCR method, we found that a significant proportion of *Saccharomyces* clinical isolates are of probiotic origin [176].

The phenotype of the isolates, their interactions with the intestinal epithelial model, and the changes in immune activation were analyzed for 14 *S. 'boulardii'* isolates. Each yeast isolate had a different phenotype, but it was not possible to unequivocally distinguish between commercial and clinical or clinical non-mycosis and clinical mycosis-causing samples. This shows that *S. 'boulardii'* is able to survive in the human host for a longer period of time without acquiring traits that previous studies have linked to pathogenicity. It is also notable that probiotic products have high resistance to fluconazole.

We examined the role of the *HMX1* gene in the development of pathogenicity and blood survival of the probiotic yeast by CRISPR/Cas9 gene deletion. Based on the data, the *HMX1* gene may be the first potential antivirulence gene described in *S. 'boulardii'*. Thus, not only the development of a virulence factor but also a loss-of-function mutation may contribute to pathogenicity. This draws attention to the fact that deletion of a gene and subsequent metabolic changes can cause unexpected adaptation benefits that potentially promote pathogenicity. For this reason, the genetic engineering and strain development of the probiotic yeast *S. 'boulardii'* should be done with caution, keeping in mind that it may be a source of health problems in the future. Therefore, monitoring the safety and virulence of probiotics that have undergone strain development is strongly recommended using *in vivo* animal models.

## FÜGGELÉK

**F1. táblázat** Összefoglaló táblázat a *S. 'boulardii'* fertőzésekről szóló esettanulmányokról és publikációkról, illetve az ezekben alkalmazott szubtipizáló módszerekről.

Publikálás éve	Szubtipizáló módszerek	Leírt klinikai izolátumok száma	Referencia
1999	-	1	(1)
1999	kariotipizálás, ribotipizálás	2	(2)
2000	-	1	(3)
2000	-	1	(4)
2000	kariotipizálás, mitokondriális DNS tipizálás	2	(5)
2000	mitokondriális DNS tipizálás, fenotipizálás	4	(6)
2001	mikroszatellita tipizálás	21	(7)
2001	izoenzim elektroforézis, mitokondriális DNS tipizálás	3	(8)
2002	fenotipizálás, ribotipizálás	7	(9)
2003	-	1	(10)
2003	-	1	(11)
2003	fenotipizálás	3	(12)
2003	kariotipizálás	3	(13)
2003	kariotipizálás, ribotipizálás	2	(14)
2004	-	1	(15)
2004	-	1	(16)
2004	mitokondriális DNS tipizálás, interdelta tipizálás	19	(17)
2005	-	1	(18)
2005	-	1	(19)
2005	MSP-PCR	2 (leírt új eset)	(20)
2005	retrotranszpozon Southern-blot, mikroszatellita, ribotipizálás	8	(21)
2006	mitokondriális DNS tipizálás, interdelta tipizálás	1	(22)
2007	-	1	(23)
2008	-	1	(24)
2010	ribotipizálás	1	(25)
2011	-	1	(26)
2012	-	1	(27)
2013	-	1	(28)

2014	-	1	(29)
2014	ribotipizálás	1	(30)
2016	-	1	(31)
2016	WGA (teljesgenom analízis)	3	(32)
2017	MALDI-TOF tömegspektrometria, rep-PCR (Diversilab platform)	1	(33)
2017	-	1	(34)
2017	-	1	(35)
2017	FAFLP (fluorescent amplified fragment length polymorphism)	7	(36)
2017	MALDI-TOF tömegspektrometria	1	(37)
2017	AP-PCR (arbitrarily-primed PCR)	2	(38)
2017	mitokondriális DNS tipizálás, interdelta tipizálás, mikroszatellita tipizálás, kariotipizálás	1	(39)
2018	WGA (teljesgenom analízis)	21 (legtöbb az 5. referenciából származik)	(40)
2019	-	1	(41)

#### Hivatkozások az F1 táblázathoz:

- (1) Niault M, Thomas F, Prost J, Ansari FH, Kalfon P. Fungemia due to *Saccharomyces* species in a patient treated with enteral *Saccharomyces boulardii*. *Clin Infect Dis*. 1999;28(4):930.
- (2) Piarroux R, Millon L, Bardonnnet K, Vagner O, Koenig H. Are live *Saccharomyces* yeasts harmful to patients? *Lancet*. 1999;353(9167):1851–2.
- (3) Cesaro S, Chinello P, Rossi L, Zanesco L. *Saccharomyces cerevisiae* fungemia in a neutropenic patient treated with *Saccharomyces boulardii*. *Support Care Cancer*. 2000;8(6):504–5.
- (4) Rijnders BJA, Van Wijngaerden E, Verwaest C, Peetermans WE. *Saccharomyces* fungemia complicating *Saccharomyces boulardii* treatment in a non-immunocompromised host. *Intensive Care Med*. 2000;26(6):825.
- (5) Perapoch J, Planes AM, Querol A, López V, Martínez-Bendayán I, Tormo R, et al. Fungemia with *Saccharomyces cerevisiae* in two newborns, only one of whom had been treated with ultra-levura. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2000;19(6):468–70.
- (6) Hennequin C, Kauffmann-Lacroix C, Jobert A, Viard JP, Ricour C, Jacquemin JL, et al. Possible role of catheters in *Saccharomyces boulardii* fungemia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2000;19(1):16–20.
- (7) Hennequin C, Thierry A, Richard GF, Lecointre G, Nguyen H V, Gaillardin C, et al. Microsatellite typing as a new tool for identification of *Saccharomyces cerevisiae* strains. *J Clin Microbiol*. 2001;39(2):551–9.
- (8) Mallié M, Nguyen Van P, Bertout S, Vaillant C, J-M Bastide. Genotypic study of *Saccharomyces boulardii* compared to the *Saccharomyces sensu stricto* complex species. *J Mycol Med*. 2001;11(1):19–25.
- (9) Lherm T, Monet C, Nougère B, Soulier M, Larbi D, Le Gall C, et al. Seven cases of fungemia with *Saccharomyces boulardii* in critically ill patients. *Intensive Care Med*. 2002;28(6):797–801.
- (10) Lestin F, Pertschy A, Rimek D. Fungemia after oral treatment with *Saccharomyces boulardii* in a patient with multiple co-morbidities [in German]. *Dtsch Medi Wochenschr*. 2003;128(48):2531–3.
- (11) Lungarotti MS, Mezzetti D, Radicioni M. Methaemoglobinaemia with concurrent blood isolation of *Saccharomyces* and *Candida*. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2003;88(5):F446.
- (12) Erdem H, Cetin M, Timuroglu T, Cetin A, Yanar O, Pahsa A. Identification of yeasts in public hospital primary care patients with or without clinical vaginitis. *Aust NZ J Obstet Gynaecol*. 2003;43(4):312–6.
- (13) Cassone M, Serra P, Mondello F, Girolamo A, Scafetti S, Pistella E, et al. Outbreak of *Saccharomyces cerevisiae* subtype *boulardii* fungemia in patients neighboring those treated with a probiotic preparation of the organism. *J Clin Microbiol*. 2003;41(11):5340–3.
- (14) Riquelme AJ, Calvo MA, Guzmán AM, Depix MS, García P, Pérez C, Arrese M, et al. *Saccharomyces cerevisiae* fungemia after *Saccharomyces boulardii* treatment in immunocompromised patients. *J Clin Gastroenterol*. 2003;36(1):41–3.
- (15) Henry S, D'Hondt L, André M, Holemans X, Canon JL. *Saccharomyces cerevisiae* fungemia in a head and neck cancer patient: A case report and review of the literature. *Acta Clin Belgica*. 2004;59(4):220–2.

- (16) Cherifi S, Robberecht J, Miendje Y. *Saccharomyces cerevisiae* fungemia in an elderly patient with *Clostridium difficile* colitis. *Acta Clin Belg*. 2004;59(4):223–4.
- (17) de Llanos R, Querol A, Planes AM, Fernández-Espinar MT. Molecular characterization of clinical *Saccharomyces cerevisiae* isolates and their association with non-clinical strains. *Syst Appl Microbiol*. 2004;27(4):427–35.
- (18) Burkhardt O, Köhnlein T, Pletz MW, Welte T. *Saccharomyces boulardii* induced sepsis: Successful therapy with voriconazole after treatment failure with fluconazole. *Scand J Infect Dis*. 2005;37(1):69–72.
- (19) Belet N, Dalğç N, Öncel S, Ciftçi E, İnce E, Güriz H, et al. Catheter-related fungemia caused by *Saccharomyces cerevisiae* in a newborn. *Pediatr Infect Dis J*. 2005;24(12):1125.
- (20) Muñoz P, Bouza E, Cuenca-Estrella M, Eiros JM, Pérez MJ, Sánchez-Somolinos M, et al. *Saccharomyces cerevisiae* Fungemia: an emerging infectious disease. *Clin Infect Dis*. 2005;40(11):1625–34.
- (21) Posteraro B, Sanguinetti M, Romano L, Torelli R, Novarese L, Fadda G. Molecular tools for differentiating probiotic and clinical strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Int J Food Microbiol*. 2005;103(3):295–304.
- (22) de Llanos R, Querol A, Pemán J, Gobernado M, Fernández-Espinar MT. Food and probiotic strains from the *Saccharomyces cerevisiae* species as a possible origin of human systemic infections. *Int J Food Microbiol*. 2006;110(3):286–90.
- (23) Piechno S, Seguin P, Gangneux J-P. *Saccharomyces boulardii* fungal sepsis: beware of the yeast [in French]. *Can J Anesth*. 2007;54(3):245–6.
- (24) Lolis N, Veldekis D, Moraitou H, Kanavaki S, Velegraki A, Triandafyllidis C, et al. *Saccharomyces boulardii* fungaemia in an intensive care unit patient treated with caspofungin. *Crit Care*. 2008;12(2):414.
- (25) Stefanatou E, Kompoti M, Paridou A, Koutsodimitropoulos I, Giannopoulou P, Markou N, et al. Probiotic sepsis due to *Saccharomyces* fungaemia in a critically ill burn patient. *Mycoses*. 2011;54(5):e643–6.
- (26) Silva FHA da, Paço FR, Reis E, Amaral V. *Saccharomyces cerevisiae* infection – an unusual pathogen in the ICU [in Portuguese]. *Rev Bras Ter Intensiva*. 2011;23(1):108–11.
- (27) Thygesen JB, Glerup H, Tarp B. *Saccharomyces boulardii* fungemia caused by treatment with a probioticum. *BMJ Case Rep*. 2012;2012(pii):bcr0620114412.
- (28) Chioukh FZ, Ben Hmida H, Ben Ameer K, Toumi A, Monastiri K. *Saccharomyces cerevisiae* fungemia in a premature neonate treated receiving probiotics [in French]. *Med Mal Infect*. 2013;43(8):359–60.
- (29) Eren Z, Gurol Y, Sonmezoglu M, Eren HS, Celik G, Kantarci G. *Saccharomyces cerevisiae* fungemia in an elderly patient following probiotic treatment. *Mikrobiyol Bul*. 2014;48(2):351–5.
- (30) Santino I, Alari A, Bono S, Teti E, Marangi M, Bernardini A, et al. *Saccharomyces cerevisiae* Fungemia, a possible consequence of the treatment of *Clostridium Difficile* Colitis with a probioticum. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2014;27(1):143–6.
- (31) Ellouze O, Berthoud V, Mervant M, Parthiot JP, Girard C. Septic shock due to *Saccharomyces boulardii*. *Med Mal Infect*. 2016;46(2):104–5.
- (32) Zhu YO, Sherlock G, Petrov DA. Whole genome analysis of 132 clinical *Saccharomyces cerevisiae* strains reveals extensive ploidy variation. *G3 (Bethesda)*. 2016;6(8):2421–34.
- (33) Martin IW, Tonner R, Trivedi J, Miller H, Lee R, Liang X, et al. *Saccharomyces boulardii* probiotic-associated fungemia: questioning the safety of this preventive probiotic's use. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2017;87(3):286–8.
- (34) Atıcı S, Soysal A, Karadeniz Cerit K, Yılmaz Ş, Aksu B, Kıyan G, et al. Catheter-related *Saccharomyces cerevisiae* fungemia following *Saccharomyces boulardii* probiotic treatment: In a child in intensive care unit and review of the literature. *Med Mycol Case Rep*. 2017;15:33–5.
- (35) Romano MR, Coraine LA, Maielo VP, Abramczyc ML, Souza RL de, Oliveira NF. Fungemia por *Saccharomyces cerevisiae* em paciente pediátrico após tratamento com probiótico. *Rev Paul Pediatr*. 2017;35(3):361–4.
- (36) Roy U, Jessani LG, Rudramurthy SM, Gopalakrishnan R, Dutta S, Chakravarty C, et al. Seven cases of *Saccharomyces* fungaemia related to use of probiotics. *Mycoses*. 2017;60(6):375–80.
- (37) Appel-da-Silva MC, Narvaez GA, Perez LRR, Drehmer L, Lewgoy J. *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* fungemia following probiotic treatment. *Med Mycol Case Rep*. 2017;18:15–7.
- (38) Kara I, Yıldırım F, Özgen Ö, Erganiş S, Aydoğdu M, Dizbay M, et al. *Saccharomyces cerevisiae* fungemia after probiotic treatment in an intensive care unit patient. *J Mycol Med*. 2018;28(1):218–21.
- (39) Pfliegler WP, Boros E, Pázmándi K, Jakab Á, Zsuga I, Kovács R, et al. Commercial strain-derived clinical *Saccharomyces cerevisiae* can evolve new phenotypes without higher pathogenicity. *Mol Nutr Food Res*. 2017;61(11):1601099.
- (40) Peter J, De Chiara M, Friedrich A, Yue J-X, Pflieger D, Bergstrom A, et al. Genome evolution across 1,011 *Saccharomyces cerevisiae* isolates. *Nature*. 2018;556(7701):339–44.
- (41) Fadhel M, Patel S, Liu E, Levitt M, Asif A. *Saccharomyces cerevisiae* fungemia in a critically ill patient with acute cholangitis and long term probiotic use. *Med Mycol Case Rep*. 2019;23:23–5.

**F2. táblázat** A tanulmányban szekvenált gének GenBank akcessziós számai

Törzs azonosító	<i>CCAI</i>	<i>CYT1</i>	<i>HMX1</i>	<i>ITS</i>	<i>NUP116</i>
PY0001	MK514561	MK514568	MK514575	MK504362	MK514582
PY0002	MK514562	MK514569	MK514576	MK504363	MK514583
PY0003	MK514563	MK514570	MK514577	MK504364	MK514584
PY0004	MK514564	MK514571	MK514578	MK504365	MK514585
DE6507	MK514566	MK514573	MK514581	MK504367	MK514587
DE35762	MK514567	MK514574	MK514580	MK504368	MK514588
DE27290	MK993592	MK993604	MK993626	olvashatatlan, heterozigóta	MK993616
DE27020	MK514565	MK514572	MK514579	MK504366	MK514586
DE29607	MK993601	MK993613	olvashatatlan, heterozigóta	olvashatatlan, heterozigóta	MK993625
DE11595	MK993593	MK993605	MK993627	MK967982	MK993617
DE42533	MK993597	MK993609	MK993631	MK967984	MK993621
DE42651	MK993591	MK993603	részleges, heterozigóta szekvencia, GenBankba nem került feltöltésre	MK967981	MK993615
DE42807	MK993598	MK993610	MK993632	MK967986	MK993622
DE43763	MK993590	MK993602	olvashatatlan, heterozigóta	olvashatatlan, heterozigóta	MK993614
DE45866	MK993599	MK993611	MK993633	MK967985	MK993623
DE342	MK993595	MK993607	MK993629	olvashatatlan, heterozigóta	MK993619
DE722	MK993600	MK993612	MK993634	olvashatatlan, heterozigóta	MK993624
DE3912	MK993596	MK993608	MK993630	MK967983	MK993620
DE10397	MK993594	MK993606	MK993628	olvashatatlan, heterozigóta	MK993618

A Multiplex PCR tanulmány egyéb kiegészítő fájlljai:

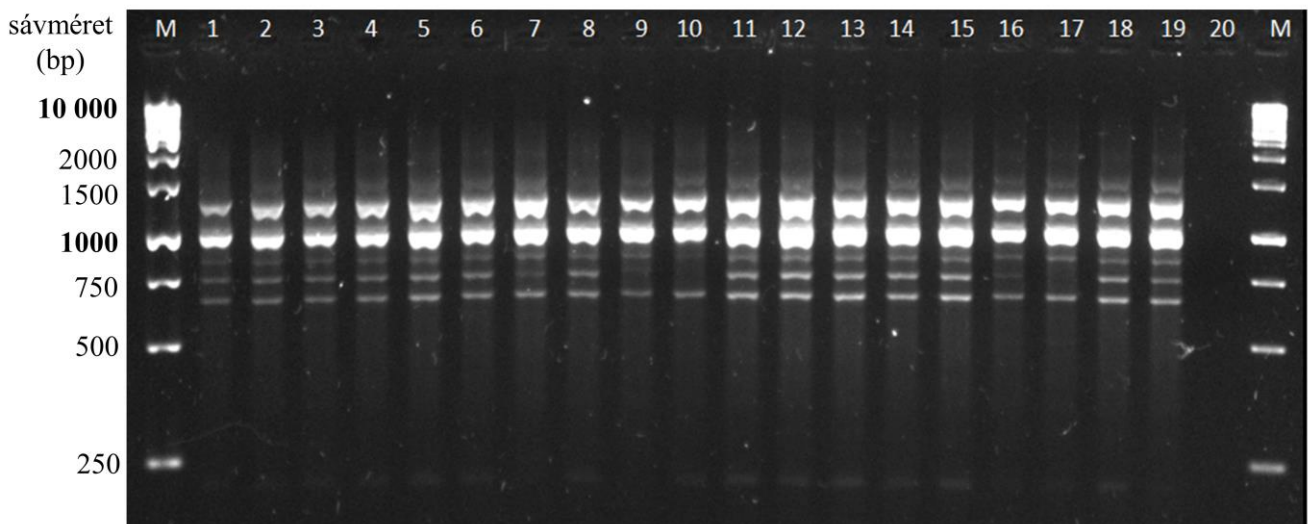
FigShare-be feltöltött szekvencia illesztések:

- A négy gén és az ITS régió konkatenált alignment-je
  - 1\_Concatenated\_alignment.fas
- Génenkénti illesztések, a DE10397 szétszedett haplotípusaival
  - CCA1\_alignment\_Alleles\_phased\_out\_for\_DE10397.fas
  - CYT1\_alignment\_Alleles\_phased\_out\_for\_DE10397.fas
  - HMX1\_alignment\_Alleles\_phased\_out\_for\_DE10397.fas
  - NUP116\_alignment\_Alleles\_phased\_out\_for\_DE10397.fas

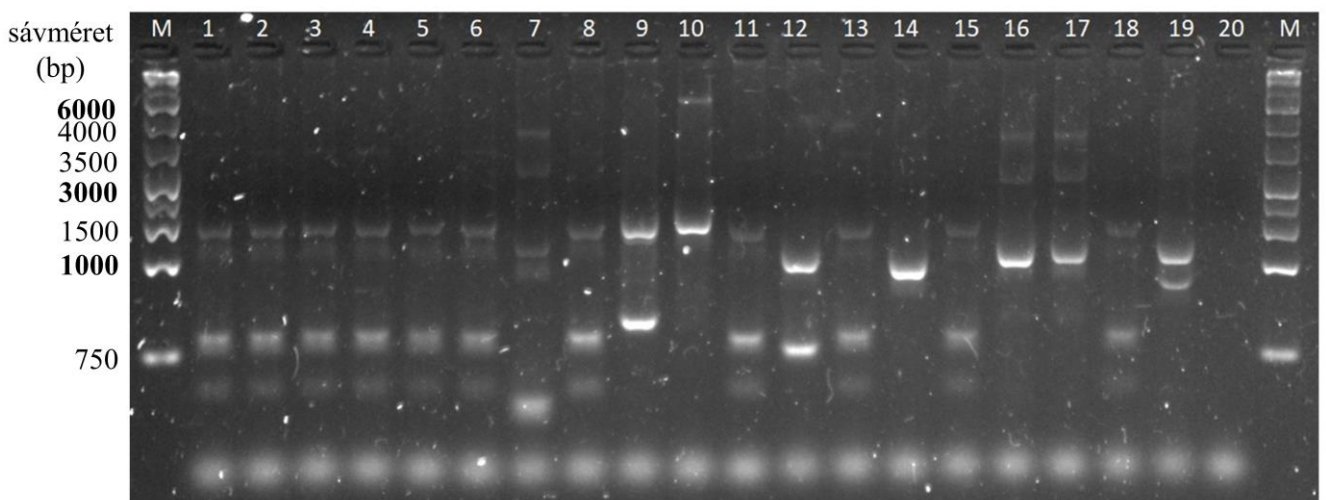
FigShare-be feltöltött dendrogram:

- 1\_Concatenated\_alignment.nwk

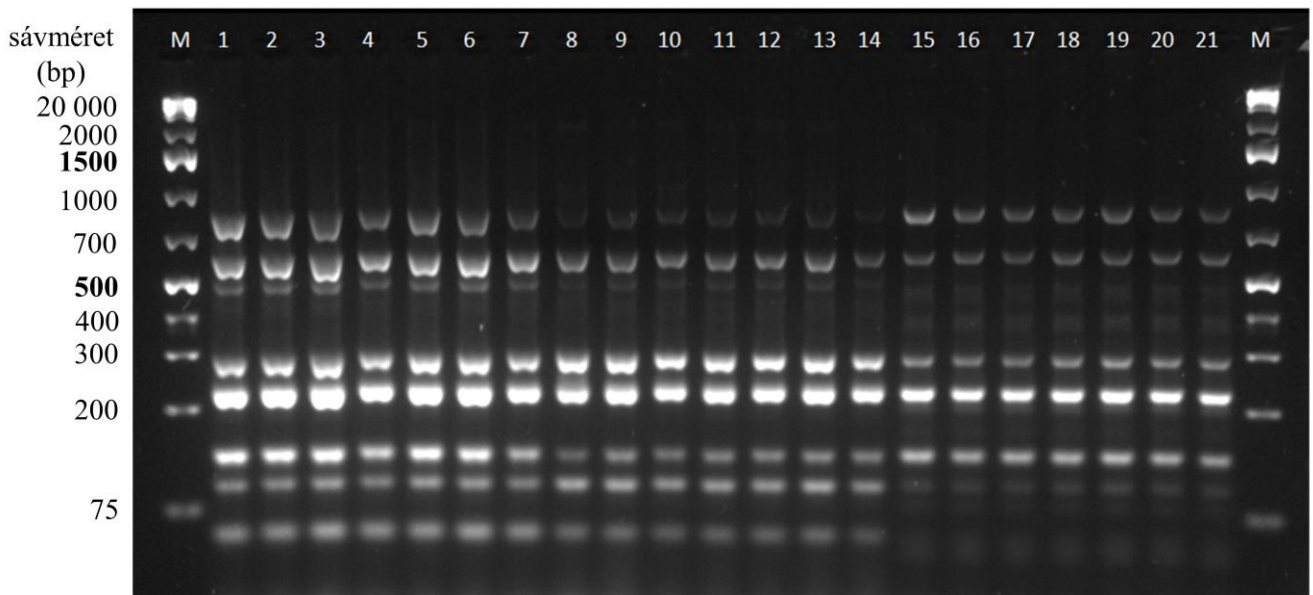
FigShare link: <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.8114258>



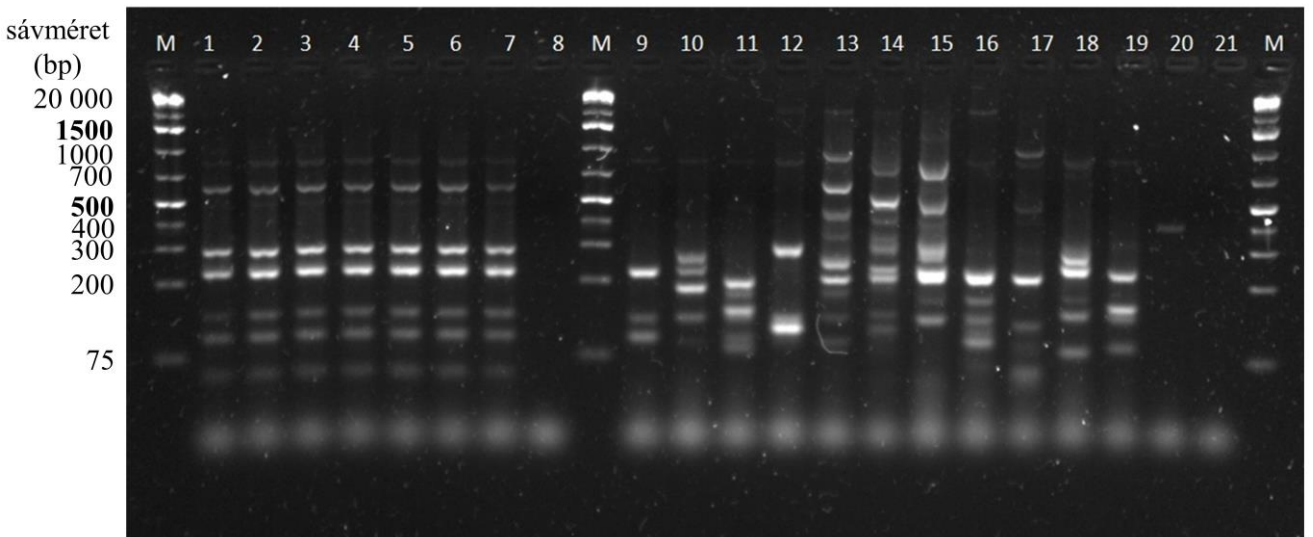
**F1. ábra** MSP-PCR analízissel kapott sávmintázatok klinikai és kereskedelmi élesztők esetén. Enzim: GoTaq G2 polimeráz. A gél elektroforézis során 6  $\mu$ l termék került futtatásra, 1,2% TBE agaróz gélen, 1 órán keresztül, 100 V feszültség mellett. M: Gene Ruler 1 kb marker; 1: PY0001; 2: PY0002; 3: PY0003; 4: PY0004; 5: DE6507; 6: DE35762; 7: DE27290; 8: DE27020; 9: DE29607; 10: DE11595; 11: DE42533; 12: DE42651; 13: DE42807; 14: DE43763; 15: DE45866; 16: DE342; 17: 722; 18: DE3912; 19: DE10397; 20: negatív kontrol.



**F2. ábra** Az interdelta analízissel kapott sávmintázatok klinikai és kereskedelmi élesztők esetén. Enzim: GoTaq G2 polimeráz. A gél elektroforézis során 4  $\mu$ l termék került futtatásra, 2% TBE agaróz gélen, 1 órán keresztül, 100 V feszültség mellett. M: Gene Ruler 1 kb marker (Thermo Fischer Scientific). 1: PY0001; 2: PY0002; 3: PY0003; 4: PY0004; 5: DE6507; 6: DE35762; 7: DE27290; 8: DE27020; 9: DE29607; 10: DE11595; 11: DE42533; 12: DE42651; 13: DE42807; 14: DE43763; 15: DE45866; 16: DE342; 17: 722; 18: DE3912; 19: DE10397; 20: negatív kontrol.



**F3. ábra** Multiplex PCR módszerrel kapott sávmintázatok *S. 'boulardii'* izolátumok esetén. A genomi és kolónia DNS, és a különböző enzimek alkalmazásakor kapott eredmények összehasonlítása. A gél elektroforézis során 5 µl termék került futtatásra, 2% TBE agaróz gélen, 1,5 órán keresztül, 100 V feszültség mellett. 1–7 minta: GoTaq G2 polimeráz és genomi DNS. 8–14 minta: GoTaq G2 polimeráz és kolónia DNS. 15–21 minta: DreamTaq polimeráz, genomi DNS. Izolátumok: 1: PY0001; 2: PY0002; 3: PY0003; 4: PY0004; 5: DE27020; 6: DE6507; 7: DE35762; M: Gene Ruler 1 kb Plus marker (Thermo Fisher Scientific).



**F4. ábra** Az új Multiplex PCR módszerrel kapott sávmintázatok az izolátumok jellemzése során. A probiotikum és probiotikum rokon klinikai élesztők sávmintázatának összehasonlítása a különböző eredetű *S. cerevisiae* törzsekkel és izolátumokkal. Enzim: GoTaq G2 polimeráz. A gél elektroforézis során 5 µl termék került futtatásra, 2% TBE agaróz gélen, 1 órán keresztül, 100 V feszültség mellett. M: Gene Ruler 1 kb Plus marker; 1: PY0001; 2: PY0002; 3: PY0003; 4: PY0004; 5: DE27020; 6: DE6507; 7: DE35762; 8: negative control; 9: 1. Tokaj bor izolátum; 10: 2. Tokaj bor izolátum; 11: 3. Tokaj bor izolátum; 12: 1. kereskedelmi bor starter kultúra; 13: 2. kereskedelmi bor starter kultúra; 14: 1. kereskedelmi pékélesztő; 15: 2. kereskedelmi pékélesztő; 16: 3. kereskedelmi pékélesztő; 17: 1. bioetanol törzs; 18: S288c labortörzs; 19: kliniaki izolátum, légszó [197]; 20: *Clavispora lusitaniae* izolátum (félreidentifikálva MALDI-TOF-al *S. cerevisiae*-nek); 21: negatív kontrol.

**F3. táblázat** A mikroszatellita allélek trinukleotid ismétlődései (1: van; 0: nincs), melyeket a Bruvo-féle távolság kiszámítására használtunk. Fontos megjegyezni, hogy a *YOR267c*-ben lévő mikroszatellita néhány *S. cerevisiae* törzs esetében CAG ismétlődést is tartalmaz a CAA ismétlődések mellett (Társszerzői eredmény: Lovászné Rácz Hanna Viktória, Dr. Pfliegler Valter Péter, Molekuláris Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszék).

	<i>YLR177w</i>						<i>YOR267c</i>									
	(CAG) <sub>4</sub>	(CAG) <sub>5</sub>	(CAG) <sub>9</sub>	(CAG) <sub>10</sub>	(CAG) <sub>11</sub>	(CAG) <sub>12</sub>	(CAA) <sub>11</sub>	(CAA) <sub>13</sub>	(CAA) <sub>14</sub>	(CAA) <sub>17</sub>	(CAA) <sub>18</sub>	(CAA) <sub>20</sub>	(CAA) <sub>25</sub>	(CAA) <sub>31</sub>	(CAA) <sub>41</sub>	
<b>PY0001</b>	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	
<b>PY0002</b>	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	
<b>PY0003</b>	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	
<b>PY0004</b>	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	
<b>DE27020</b>	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	
<b>DE6507</b>	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	
<b>DE35762</b>	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	
<b>DE42533</b>	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	
<b>DE42807</b>	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	
<b>DE45866</b>	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	
<b>DE3912</b>	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	
<b>DE10397</b>	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	
<b>DE342</b>	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	
<b>DE722</b>	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	
<b>DE43763</b>	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	
<b>DE29607</b>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	
<b>DE11595</b>	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	
<b>DE42651</b>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
<b>DE27290</b>	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	

**F4. táblázat** A *S. 'boulardii* izolátumok általános fenotipizálása: telepmorfológia, killer aktivitás, spórázási százalék, petite-teszt, MAT lókusztipizálás

Izolátumok	Telepmorfológia		Killer aktivitás			Spórázás (%)		Petite-teszt, GlyYP 30 °C 10. nap	MAT lókusztipizálás
	YPD 37 °C 10. nap	GlyYP 37 °C 30. nap (telepek öregedése)	Killer toxin 1 érzékenység	Killer toxin 2 érzékenység	Killer toxin termelés	K-Ac 37 °C 10. nap	K-Ac 25 °C 10. nap		
PY0001	sima felszín, fehér	egyszerű: sima felszín, enyhén szektoros, fehér	van	van	nincs	0%	0%	0,29%	a/α
PY0002	sima felszín, fehér	egyszerű: sima felszín, enyhén szektoros, fehér simple: smooth, slightly sectored, white	van	van	nincs	0%	0%	0%	a/α
PY0003	sima felszín, fehér	összetett: rücskös felszín, közepesen szektoros, fehér	van	van	nincs	0%	0%	0,31%	a/α
PY0004	sima felszín, fehér	összetett: rücskös felszín, közepesen szektoros, fehér	van	van	nincs	0%	0%	0,30%	a/α
DE6507	sima felszín, fehér	összetett: rücskös felszín, erősen szektoros (a szektorokon belül nagy szubkolóniák vannak), fehér	van	van	nincs	0%	0%	0,33%	a/α
DE35762	sima <u>felszín</u> , fehér	összetett: erősen rücskös felszín, szektoros, sárgásbarna	van	van	nincs	0%	0%	0,86%	a/α
DE27020	sima felszín, fehér	egyszerű: sima felszín, közepesen szektoros, fehér	van	van	nincs	0%	0%	0,27%	a/α
DE3912	sima felszín, fehér	összetett: rücskös felszín, enyhén szektoros, fehér	van	van	nincs	0%	0%	0,31%	a/α
DE42533	sima felszín, fehér	összetett: rücskös felszín, enyhén szektoros, fehér	van	van	nincs	0%	0%	1,03%	a/α
DE42807	sima felszín, fehér	összetett: rücskös felszín, enyhén szektoros, fehér	van	van	nincs	0%	0%	0,84%	a/α
DE45866	sima felszín, fehér	összetett: rücskös felszín, enyhén szektoros, fehér	van	van	nincs	0%	0%	1,57%	a/α
465/2018	sima felszín, fehér	összetett: sima felszín, közepesen szektoros, néhány rücskös felszínű telep, fehér	van	van	nincs	0%	0%	0,94%	a/α
551/2018	sima felszín, fehér	összetett: erősen rücskös felszín, szektoros, sárgásbarna	van	van	nincs	0%	0%	0,39%	a/α
2251/2018	sima felszín, fehér	összetett: sima felszín, erősen szektoros, fehér	van	van	nincs	0%	0%	1,11%	a/α

**F5. táblázat** *A. S. 'boulardii* izolátumok általános fenotípezése: termotolerancia, invazivitás agar táptalajon, flokkuláció és pszeudohifa növekedés folyékony tápközegben, antimikotikum érzékenység.

Izolátumok	Termotolerancia			Invazitivás agar táptalajon				Flokkuláció folyékony tápközegben	Pszeudohifa növekedés folyékony tápközegben (típus és a pszeudohifa előfordulása)			Antimikotikum érzékenység		
	37 °C	39 °C	42 °C	YPD 37 °C 10. nap	YPD 39 °C 2. nap	SLAD 37 °C 10. nap	SLG 37 °C 10. nap	folyékony YPD 37 °C 1–3 nap	folyékony YPD + 10% FBS 37 °C 1. nap	DMEM+10% FBS 37 °C 1–10 nap (Caco-2 transzmigrációs assay)	Amfotericin B MIC értékek (µg/mL)	Flukonazol MIC értékek (µg/mL)	Kaszpofungin MIC értékek (µg/mL)	
PY0001	+++	++	+	nincs	nincs	nincs	nincs	nincs	rövid, nagyrészt pszeudohifa	rövid, nagyrészt pszeudohifa	0,25	8	0,5	
PY0002	+++	++	+	nincs	nincs	nincs	nincs	nincs	rövid, nagyrészt pszeudohifa	rövid, nagyrészt pszeudohifa	0,25	8	0,5	
PY0003	+++	++	+-	nincs	nincs	nincs	nincs	nincs	rövid, nagyrészt pszeudohifa	rövid, nagyrészt pszeudohifa	0,125	4	0,5	
PY0004	+++	++	+-	nincs	nincs	nincs	nincs	nincs	rövid, nagyrészt pszeudohifa	rövid, nagyrészt pszeudohifa	0,25	8	0,5	
DE6507	+++	++	+-	nincs	nincs	nincs	nincs	nincs	rövid, nagyrészt pszeudohifa	rövid, nagyrészt pszeudohifa	0,25	8	0,25	
DE35762	+++	++	+-	nincs	nincs	nincs	nincs	nincs	rövid, nagyrészt pszeudohifa	rövid, nagyrészt pszeudohifa	0,25	8	0,25	
DE27020	+++	++	+-	nincs	nincs	nincs	nincs	nincs	rövid, nagyrészt pszeudohifa	rövid, nagyrészt pszeudohifa	0,25	4	0,25	
DE3912	+++	++	+-	nincs	nincs	nincs	nincs	nincs	rövid, nagyrészt pszeudohifa	rövid, nagyrészt pszeudohifa	0,25	4	0,25	
DE42533	+++	++	+-	nincs	nincs	nincs	nincs	nincs	rövid, nagyrészt élesztő sejtek	rövid, nagyrészt pszeudohifa	0,25	4	0,5	
DE42807	+++	++	+-	nincs	nincs	nincs	nincs	nincs	rövid, nagyrészt élesztő sejtek	rövid, nagyrészt pszeudohifa	0,25	8	0,25	
DE45866	+++	++	+-	nincs	nincs	nincs	nincs	nincs	rövid, nagyrészt élesztő sejtek	rövid, nagyrészt pszeudohifa	0,25	2	0,5	
465/2018	+++	++	+-	nincs	nincs	nincs	nincs	nincs	rövid, nagyrészt élesztő sejtek	rövid, nagyrészt pszeudohifa	0,25	8	0,25	
551/2018	+++	++	+-	nincs	nincs	nincs	nincs	nincs	rövid, majdnem kizárólag élesztő sejtek	rövid, nagyrészt pszeudohifa	0,25	4	0,25	
2251/2018	+++	++	-	nincs	nincs	nincs	nincs	nincs	nincs	rövid, nagyrészt pszeudohifa	0,25	4	0,25	

**F6. táblázat** A nagy hatású mutációk által érintett gének listája az egyes izolátumok genomjaiban, feltüntetve a génekre vonatkozó gén ontológia (GO) kifejezéseket.

Izolátumok listája	Érintett gének	Gének funkciójának hivatalos angol leírása a <i>Saccharomyces Genome Database</i> szerint
PY0002, 465/2018, 2251/2018, DE6507, DE35762	G0005430	annotáció során nem jellemzett
	G0005510	annotáció során nem jellemzett
	G0005990	annotáció során nem jellemzett
	G0008480	annotáció során nem jellemzett
	G0008490	annotáció során nem jellemzett
	G0008580	annotáció során nem jellemzett
	G0008590	annotáció során nem jellemzett
	G0008670	annotáció során nem jellemzett
	G0027120	annotáció során nem jellemzett
	G0028660	annotáció során nem jellemzett
	G0028710	annotáció során nem jellemzett
	G0028750	annotáció során nem jellemzett
	G0028760	annotáció során nem jellemzett
	G0029600	annotáció során nem jellemzett
	YCL014W	Guanine nucleotide exchange factor (GEF) for Cdc42p
	YCL024W	Protein kinase of the bud neck involved in the septin checkpoint
	YCR014C	DNA polymerase IV
YDL003W	Essential alpha-kleisin subunit of the cohesin complex	
YDL009C	Protein of unknown function	
YDL013W	Subunit of the Slx5-Slx8 SUMO-targeted Ub ligase (STUbl) complex	
YDL030W	Subunit of the SF3a splicing factor complex	
YEL016C	Nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase	
YJL002C	Alpha subunit of the oligosaccharyltransferase complex of the ER lumen	
YJL005W	Adenylate cyclase	
YJL023C	Protein of unknown function	
YJL070C	Putative metallo-dependent hydrolase superfamily protein	
YJL071W	Acetylglutamate synthase (glutamate N-acetyltransferase)	
YJL076W	Core subunit of the RENT complex	
YJR050W	Member of the NineTeen Complex (NTC)	
YJR053W	Subunit of a two-component GTPase-activating protein, Bfa1p-Bub2p	
YPL105C	Protein of unknown function that influences nuclear pore distribution	
YPL116W	Trichostatin A-insensitive homodimeric histone deacetylase (HDAC)	
YPL119C-A	Putative protein of unknown function	
PY0001, PY0002, 465/2018, 2251/2018, DE6507	YBR132C	Plasma membrane regulator of polyamine and carnitine transport
	YER083C	Subunit of the GET complex
PY0001, PY0002, 2251/2018, DE35762, DE6507	YDL039C	Pheromone-regulated protein
	YFR028C	Protein phosphatase required for mitotic exit
PY0001, 2251/2018, DE35762	G0029090	dubious/partial
PY0001, 2251/2018	YOR305W	Protein of unknown function
2251/2018	YEL013W	Vacuole-specific Myo2p receptor
DE6507	YHR080C	Sterol-binding protein that localizes to puncta in the cortical ER
	YMR127C	Histone acetyltransferase (HAT) catalytic subunit of the SAS complex
DE35762	YKR101W	Protein involved in silencing at mating-type loci HML and HMR

Mind a 6 izolátum	G000760	annotáció során nem jellemzett
	G0002090	annotáció során nem jellemzett
	G0002480	annotáció során nem jellemzett
	G0006270	annotáció során nem jellemzett
	G0008130	annotáció során nem jellemzett
	G0008160	annotáció során nem jellemzett
	G0008510	annotáció során nem jellemzett
	G0016810	annotáció során nem jellemzett
	G0017310	annotáció során nem jellemzett
	G0017400	annotáció során nem jellemzett
	G0029090	annotáció során nem jellemzett
	G0029890	annotáció során nem jellemzett
	G0031090	annotáció során nem jellemzett
	G0034190	annotáció során nem jellemzett
	G0036200	annotáció során nem jellemzett
	G0040610	annotáció során nem jellemzett
	G0048920	annotáció során nem jellemzett
	YAR027W	Putative integral membrane protein of unknown function
	YBR058C	Ubiquitin-specific protease
	YBR148W	Protein required for normal prospore membrane formation
	YBR260C	GTPase-activating protein (RhoGAP) for Rho3p and Rho4p
	YCL049C	Protein of unknown function
	YCL051W	Protein involved in control of cell wall structure and stress response
	YCR091W	Putative serine/threonine protein kinase
	YCR100C	Protein involved in protein sorting
	YCR106W	Putative zinc cluster transcription factor
	YCL049C	Protein of unknown function
	YDL109C	Putative lipase
	YDL171C	NAD(+)-dependent glutamate synthase (GOGAT)
	YER093C	Subunit of TORC2 (Tor2p-Lst8p-Avo1-Avo2-Tsc11p-Bit61p)
	YFL018C	Dihydrolipoamide dehydrogenase
	YFR047C	Quinolate phosphoribosyl transferase
	YIR003W	Subunit of a complex that associates with actin filaments
	YJL050W	RNA duplex-sensing translocase
	YJR040W	Voltage-gated chloride channel
	YJR131W	Alpha-1,2-mannosidase
	YJR134C	Protein of unknown function
	YJR148W	Cytosolic branched-chain amino acid (BCAA) aminotransferase
	YKR002W	Poly(A) polymerase
	YLR006C	Cytoplasmic phosphorelay intermediate osmosensor and regulator
	YLR078C	v-SNARE (vesicle specific SNAP receptor)
	YLR145W	Subunit of RNase MRP
	YNL113W	RNA polymerase subunit AC19
	YNL317W	Integral subunit of the pre-mRNA CPF complex
	YOR032C	bHLH protein with similarity to myc-family transcription factors
	YOR037W	Mitochondrial peripheral inner membrane protein
	YOR043W	Negative regulator of TORC1 in response to limiting leucine

**F7. táblázat** A közepes hatású mutációk által érintett gének listája az egyes izolátumok genomjaiban, feltüntetve a génekre vonatkozó gén ontológia (GO) kifejezéseket.

Izolátumok listája	Érintett gének	Gének funkciójának hivatalos angol leírása a <i>Saccharomyces</i> Genome Database szerint
PY0001, 465/2018, 2251/2018, DE6507, DE35762	YLR086W	Subunit of the condensin complex
PY0001, PY0002, 2251/2018, DE6507, DE35762	YFR003C	Regulatory subunit of the type I protein phosphatase (PP1) Glc7p
	YPL061W	Cytosolic aldehyde dehydrogenase
	YPL064C	Component of a complex containing Cef1p
	YPL065W	Component of the ESCRT-I complex
	YPL085W	COPII vesicle coat protein required for ER transport vesicle budding
	YPL101W	Subunit of hexameric RecA-like ATPase Elp456 Elongator subcomplex
	YPL104W	Mitochondrial aspartyl-tRNA synthetase
	YPL105C	Protein of unknown function that influences nuclear pore distribution
	YPL106C	ATPase component of heat shock protein Hsp90 chaperone complex
	YPL108W	Cytoplasmic protein of unknown function
	YPL110C	Glycerophosphocholine (GroPCho) phosphodiesterase
	YPL113C	Glyoxylate reductase
PY0001, PY0002, 465/2018, DE6507, DE35762	G0028750	not characterized during annotation
	G0028770	not characterized during annotation
	YBR036C	Endoplasmic reticulum membrane protein
	YBR037C	Copper-binding protein of mitochondrial inner membrane
	YCR045C	Probable subtilisin-family protease
	YJL092W	DNA helicase and DNA-dependent ATPase
	YJL106W	Serine/threonine protein kinase involved in activation of meiosis
	YJL111W	Subunit of the cytosolic chaperonin Cct ring complex
	YJL115W	Nucleosome assembly factor
	YJL123C	Protein of unknown function that may interact with ribosomes
PY0001, PY0002, 465/2018, 2251/2018, DE35762	YKR023W	Subunit of ribosome-associated quality control trigger complex (RQT)
	YKR024C	Putative ATP-dependent RNA helicase of the DEAD-box family
	YPL083C	Subunit of the tRNA splicing endonuclease
	YPL084W	Cytoplasmic class E vacuolar protein sorting (VPS) factor
	YPL126W	U3 snoRNP protein
	YPL130W	Meiosis-specific prospore protein
	YPL133C	Transcription factor involved in regulating gluconeogenesis
PY0001, PY0002, 465/2018, 2251/2018, DE6507	G0004120	not characterized during annotation
	YBR078W	GPI-anchored protein involved in efficient glucose uptake
	YBR081C	Subunit of the SAGA transcriptional regulatory complex
	YBR084W	Mitochondrial C1-tetrahydrofolate synthase
	YBR094W	Putative tubulin tyrosine ligase associated with P-bodies
	YBR097W	Serine/threonine protein kinase involved in vacuolar protein sorting
	YBR098W	Subunit of structure-specific Mms4p-Mus81p endonuclease
	YBR103W	WD40 repeat-containing subunit of Set3C histone deacetylase complex
	YBR115C	Alpha amino adipate reductase
	YBR122C	Mitochondrial ribosomal protein of the large subunit
	YBR136W	Genome integrity checkpoint protein and PI kinase superfamily member
	YBR141C	Nucleolar S-adenosylmethionine-dependent rRNA methyltransferase
	YBR156C	Subunit of the conserved chromosomal passenger complex (CPC)

	YBR222C	Oxalyl-CoA synthetase
	YBR225W	Putative protein of unknown function
	YBR260C	GTPase-activating protein (RhoGAP) for Rho3p and Rho4p
	YBR272C	Evolutionarily conserved 19S regulatory particle assembly-chaperone
<b>PY0001, PY0002, DE35762</b>	G0049070	not characterized during annotation
<b>PY0001, 2251/2018, DE35762</b>	G0029600	not characterized during annotation
<b>PY0001, PY0002</b>	YOL016C	Calmodulin-dependent protein kinase
	YOL023W	Mitochondrial translation initiation factor 2
	YOL025W	Protein that negatively regulates the SCF E3-ubiquitin ligase
	YOL036W	Protein of unknown function
	YOL040C	Protein component of the small (40S) ribosomal subunit
	YOL044W	Tail-anchored type II integral peroxisomal membrane protein
<b>PY0001</b>	YDL014W	Histone glutamine methyltransferase
<b>PY0002</b>	G0047510	not characterized during annotation
<b>2251/2018</b>	G0039660	not characterized during annotation
	YDR101C	Nuclear export factor for the ribosomal pre-60S subunit
	YDR513W	Cytoplasmic glutaredoxin
<b>DE6507</b>	YGL113W	Protein involved in the initiation of DNA replication
	YHR074W	Glutamine-dependent NAD(+) synthetase
	YKL062W	Stress-responsive transcriptional activator
<b>DE35762</b>	G0029090	not characterized during annotation
	YHR098C	Component of the Sec23p-Sfb3p heterodimer of the COPII vesicle coat
	YIL088C	Vacuolar amino acid transporter
	YJR111C	Peroxisomal matrix protein with naturally active promoter
	YKR101W	Protein involved in silencing at mating-type loci HML and HMR
	YLR383W	Subunit of the SMC5-SMC6 complex
	YLR398C	Ski complex component and putative RNA helicase
	YNL055C	Mitochondrial porin (voltage-dependent anion channel)
	YOR307C	Protein involved in ER-to-Golgi transport
<b>Mind a 6 izolátum</b>	G0000750	annotáció során nem jellemzett
	G0000760	annotáció során nem jellemzett
	G0000770	annotáció során nem jellemzett
	G0000800	annotáció során nem jellemzett
	G0001840	annotáció során nem jellemzett
	G0002090	annotáció során nem jellemzett
	G0005430	annotáció során nem jellemzett
	G0005450	annotáció során nem jellemzett
	G0006190	annotáció során nem jellemzett
	G0006260	annotáció során nem jellemzett
	G0007310	annotáció során nem jellemzett
	G0007670	annotáció során nem jellemzett
	G0008160	annotáció során nem jellemzett
	G0008510	annotáció során nem jellemzett
	G0008670	annotáció során nem jellemzett
	G0020230	annotáció során nem jellemzett
	G0026820	annotáció során nem jellemzett
	G0029590	annotáció során nem jellemzett
	G0029930	annotáció során nem jellemzett
	G0035540	annotáció során nem jellemzett
	G0049200	annotáció során nem jellemzett

	<i>G0049350</i>	annotáció során nem jellemzett
	<i>YAL007C</i>	Member of the p24 family involved in ER to Golgi transport
	<i>YAL008W</i>	Integral mitochondrial outer membrane (MOM) protein
	<i>YAL010C</i>	Subunit of both the ERMES and the SAM complex
	<i>YAL011W</i>	Protein of unknown function
	<i>YAL013W</i>	Component of the Rpd3L histone deacetylase complex
	<i>YAL014C</i>	Endosomal SNARE related to mammalian syntaxin 8
	<i>YAL018C</i>	Protein Involved in spore wall assembly
	<i>YAL019W</i>	Snf2p family member with ATP-dependent chromatin remodeling activity
	<i>YAL021C</i>	Component of the CCR4-NOT transcriptional complex
	<i>YAR002W</i>	FG-nucleoporin component of central core of the nuclear pore complex
	<i>YAR003W</i>	Subunit of the COMPASS (Set1C) complex
	<i>YAR007C</i>	Subunit of heterotrimeric Replication Protein A (RPA)
	<i>YAR014C</i>	Protein involved in bud-site selection
	<i>YAR018C</i>	Nonessential serine/threonine protein kinase
	<i>YAR027W</i>	Putative integral membrane protein of unknown function
	<i>YAR042W</i>	Protein similar to mammalian oxysterol-binding protein
	<i>YBL007C</i>	Cytoskeletal protein binding protein
	<i>YBL008W</i>	Subunit of the HIR complex
	<i>YBL009W</i>	Atypical protein kinase
	<i>YBL010C</i>	Clathrin adaptor (adaptin) accessory protein
	<i>YBL014C</i>	Component of the core factor (CF) rDNA transcription factor complex
	<i>YBL017C</i>	Type I transmembrane sorting receptor for multiple vacuolar hydrolases
	<i>YBL019W</i>	Class II abasic (AP) endonuclease involved in repair of DNA damage
	<i>YBL022C</i>	ATP-dependent Lon protease
	<i>YBL023C</i>	Protein involved in DNA replication
	<i>YBL024W</i>	S-adenosyl-L-methionine-dependent tRNA: m5C-methyltransferase
	<i>YBL032W</i>	RNA binding protein involved in asymmetric localization of ASH1 mRNA
	<i>YBL033C</i>	GTP cyclohydrolase II
	<i>YBL034C</i>	Microtubule plus-end-tracking non-motor protein
	<i>YBL035C</i>	B subunit of DNA polymerase alpha-primase complex
	<i>YBR001C</i>	Putative neutral trehalase, required for thermotolerance
	<i>YBR015C</i>	Alpha-1,2-mannosyltransferase
	<i>YBR020W</i>	Galactokinase
	<i>YBR021W</i>	Plasma membrane localized uracil permease
	<i>YBR023C</i>	Chitin synthase III
	<i>YBR033W</i>	Putative zinc cluster protein, predicted to be a transcription factor
	<i>YBR040W</i>	Integral membrane protein required for efficient mating
	<i>YBR043C</i>	Multidrug transporter of the major facilitator superfamily
	<i>YBR049C</i>	RNA polymerase I enhancer binding protein
	<i>YBR050C</i>	Regulatory subunit of the Glc7p type-1 protein phosphatase
	<i>YBR052C</i>	Protein of unknown function
	<i>YBR053C</i>	Putative protein of unknown function
	<i>YBR058C</i>	Ubiquitin-specific protease
	<i>YBR059C</i>	Ser/Thr protein kinase
	<i>YBR065C</i>	Pre-mRNA splicing factor
	<i>YBR074W</i>	Multi-spanning vacuolar membrane protease
	<i>YBR079C</i>	eIF3a subunit of the eukaryotic translation initiation factor 3 (eIF3)
	<i>YBR080C</i>	AAA ATPase and SNARE disassembly chaperone
	<i>YBR086C</i>	Cortical ER protein involved in ER-plasma membrane (PM) tethering

	YBR093C	Repressible acid phosphatase
	YBR101C	Hsp70 (Ssa1p) nucleotide exchange factor
	YBR102C	Exocyst subunit with dual roles in exocytosis and spliceosome assembly
	YBR112C	General transcriptional co-repressor
	YBR138C	Cytoplasmic protein of unknown function
	YBR140C	GTPase-activating protein
	YBR148W	Protein required for normal prospore membrane formation
	YBR150C	Protein of unknown function
	YBR152W	mRNA splicing factor, component of U4/U6.U5 tri-snRNP
	YBR153W	Diaminohydroxyphosphoribosylaminopyrimidine deaminase
	YBR163W	Mitochondrial 5'-3' exonuclease and sliding exonuclease
	YBR169C	Member of Hsp110 subclass of the heat shock protein 70 (HSP70) family
	YBR172C	GYF domain protein
	YBR175W	Essential subunit of the COMPASS (Set1C) complex
	YBR176W	Ketopantoate hydroxymethyltransferase
	YBR180W	Putative dityrosine transporter of the major facilitator superfamily
	YBR182C	MADS-box transcription factor involved in osmotic stress response
	YBR186W	Hexameric ring ATPase that remodels chromosome axis protein Hop1p
	YBR187W	Calcium and manganese transporter with higher affinity for Ca <sup>2+</sup>
	YBR196C	Glycolytic enzyme phosphoglucose isomerase
	YBR196C-A	Putative protein of unknown function
	YBR199W	Glycosyltransferase involved in protein glycosylation
	YBR204C	Serine hydrolase
	YBR207W	Putative high affinity iron transporter
	YBR208C	Urea amidolyase
	YBR229C	Glucosidase II catalytic subunit
	YBR253W	Subunit of the RNA polymerase II mediator complex
	YBR255W	Protein of unknown function
	YBR267W	Cytoplasmic pre-60S factor
	YBR270C	Subunit of TORC2 membrane-associated complex
	YBR271W	S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase
	YBR274W	Serine/threonine kinase and DNA damage checkpoint effector
	YBR275C	Protein involved in control of DNA replication
	YBR280C	F-Box protein involved in proteasome-dependent degradation of Aah1p
	YBR281C	Component of glutamine amidotransferase (GATase II)
	YCL004W	Phosphatidylglycerolphosphate synthase
	YCL014W	Guanine nucleotide exchange factor (GEF) for Cdc42p
	YCL018W	Beta-isopropylmalate dehydrogenase (IMDH)
	YCL024W	Protein kinase of the bud neck involved in the septin checkpoint
	YCL025C	Broad-specificity, low-affinity amino acid permease
	YCL027W	Membrane protein localized to the shmoo tip
	YCL029C	Microtubule-associated protein
	YCL030C	Multifunctional enzyme containing phosphoribosyl-ATP pyrophosphatase
	YCL036W	Protein of unknown function
	YCL039W	Subunit of GID Complex that binds directly to central component Vid30p
	YCL043C	Protein disulfide isomerase
	YCL048W-A	Putative protein of unknown function
	YCL052C	Component of glycosylphosphatidylinositol-mannosyltransferase I
	YCL054W	AdoMet-dependent methyltransferase
	YCR003W	Mitochondrial ribosomal protein of the large subunit

	YCR011C	Putative ATP-dependent permease of the ABC transporter family
	YCR014C	DNA polymerase IV
	YCR015C	Protein required for cold tolerance
	YCR017C	GPI lipid remodelase
	YCR032W	Protein homologous to Chediak-Higashi syndrome and Beige proteins
	YCR042C	TFIID subunit (150 kDa)
	YCR047C	Ribosome biogenesis factor
	YCR059C	Negative regulator of eIF2 kinase Gcn2p
	YCR065W	Forkhead transcription factor
	YCR075C	Protein involved in cystine transport
	YCR077C	Deadenylation-dependent mRNA-decapping factor
	YCR079W	Mitochondrial type 2C protein phosphatase (PP2C)
	YCR083W	Mitochondrial thioredoxin
	YCR089W	Cell wall adhesin, expressed specifically during mating
	YCR092C	Mismatch repair protein
	YCR093W	Subunit of the CCR4-NOT1 core complex
	YCR106W	Putative zinc cluster transcription factor
	YDL010W	Cis-Golgi localized monothiol glutaredoxin, binds Fe-S cluster
	YDL015C	Enoyl reductase
	YDL019C	Member of an oxysterol-binding protein family with seven members
	YDL024C	Protein of unknown function
	YDL025C	Putative protein kinase, potentially phosphorylated by Cdc28p
	YDL030W	Subunit of the SF3a splicing factor complex
	YDL033C	tRNA-specific 2-thiouridylase
	YDL035C	Plasma membrane G protein coupled receptor (GPCR)
	YDL036C	Mitochondrial tRNA:pseudouridine synthase
	YDL039C	Pheromone-regulated protein
	YDL044C	Mitochondrial protein that interacts with mitochondrial RNA polymerase
	YDL049C	Protein with similarity to Kre9p
	YDL052C	1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase
	YDL055C	GDP-mannose pyrophosphorylase (mannose-1-phosphate guanylyltransferase)
	YDL056W	Transcription factor
	YDL058W	Essential protein involved in vesicle-mediated ER to Golgi transport
	YDL065C	Chaperone and import receptor for newly-synthesized class I PMPs
	YDL070W	Protein involved in transcription initiation
	YDL073W	Scaffold protein in the HKR1 sub-branch of the Hog1p-signaling pathway
	YDL074C	E3 ubiquitin ligase
	YDL086W	Putative carboxymethylenebutenolidase
	YDL089W	Protein involved in regulation of mitotic exit
	YDL095W	Protein O-mannosyltransferase of the ER membrane
	YDL097C	Essential, non-ATPase regulatory subunit of the 26S proteasome lid
	YDL098C	Component of the U4/U6.U5 snRNP complex
	YDL099W	Cis-golgi localized protein involved in ER to Golgi transport
	YDL100C	Guanine nucleotide exchange factor for Gpa1p
	YDL102W	Catalytic subunit of DNA polymerase delta
	YDL104C	Protein involved in threonylcarbamoyl adenosine biosynthesis
	YDL106C	Homeobox transcription factor
	YDL109C	Putative lipase
	YDL113C	Sorting nexin family member
	YDL117W	SH3-domain protein located in the bud neck and cytokinetic actin ring

	YDL123W	Protein of unknown function
	YDL124W	NADPH-dependent alpha-keto amide reductase
	YDL134C	Catalytic subunit of protein phosphatase 2A, PP2A
	YDL136W	Ribosomal 60S subunit protein L35B
	YDL138W	Plasma membrane high glucose sensor that regulates glucose transport
	YDL139C	Nonhistone component of centromeric chromatin
	YDL140C	RNA polymerase II largest subunit B220
	YDL143W	Subunit of the cytosolic chaperonin Cct ring complex
	YDL145C	Alpha subunit of COPI vesicle coatomer complex
	YDL149W	Transmembrane protein involved in forming Cvt and autophagic vesicles
	YDL154W	Protein of the MutS family
	YDL155W	B-type cyclin involved in cell cycle progression
	YDL171C	NAD(+)-dependent glutamate synthase (GOGAT)
	YDL174C	Major mitochondrial D-lactate dehydrogenase
	YDL186W	Putative protein of unknown function
	YDL193W	Forms dehydrodolichyl diphosphate synthase complex with RER2 or SRT1
	YDR005C	Highly conserved negative regulator of RNA polymerase III
	YDR006C	Protein of unknown function
	YDR009W	Transcriptional regulator
	YDR390C	Subunit of heterodimeric nuclear SUMO activating enzyme E1 with Aos1p
	YEL007W	Transcriptional regulator of pseudohyphal growth
	YEL011W	Glycogen branching enzyme, involved in glycogen accumulation
	YER004W	Protein of unknown function
	YER007W	Microtubule effector required for tubulin heterodimer formation
	YER008C	Subunit of the exocyst complex
	YER022W	Subunit of the RNA polymerase II mediator complex
	YER033C	Protein of unknown function
	YER034W	Protein of unknown function
	YER039C	Protein of unknown function
	YER040W	Transcriptional activator in nitrogen catabolite repression system
	YER041W	Holliday junction resolvase
	YER042W	Methionine-S-sulfoxide reductase
	YER044C-A	Meiosis-specific protein involved in forming DSBs
	YER045C	ATF/CREB family basic leucine zipper (bZIP) transcription factor
	YER047C	Putative ATPase of the AAA family
	YER050C	Mitochondrial ribosomal protein of the small subunit
	YER051W	JmjC domain family histone demethylase specific for H3-K36
	YER054C	Putative regulatory subunit of protein phosphatase Glc7p
	YFL001W	tRNA:pseudouridine synthase
	YFL002C	Putative ATP-dependent RNA helicase
	YFL003C	Protein involved in meiotic recombination
	YFL012W	Putative protein of unknown function
	YFL013C	Subunit of the INO80 chromatin remodeling complex
	YFL017W-A	Core Sm protein Sm G
	YFL021W	Transcriptional activator of nitrogen catabolite repression genes
	YFL023W	Unconventional prefoldin protein involved in translation initiation
	YFL024C	Subunit of NuA4, an essential histone H4/H2A acetyltransferase complex
	YFL025C	GPI inositol deacylase of the endoplasmic reticulum (ER)
	YFL027C	GTPase-activating protein for yeast Rab family members
	YFR002W	Linker nucleoporin component of the nuclear pore complex (NPC)

	YFR005C	Conserved zinc-finger domain protein involved in pre-mRNA splicing
	YFR006W	Putative X-Pro aminopeptidase
	YFR015C	Glycogen synthase
	YFR019W	1-phosphatidylinositol-3-phosphate 5-kinase
	YFR022W	Alpha-arrestin involved in ubiquitin-dependent endocytosis
	YFR040W	Protein required for function of the Sit4p protein phosphatase
	YGL006W	Vacuolar Ca <sup>2+</sup> ATPase involved in depleting cytosol of Ca <sup>2+</sup> ions
	YGL008C	Plasma membrane P2-type H <sup>+</sup> -ATPase
	YGL009C	Isopropylmalate isomerase
	YGL013C	Transcription factor that regulates the pleiotropic drug response
	YGL014W	Member of the PUF protein family
	YGL015C	Formin inhibitor
	YGL016W	Karyopherin beta
	YGL023C	Phosphatidylinositol 3-phosphate binding protein
	YGL027C	Processing alpha glucosidase I
	YGL028C	Cell wall protein with similarity to glucanases
	YGL035C	Transcription factor involved in glucose repression
	YGL039W	Aldehyde reductase
	YGR014W	Mucin family member involved in various signaling pathways
	YHR211W	Lectin-like cell wall protein (flocculin) involved in flocculation
	YIL001W	Putative protein of unknown function
	YIL005W	ER protein with chaperone and co-chaperone activity
	YIL007C	Evolutionarily conserved 19S regulatory particle assembly-chaperone
	YIL017C	GID Complex subunit, serves as adaptor for regulatory subunit Vid24p
	YIL019W	Protein required for pre-rRNA processing
	YIL023C	Zinc transporter
	YIL036W	Basic leucine zipper (bZIP) transcription factor from ATF/CREB family involved in stress-responsive regulatory network
	YIL037C	Pheromone-regulated protein
	YIL038C	Component of the CCR4-NOT core complex, involved in mRNA decapping
	YIL041W	BAR domain protein that localizes to early and late Golgi vesicles
	YIL042C	Mitochondrial protein kinase
	YIR001C	Cytoplasmic RNA-binding protein
	YIR003W	Subunit of a complex that associates with actin filaments
	YIR006C	Part of actin cytoskeleton-regulatory complex Pan1p-Sla1p-End3p
	YIR007W	Steryl-beta-glucosidase with broad specificity for aglycones
	YIR008C	Subunit of DNA primase
	YIR010W	Essential component of the outer kinetochore MIND complex
	YIR018W	Basic leucine zipper (bZIP) iron-sensing transcription factor
	YJL001W	Beta 1 subunit of the 20S proteasome
	YJL002C	Alpha subunit of the oligosaccharyltransferase complex of the ER lumen
	YJL010C	Essential subunit of U3-containing 90S preribosome
	YJL025W	Component of the core factor (CF) rDNA transcription factor complex
	YJL027C	Putative protein of unknown function
	YJL029C	Component of the GARP (Golgi-associated retrograde protein) complex
	YJL042W	Microtubule-associated protein involved in microtubule organization
	YJL052W	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), isozyme 1
	YJL054W	Component of the mitochondrial TIM22 complex
	YJL056C	Zinc-regulated transcription factor
	YJL057C	Protein kinase of unknown cellular role
	YJL058C	Subunit of TORC2 membrane-associated complex

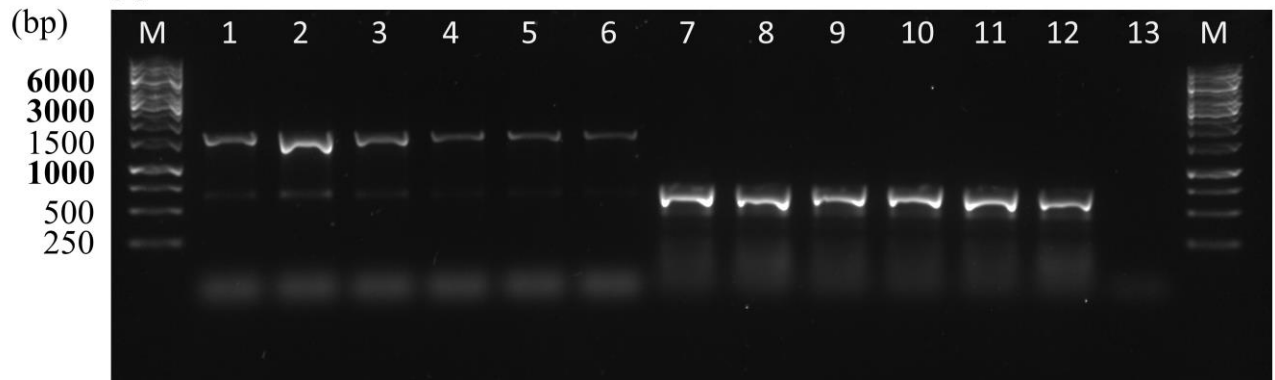
	<i>YJL060W</i>	Kynurenine aminotransferase
	<i>YJL063C</i>	Mitochondrial ribosomal protein of the large subunit
	<i>YJL073W</i>	DnaJ-like chaperone required for nuclear membrane fusion during mating
	<i>YJL074C</i>	Subunit of the multiprotein cohesin complex
	<i>YJL078C</i>	GPI-anchored cell wall protein involved in export of sterols
	<i>YJL080C</i>	Essential RNA-binding G protein effector of mating response pathway
	<i>YJL082W</i>	Protein required for clearance of inclusion bodies
	<i>YJL083W</i>	EH domain-containing protein
	<i>YJL089W</i>	C6 zinc cluster transcriptional activator
	<i>YJL094C</i>	Putative K <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> antiporter
	<i>YJL095W</i>	MAPKKK acting in the protein kinase C signaling pathway
	<i>YJL098W</i>	Protein that forms a complex with the Sit4p protein phosphatase
	<i>YJL099W</i>	Member of the ChAPs (Chs5p-Arf1p-binding proteins) family
	<i>YJL100W</i>	Type II phosphatidylinositol 4-kinase
	<i>YJL102W</i>	Mitochondrial elongation factor involved in translational elongation
	<i>YJL128C</i>	MAP kinase kinase of the HOG signaling pathway
	<i>YJL129C</i>	Component of the Trk1p-Trk2p potassium transport system
	<i>YJL130C</i>	Bifunctional carbamoylphosphate synthetase/aspartate transcarbamylase
	<i>YJR002W</i>	Component of the SSU processome and 90S preribosome
	<i>YJR005W</i>	Beta-adaptin
	<i>YJR008W</i>	Protein of unknown function
	<i>YJR013W</i>	Glycosylphosphatidylinositol- $\alpha$ 1,4 mannosyltransferase I
	<i>YJR016C</i>	Dihydroxyacid dehydratase
	<i>YJR017C</i>	Peptidylprolyl-cis/trans-isomerase (PPIase)
	<i>YJR024C</i>	5'-methylthioribulose-1-phosphate dehydratase
	<i>YJR031C</i>	Guanine nucleotide exchange factor for ADP ribosylation factors (ARFs)
	<i>YJR032W</i>	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (cyclophilin)
	<i>YJR033C</i>	Subunit of RAVE complex (Rav1p, Rav2p, Skp1p)
	<i>YJR035W</i>	Protein involved in transcription-coupled nucleotide excision repair
	<i>YJR039W</i>	Mitochondrial protein of unknown function
	<i>YJR041C</i>	Protein required for normal metabolism of the rRNA primary transcript
	<i>YJR043C</i>	Third subunit of DNA polymerase delta
	<i>YJR051W</i>	Fumarate reductase, catalyzes the reduction of fumarate to succinate
	<i>YJR054W</i>	Potassium transporter that mediates K <sup>+</sup> influx
	<i>YJR061W</i>	Protein required for N-glycan mannosylphosphorylation
	<i>YJR062C</i>	Amidase
	<i>YJR066W</i>	PIK-related protein kinase and rapamycin target
	<i>YJR076C</i>	Component of the septin ring that is required for cytokinesis
	<i>YJR077C</i>	Mitochondrial phosphate carrier
	<i>YJR078W</i>	Tryptophan 2,3-dioxygenase or indoleamine 2,3-dioxygenase
	<i>YJR083C</i>	Protein of unknown function
	<i>YJR089W</i>	Subunit of chromosomal passenger complex (CPC)
	<i>YJR094C</i>	Master regulator of meiosis that is active only during meiotic events
	<i>YJR094W-A</i>	Ribosomal 60S subunit protein L43B
	<i>YJR106W</i>	Protein involved in calcium homeostasis and exit from quiescence
	<i>YJR107W</i>	Putative lipase
	<i>YJR109C</i>	Large subunit of carbamoyl phosphate synthetase
	<i>YJR117W</i>	Highly conserved zinc metalloprotease
	<i>YJR121W</i>	Beta subunit of the F1 sector of mitochondrial F1F0 ATP synthase
	<i>YJR125C</i>	Protein containing an N-terminal epsin-like domain

	YJR132W	Karyopherin
	YJR134C	Protein of unknown function
	YJR136C	Subunit of the ASTRA complex, involved in chromatin remodeling
	YJR137C	Sulfite reductase beta subunit
	YJR138W	GTPase-activating protein (GAP) subunit of the Iml1p/SEACIT complex
	YJR139C	Homoserine dehydrogenase (L-homoserine:NADP oxidoreductase)
	YJR149W	Putative protein of unknown function
	YJR151C	Cell wall mannoprotein
	YJR152W	Allantoate permease
	YJR153W	Endo-polygalacturonase
	YJR154W	Putative protein of unknown function
	YJR155W	Putative aryl-alcohol dehydrogenase
	YKR002W	Poly(A) polymerase
	YKR008W	Component of the RSC chromatin remodeling complex
	YKR009C	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase and enoyl-CoA hydratase
	YKR011C	Protein of unknown function
	YKR018C	Protein of unknown function
	YKR019C	EH domain-containing protein
	YKR021W	Alpha arrestin, substrate of calcineurin
	YKR022C	Essential protein that forms a dimer with Ntr1p
	YKR029C	Defining member of the SET3 histone deacetylase complex
	YKR054C	Cytoplasmic heavy chain dynein
	YLL019C	Protein kinase involved in negative regulation of PolIII transcription
	YLL021W	Component of the polarisome
	YLR002C	Subunit of a nuclear complex with Noc2p and pre-replicative complexes
	YLR006C	Cytoplasmic phosphorelay intermediate osmosensor and regulator
	YLR014C	Zinc finger transcription factor
	YLR015W	Subunit of COMPASS (Set1C) complex
	YLR020C	Steryl ester hydrolase
	YLR021W	Component of a heterodimeric Poc4p-Irc25p chaperone
	YLR024C	Cytoplasmic ubiquitin-protein ligase (E3)
	YLR027C	Cytosolic aspartate aminotransferase involved in nitrogen metabolism
	YLR032W	DNA helicase/Ubiquitin ligase
	YLR039C	Protein involved in retrograde transport to the cis-Golgi network
	YLR059C	3'-5' RNA exonuclease
	YLR068W	Nucleolar protein required for maturation of 18S rRNA
	YLR069C	Mitochondrial elongation factor involved in translational elongation
	YLR082C	Protein of unknown function
	YLR084C	Protein required for the maintenance of bud site selection
	YLR087C	Protein with structural similarity to lipid transport protein Vps13p
	YLR106C	Huge dynein-related AAA-type ATPase (midasin)
	YLR108C	Protein of unknown function
	YLR113W	Mitogen-activated protein kinase involved in osmoregulation
	YLR114C	Conserved protein involved in exocytic transport from the Golgi
	YLR115W	Subunit of the mRNA cleavage and polyadenylation factor (CPF)
	YLR116W	Component of commitment complex
	YLR119W	Component of the ESCRT-I complex
	YLR120C	Aspartic protease
	YLR121C	Aspartic protease
	YLR126C	Putative glutamine amidotransferase

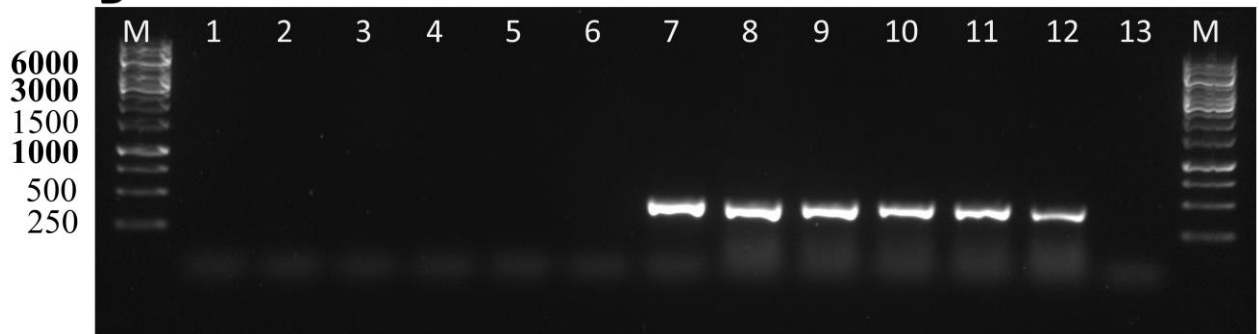
	<i>YLR129W</i>	Nucleolar protein
	<i>YLR131C</i>	Transcription factor required for septum destruction after cytokinesis
	<i>YLR136C</i>	mRNA-binding protein expressed during iron starvation
	<i>YLR138W</i>	Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> antiporter
	<i>YLR144C</i>	Intracellular beta-1,3-endoglucanase
	<i>YLR145W</i>	Subunit of RNase MRP
	<i>YLR146C</i>	Spermine synthase
	<i>YLR148W</i>	Component of CORVET membrane tethering complex
	<i>YML017W</i>	Asn rich cytoplasmic protein that contains RGG motifs
	<i>YML018C</i>	Protein of unknown function
	<i>YML043C</i>	Component of the core factor (CF) rDNA transcription factor complex
	<i>YML046W</i>	U1 snRNP protein involved in splicing
	<i>YML059C</i>	Serine esterase
	<i>YML061C</i>	DNA helicase, potent G-quadruplex DNA binder/unwinder
	<i>YML064C</i>	GTPase involved in initiation of Mitotic Exit Network (MEN)
	<i>YML065W</i>	Largest subunit of the origin recognition complex
	<i>YML068W</i>	Protein that modulates the efficiency of translation termination
	<i>YML071C</i>	Component of the conserved oligomeric Golgi complex
	<i>YML074C</i>	Nucleolar peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (PPIase)
	<i>YML076C</i>	Homodimeric Zn2Cys6 zinc finger transcription factor
	<i>YML091C</i>	Protein subunit of mitochondrial RNase P
	<i>YML093W</i>	Subunit of U3-containing Small Subunit (SSU) processome complex
	<i>YML097C</i>	Guanine nucleotide exchange factor (GEF) and ubiquitin receptor
	<i>YML099C</i>	Zinc finger transcription factor involved in arginine-responsive genes
	<i>YML102W</i>	Subunit of chromatin assembly factor I (CAF-1), with Rlf2p and Msi1p
	<i>YML103C</i>	Subunit of the inner ring of the nuclear pore complex (NPC)
	<i>YNL108C</i>	Protein phosphatase
	<i>YNL271C</i>	Formin
	<i>YNR006W</i>	Endosomal protein that forms a complex with Hse1p
	<i>YNR013C</i>	Low-affinity vacuolar phosphate transporter
	<i>YMR020W</i>	Polyamine oxidase
	<i>YMR086W</i>	Component of eisosome required for proper eisosome assembly
	<i>YMR152W</i>	Aldehyde reductase
	<i>YOL001W</i>	Cyclin
	<i>YOL004W</i>	Component of both the Rpd3S and Rpd3L histone deacetylase complexes
	<i>YOR005C</i>	DNA ligase required for nonhomologous end-joining (NHEJ)
	<i>YOR011W</i>	Plasma membrane sterol transporter of the ATP-binding cassette family
	<i>YOR014W</i>	B-type regulatory subunit of protein phosphatase 2A (PP2A)
	<i>YOR019W</i>	Protein of unknown function
	<i>YOR032C</i>	bHLH protein with similarity to myc-family transcription factors
	<i>YOR038C</i>	Subunit of HIR nucleosome assembly complex
	<i>YPL001W</i>	Catalytic subunit of the Hat1p-Hat2p histone acetyltransferase complex
	<i>YPL004C</i>	Eisosome core component
	<i>YPL009C</i>	Component of the Ribosome Quality Control (RQC) complex
	<i>YPL043W</i>	Nucleolar protein
	<i>YPL054W</i>	Zinc-finger protein of unknown function
	<i>YPL055C</i>	Protein involved in histone H2B ubiquitination
	<i>YPL057C</i>	Mannosylinositol phosphorylceramide (MIPC) synthase catalytic subunit
	<i>YPL078C</i>	Subunit b of the stator stalk of mitochondrial F1F0 ATP synthase
	<i>YPR003C</i>	Putative sulfate permease

	<i>YPR005C</i>	Cytoplasmic protein involved in halotolerance
	<i>YPR006C</i>	2-methylisocitrate lyase of the mitochondrial matrix
	<i>YPR011C</i>	Mitochondrial transporter

sávméret **A**



**B**



**F5. ábra** A *HMX1* gén deléciójának ellenőrzése PCR-rel. A) A teljes *HMX1* ORF amplifikálásakor kapott sávok és B) A rDNS amplifikálásakor kapott sávok a vad típusú izolátumok (1: PY0001; 2: PY0002; 3: 465/2018; 4: 2251/2018; 5: DE6507; 6: DE35762), és a mutáns törzsek (7: AI0001; 8: AI0003; 9: AI0005; 10: AI0007; 11: AI0009; 12: AI0011) esetében. A 13. minta negatív PCR kontroll volt (genomi DNS nélküli PCR reakció). M: 1 kb DNS létra (Thermo Fisher).

## IRODALOMJEGYZÉK

1. Alsammar, H.; Delneri, D. An update on the diversity, ecology and biogeography of the *Saccharomyces* genus. *FEMS Yeast Res.* **2020**, *20*, foaa013, doi: 10.1093/femsyr/foaa013.
2. Legras, J.-L.; Merdinoglu, D.; Cornuet, J.-M.; Karst, F. Bread, beer and wine: *Saccharomyces cerevisiae* diversity reflects human history. *Mol. Ecol.* **2007**, *16*, 2091–102, doi:10.1111/j.1365-294X.2007.03266.x.
3. Strobe, P.K.; Skelly, D.A.; Kozmin, S.G.; Mahadevan, G.; Stone, E.A.; Magwene, P.M.; Dietrich, F.S.; McCusker, J.H. The 100-genomes strains, an *S. cerevisiae* resource that illuminates its natural phenotypic and genotypic variation and emergence as an opportunistic pathogen. *Genome Res.* **2015**, *125*, 762–774, doi:10.1101/gr.185538.114.
4. Peter, J.; De Chiara, M.; Friedrich, A.; Yue, J.-X.; Pflieger, D.; Bergstrom, A.; Sigwalt, A.; Barré, B.; Freel, K.; Llored, A.; et al. Genome evolution across 1,011 *Saccharomyces cerevisiae* isolates. *Nature* **2018**, *556*, 339–344, doi:10.1038/s41586-018-0030-5.
5. Zagulski, M.; Herbert, C.J.; Rytka, J. Sequencing and functional analysis of the yeast genome. *Acta Biochim. Pol.* **1998**, *45*, 627–43, PMID: 9918489.
6. Li, G.; Ji, B.; Nielsen, J. The pan-genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* **2019**, *19*, foz064, doi: 10.1093/femsyr/foz064.
7. McFarland, L. V. Common organisms and probiotics: *Saccharomyces boulardii*. *The Microbiota in Gastrointestinal Pathophysiology: Implications for Human Health, Prebiotics, Probiotics, and Dysbiosis*; Elsevier Inc., **2017**; 145–164, ISBN 9780128040621.
8. Ventoulis, I.; Sarmourli, T.; Amoiridou, P.; Mantzana, P.; Exindari, M.; Gioula, G.; Vyzantiadis, T.-A. Bloodstream infection by *Saccharomyces cerevisiae* in two COVID-19 patients after receiving supplementation of *Saccharomyces* in the ICU. *J. Fungi* **2020**, *6*, 98, doi:10.3390/JOF6030098.
9. Fadhel, M.; Patel, S.; Liu, E.; Levitt, M.; Asif, A. *Saccharomyces cerevisiae* fungemia in a critically ill patient with acute cholangitis and long term probiotic use. *Med. Mycol. Case Rep.* **2019**, *23*, 23–25, doi:10.1016/j.mmcr.2018.11.003.
10. Chakravarty, S.; Parashar, A.; Acharyya, S. *Saccharomyces cerevisiae* sepsis following probiotic therapy in an infant. *Indian Pediatr.* **2019**, *56*, 971–972, PMID: 31729330.
11. Costa, R.L.; Moreira, J.; Lorenzo, A.; Lamas, C.C. Infectious complications following probiotic ingestion: A potentially underestimated problem? A systematic review of reports and case series. *BMC Complement. Altern. Med.* **2018**, *18*, 329, doi:10.1186/s12906-018-2394-3.
12. Sender, R.; Fuchs, S.; Milo, R. Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body. *PLoS Biol.* **2016**, *14*, e1002533, doi:10.1371/journal.pbio.1002533.
13. Fulde, M.; Hornef, M.W. Maturation of the enteric mucosal innate immune system during the postnatal period. *Immunol. Rev.* **2014**, *260*, 21–34, doi: 10.1111/imr.12190.
14. Kamada, N.; Chen, G.Y.; Inohara, N.; Núñez, G. Control of pathogens and pathobionts by the gut microbiota. *Nat. Immunol.* **2013**, *14*, 685–690, doi: 10.1038/ni.2608.
15. Ijssennagger, N.; Belzer, C.; Hooiveld, G.J.; Dekker, J.; Van Mil, S.W.C.; Müller, M.; Kleerebezem, M.; Van Der Meer, R.; Klaenhammer, T.R. Gut microbiota facilitates dietary heme-induced epithelial hyperproliferation by opening the mucus barrier in colon. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2015**, *112*, 10038–10043, doi:10.1073/pnas.1507645112.
16. Reinhardt, C.; Bergentall, M.; Greiner, T.U.; Schaffner, F.; Östergren-Lundén, G.; Petersen, L.C.; Ruf, W.; Bäckhed, F. Tissue factor and PAR1 promote microbiota-induced intestinal vascular remodelling. *Nature* **2012**, *483*, 627–631, doi:10.1038/nature10893.
17. Neuman, H.; Debelius, J.W.; Knight, R.; Koren, O. Microbial endocrinology: The interplay between the microbiota and the endocrine system. *FEMS Microbiol. Rev.* **2015**, *39*, 509–521, doi: 10.1093/femsre/fuu010.
18. Yano, J.M.; Yu, K.; Donaldson, G.P.; Shastri, G.G.; Ann, P.; Ma, L.; Nagler, C.R.; Ismagilov,

- R.F.; Mazmanian, S.K.; Hsiao, E.Y. Indigenous bacteria from the gut microbiota regulate host serotonin biosynthesis. *Cell* **2015**, *161*, 264–276, doi:10.1016/j.cell.2015.02.047.
19. Cho, I.; Yamanishi, S.; Cox, L.; Methé, B.A.; Zavadil, J.; Li, K.; Gao, Z.; Mahana, D.; Raju, K.; Teitler, I.; et al. Antibiotics in early life alter the murine colonic microbiome and adiposity. *Nature* **2012**, *488*, 621–626, doi:10.1038/nature11400.
  20. Canfora, E.E.; Jocken, J.W.; Blaak, E.E. Short-chain fatty acids in control of body weight and insulin sensitivity. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2015**, *11*, 577–591, doi: 10.1038/nrendo.2015.128.
  21. Yatsunencko, T.; Rey, F.E.; Manary, M.J.; Trehan, I.; Dominguez-Bello, M.G.; Contreras, M.; Magris, M.; Hidalgo, G.; Baldassano, R.N.; Anokhin, A.P.; et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* **2012**, *486*, 222–227, doi: 10.1038/nature11053.
  22. Yano, J.M.; Yu, K.; Donaldson, G.P.; Shastri, G.G.; Ann, P.; Ma, L.; Nagler, C.R.; Ismagilov, R.F.; Mazmanian, S.K.; Hsiao, E.Y. Indigenous bacteria from the gut microbiota regulate host serotonin biosynthesis. *Cell* **2015**, *161*, 264–276, doi:10.1016/j.cell.2015.02.047.
  23. Devlin, A.S.; Fischbach, M.A. A biosynthetic pathway for a prominent class of microbiota-derived bile acids. *Nat. Chem. Biol.* **2015**, *11*, 685–690, doi:10.1038/nchembio.1864.
  24. Haiser, H.J.; Gootenberg, D.B.; Chatman, K.; Sirasani, G.; Balskus, E.P.; Turnbaugh, P.J. Predicting and manipulating cardiac drug inactivation by the human gut bacterium *Eggerthella lenta*. *Science* **2013**, *341*, 295–298, doi:10.1126/science.1235872.
  25. Lynch, S. V.; Pedersen, O. The human intestinal microbiome in health and disease. *N. Engl. J. Med.* **2016**, *375*, 2369–2379, doi:10.1056/nejmra1600266.
  26. Wikoff, W.R.; Anfora, A.T.; Liu, J.; Schultz, P.G.; Lesley, S.A.; Peters, E.C.; Siuzdak, G. Metabolomics analysis reveals large effects of gut microflora on mammalian blood metabolites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106*, 3698–3703, doi:10.1073/pnas.0812874106.
  27. Tremaroli, V.; Bäckhed, F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature* **2012**, *489*, 242–249, doi: 10.1038/nature11552.
  28. Overbeek, R.; Begley, T.; Butler, R.M.; Choudhuri, J. V.; Chuang, H.Y.; Cohoon, M.; de Crécy-Lagard, V.; Diaz, N.; Disz, T.; Edwards, R.; et al. The subsystems approach to genome annotation and its use in the project to annotate 1000 genomes. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 5691–5702, doi:10.1093/nar/gki866.
  29. Rowland, I.; Gibson, G.; Heinken, A.; Scott, K.; Swann, J.; Thiele, I.; Tuohy, K. Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components. *Eur. J. Nutr.* **2018**, *57*, 1–24, doi: 10.1007/s00394-017-1445-8.
  30. Qin, Y.; Wade, P.A. Crosstalk between the microbiome and epigenome: messages from bugs. *J. Biochem.* **2018**, *163*, 105–112, doi: 10.1093/jb/mvx080.
  31. Markowiak-Kopeć, P.; Śliżewska, K. The effect of probiotics on the production of short-chain fatty acids by human intestinal microbiome. *Nutrients* **2020**, *12*, 1107, doi: 10.3390/nu12041107.
  32. Round, J.L.; Mazmanian, S.K. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* **2009**, *9*, 313–323, doi: 10.1038/nri2515.
  33. Gilbert, J.A.; Quinn, R.A.; Debelius, J.; Xu, Z.Z.; Morton, J.; Garg, N.; Jansson, J.K.; Dorrestein, P.C.; Knight, R. Microbiome-wide association studies link dynamic microbial consortia to disease. *Nature* **2016**, *535*, 94–103, doi: 10.1038/nature18850.
  34. Macfarlane, G.T.; Macfarlane, S. Bacteria, colonic fermentation, and gastrointestinal health. *J. AOAC Int.* **2012**, *95*, 50–60, doi: 10.5740/jaoacint.sge\_macfarlane.
  35. Fukuda, S.; Toh, H.; Hase, K.; Oshima, K.; Nakanishi, Y.; Yoshimura, K.; Tobe, T.; Clarke, J.M.; Topping, D.L.; Suzuki, T.; et al. Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature* **2011**, *469*, 543–549, doi: 10.1038/nature09646.
  36. Bäckhed, F.; Roswall, J.; Peng, Y.; Feng, Q.; Jia, H.; Kovatcheva-Datchary, P.; Li, Y.; Xia, Y.; Xie, H.; Zhong, H.; et al. Dynamics and stabilization of the human gut microbiome during the first year of life. *Cell Host Microbe* **2015**, *17*, 852, doi: 10.1016/j.chom.2015.05.012.
  37. Hollister, E.B.; Riehle, K.; Luna, R.A.; Weidler, E.M.; Rubio-Gonzales, M.; Mistretta, T.A.;

- Raza, S.; Doddapaneni, H. V.; Metcalf, G.A.; Muzny, D.M.; et al. Structure and function of the healthy pre-adolescent pediatric gut microbiome. *Microbiome* **2015**, *3*, 36, doi:10.1186/s40168-015-0101-x.
38. Eckburg, P.B.; Bik, E.M.; Bernstein, C.N.; Purdom, E.; Dethlefsen, L.; Sargent, M.; Gill, S.R.; Nelson, K.E.; Rman, D.A. Microbiology: Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* **2005**, *308*, 1635–1638, doi:10.1126/science.1110591.
  39. Reyes, A.; Haynes, M.; Hanson, N.; Angly, F.E.; Heath, A.C.; Rohwer, F.; Gordon, J.I. Viruses in the faecal microbiota of monozygotic twins and their mothers. *Nature* **2010**, *466*, 334–338, doi:10.1038/nature09199.
  40. Claesson, M.J.; Jeffery, I.B.; Conde, S.; Power, S.E.; O’connor, E.M.; Cusack, S.; Harris, H.M.B.; Coakley, M.; Lakshminarayanan, B.; O’sullivan, O.; et al. Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. *Nature* **2012**, *488*, 178–184, doi:10.1038/nature11319.
  41. Sokol, H.; Pigneur, B.; Watterlot, L.; Lakhdari, O.; Bermúdez-Humarán, L.G.; Gratadoux, J.J.; Blugeon, S.; Bridonneau, C.; Furet, J.P.; Corthier, G.; et al. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105*, 16731–16736, doi:10.1073/pnas.0804812105.
  42. Kudelka, M.R.; Hinrichs, B.H.; Darby, T.; Moreno, C.S.; Nishio, H.; Cutler, C.E.; Wang, J.; Wu, H.; Zeng, J.; Wang, Y.; et al. Cosmc is an X-linked inflammatory bowel disease risk gene that spatially regulates gut microbiota and contributes to sex-specific risk. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2016**, *113*, 14787–14792, doi:10.1073/pnas.1612158114.
  43. Mar, J.S.; Lamere, B.J.; Lin, D.L.; Levan, S.; Nazareth, M.; Mahadevan, U.; Lynch, S. V. Disease severity and immune activity relate to distinct interkingdom gut microbiome states in ethnically distinct ulcerative colitis patients. *MBio* **2016**, *7*, doi:10.1128/mBio.01072-16.
  44. Schirmer, M.; Franzosa, E.A.; Lloyd-Price, J.; McIver, L.J.; Schwager, R.; Poon, T.W.; Ananthakrishnan, A.N.; Andrews, E.; Barron, G.; Lake, K.; et al. Dynamics of metatranscription in the inflammatory bowel disease gut microbiome. *Nat. Microbiol.* **2018**, *3*, 337–346, doi:10.1038/s41564-017-0089-z.
  45. Lamas, B.; Richard, M.L.; Leducq, V.; Pham, H.P.; Michel, M.L.; Da Costa, G.; Bridonneau, C.; Jegou, S.; Hoffmann, T.W.; Natividad, J.M.; et al. *CARD9* impacts colitis by altering gut microbiota metabolism of tryptophan into aryl hydrocarbon receptor ligands. *Nat. Med.* **2016**, *22*, 598–605, doi:10.1038/nm.4102.
  46. Sokol, H.; Leducq, V.; Aschard, H.; Pham, H.P.; Jegou, S.; Landman, C.; Cohen, D.; Liguori, G.; Bourrier, A.; Nion-Larmurier, I.; et al. Fungal microbiota dysbiosis in IBD. *Gut* **2017**, *66*, 1039–1048, doi:10.1136/gutjnl-2015-310746.
  47. Liu, X.; Guo, D.; Li, X.; Guo, Y.; Song, W. Value of combined detection of PCA, ANCA, ASCA, AGA and ANA in early diagnosis of gastrointestinal diseases. *Pakistan J. Med. Sci.* **2022**, *38*, 227, doi:10.12669/PJMS.38.1.4682.
  48. Tian, Y.; Wang, H. The application value of serological detection of ASCA and ANCA serum level in the diagnosis and treatment of inflammatory bowel disease. *Chin. J. Lab. Med.* **2018**, *12*, 708-711, ID: wpr-712199.
  49. Gevers, D.; Kugathasan, S.; Denson, L.A.; Vázquez-Baeza, Y.; Van Treuren, W.; Ren, B.; Schwager, E.; Knights, D.; Song, S.J.; Yassour, M.; et al. The treatment-naive microbiome in new-onset Crohn’s disease. *Cell Host Microbe* **2014**, *15*, 382–392, doi:10.1016/j.chom.2014.02.005.
  50. Tap, J.; Derrien, M.; Törnblom, H.; Brazeilles, R.; Cools-Portier, S.; Doré, J.; Störsrud, S.; Le Nevé, B.; Öhman, L.; Simrén, M. Identification of an intestinal microbiota signature associated with severity of irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* **2017**, *152*, 111-123.e8, doi: 10.1053/j.gastro.2016.09.049.
  51. Botschuijver, S.; Roeselers, G.; Levin, E.; Jonkers, D.M.; Welting, O.; Heinsbroek, S.E.M.; de Weerd, H.H.; Boekhout, T.; Fornai, M.; Masclee, A.A.; et al. Intestinal fungal dysbiosis is

- associated with visceral hypersensitivity in patients with irritable bowel syndrome and rats. *Gastroenterology* **2017**, *153*, 1026–1039, doi: 10.1053/j.gastro.2017.06.004.
52. Theriot, C.M.; Koenigsnecht, M.J.; Carlson, P.E.; Hatton, G.E.; Nelson, A.M.; Li, B.; Huffnagle, G.B.; Li, J.Z.; Young, V.B. Antibiotic-induced shifts in the mouse gut microbiome and metabolome increase susceptibility to *Clostridium difficile* infection. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 3114, doi:10.1038/ncomms4114.
  53. O'Connor, G.T.; Lynch, S. V.; Bloomberg, G.R.; Kattan, M.; Wood, R.A.; Gergen, P.J.; Jaffee, K.F.; Calatroni, A.; Bacharier, L.B.; Beigelman, A.; et al. Early-life home environment and risk of asthma among inner-city children. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2018**, *141*, 1468–1475, doi:10.1016/j.jaci.2017.06.040.
  54. Yamamoto-Hanada, K.; Yang, L.; Narita, M.; Saito, H.; Ohya, Y. Influence of antibiotic use in early childhood on asthma and allergic diseases at age 5. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* **2017**, *119*, 54–58, doi:10.1016/j.anai.2017.05.013.
  55. Li, Q.; Han, Y.; Dy, A.B.C.; Hagerman, R.J. The gut microbiota and autism spectrum disorders. *Front. Cell. Neurosci.* **2017**, *11*, 120, doi: 10.3389/fncel.2017.00120.
  56. Marin, I.A.; Goertz, J.E.; Ren, T.; Rich, S.S.; Onengut-Gumuscu, S.; Farber, E.; Wu, M.; Overall, C.C.; Kipnis, J.; Gaultier, A. Microbiota alteration is associated with the development of stress-induced despair behavior. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, doi:10.1038/srep43859.
  57. Andoh, A.; Nishida, A.; Takahashi, K.; Inatomi, O.; Imaeda, H.; Bamba, S.; Kito, K.; Sugimoto, M.; Kobayashi, T. Comparison of the gut microbial community between obese and lean peoples using 16S gene sequencing in a Japanese population. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **2016**, *59*, 65–70, doi:10.3164/jcbtn.15-152.
  58. Forslund, K.; Hildebrand, F.; Nielsen, T.; Falony, G.; Le Chatelier, E.; Sunagawa, S.; Prifti, E.; Vieira-Silva, S.; Gudmundsdottir, V.; Krogh Pedersen, H.; et al. Disentangling type 2 diabetes and metformin treatment signatures in the human gut microbiota. *Nature* **2015**, *528*, 262–266, doi:10.1038/nature15766.
  59. Wang, Z.; Roberts, A.B.; Buffa, J.A.; Levison, B.S.; Zhu, W.; Org, E.; Gu, X.; Huang, Y.; Zamanian-Daryoush, M.; Culley, M.K.; et al. Non-lethal inhibition of gut microbial trimethylamine production for the treatment of atherosclerosis. *Cell* **2015**, *163*, 1585–1595, doi:10.1016/j.cell.2015.11.055.
  60. Wu, H.J.; Ivanov, I.I.; Darce, J.; Hattori, K.; Shima, T.; Umesaki, Y.; Littman, D.R.; Benoist, C.; Mathis, D. Gut-residing segmented filamentous bacteria drive autoimmune arthritis via T helper 17 cells. *Immunity* **2010**, *32*, 815–827, doi:10.1016/j.immuni.2010.06.001.
  61. Tremlett, H.; Fadrosch, D.W.; Faruqi, A.A.; Hart, J.; Roalstad, S.; Graves, J.; Spencer, C.M.; Lynch, S. V.; Zamvil, S.S.; Emmanuelle Waubant Centers.. Associations between the gut microbiota and host immune markers in pediatric multiple sclerosis and controls. *BMC Neurol.* **2016**, *16*, 1–9, doi:10.1186/s12883-016-0703-3.
  62. Roy, S.; Trinchieri, G. Microbiota: a key orchestrator of cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **2017**, *17*, 271–285, doi: 10.1038/nrc.2017.13.
  63. Zitvogel, L.; Ma, Y.; Raouf, D.; Kroemer, G.; Gajewski, T.F. The microbiome in cancer immunotherapy: diagnostic tools and therapeutic strategies. *Science*. **2018**, *359*, 1366–1370, doi: 10.1126/science.aar6918.
  64. Qin, J.; Li, R.; Raes, J.; Arumugam, M.; Burgdorf, K.S.; Manichanh, C.; Nielsen, T.; Pons, N.; Levenez, F.; Yamada, T.; et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* **2010**, *464*, 59–65, doi:10.1038/nature08821.
  65. Nash, A.K.; Auchtung, T.A.; Wong, M.C.; Smith, D.P.; Gesell, J.R.; Ross, M.C.; Stewart, C.J.; Metcalf, G.A.; Muzny, D.M.; Gibbs, R.A.; et al. The gut mycobiome of the Human Microbiome Project healthy cohort. *Microbiome* **2017**, *5*, 153, doi:10.1186/s40168-017-0373-4.
  66. Halwachs, B.; Madhusudhan, N.; Krause, R.; Nilsson, R.H.; Moissl-Eichinger, C.; Högenauer, C.; Thallinger, G.G.; Gorkiewicz, G. Critical issues in mycobiota analysis. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, doi:10.3389/fmicb.2017.00180.

67. Hoffmann, C.; Dollive, S.; Grunberg, S.; Chen, J.; Li, H.; Wu, G.D.; Lewis, J.D.; Bushman, F.D. Archaea and fungi of the human gut microbiome: correlations with diet and bacterial residents. *PLoS One* **2013**, *8*, doi:10.1371/journal.pone.0066019.
68. Strati, F.; Di Paola, M.; Stefanini, I.; Albanese, D.; Rizzetto, L.; Lionetti, P.; Calabrò, A.; Jousson, O.; Donati, C.; Cavalieri, D.; et al. Age and gender affect the composition of fungal population of the human gastrointestinal tract. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, doi:10.3389/fmicb.2016.01227.
69. Underhill, D.M.; Iliiev, I.D. The mycobiota: interactions between commensal fungi and the host immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **2014**, *14*, 405–416, doi:10.1038/nri3684.
70. Stewart, C.J.; Nelson, A.; Scribbins, D.; Marrs, E.C.L.; Lanyon, C.; Perry, J.D.; Embleton, N.D.; Cummings, S.P.; Berrington, J.E. Bacterial and fungal viability in the preterm gut: NEC and sepsis. *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed.* **2013**, *98*, F298-303, doi:10.1136/archdischild-2012-302119.
71. Ward, T.L.; Dominguez-Bello, M.G.; Heisel, T.; Al-Ghalith, G.; Knights, D.; Gale, C.A. Development of the human mycobiome over the first month of life and across body sites. *mSystems* **2018**, *3*, doi:10.1128/msystems.00140-17.
72. Auchtung, T.A.; Fofanova, T.Y.; Stewart, C.J.; Nash, A.K.; Wong, M.C.; Gesell, J.R.; Auchtung, J.M.; Ajami, N.J.; Petrosino, J.F. Investigating colonization of the healthy adult gastrointestinal tract by fungi. *mSphere* **2018**, *3*, e00092-18, doi:10.1128/mSphere.00092-18.
73. Cho, I.; Blaser, M.J. The human microbiome: at the interface of health and disease. *Nat. Rev. Genet.* **2012**, *13*, 260–270, doi: 10.1038/nrg3182.
74. Findley, K.; Oh, J.; Yang, J.; Conlan, S.; Deming, C.; Meyer, J.A.; Schoenfeld, D.; Nomicos, E.; Park, M.; Kong, H.H.; et al. Topographic diversity of fungal and bacterial communities in human skin. *Nature* **2013**, *498*, 367–370, doi:10.1038/nature12171.
75. Angebault, C.; Djossou, F.; Abélanet, S.; Permal, E.; Soltana, M. Ben; Diancourt, L.; Bouchier, C.; Woerther, P.L.; Catzeflis, F.; Andremont, A.; et al. *Candida albicans* is not always the preferential yeast colonizing humans: a study in Wayampi amerindians. *J. Infect. Dis.* **2013**, *208*, 1705–1716, doi:10.1093/infdis/jit389.
76. Ramazzotti, M.; Stefanini, I.; Di Paola, M.; De Filippo, C.; Rizzetto, L.; Berná, L.; Dapporto, L.; Rivero, D.; Tocci, N.; Weil, T.; et al. Population genomics reveals evolution and variation of *Saccharomyces cerevisiae* in the human and insects gut. *Environ. Microbiol.* **2019**, *21*, 50–71, doi:10.1111/1462-2920.14422.
77. Ravi, A.; Halstead, F.D.; Bamford, A.; Casey, A.; Thomson, N.M.; van Schaik, W.; Snelson, C.; Goulden, R.; Foster-Nyarko, E.; Savva, G.M.; et al. Loss of microbial diversity and pathogen domination of the gut microbiota in critically ill patients. *Microb. Genomics* **2019**, *5*, doi:10.1099/mgen.0.000293.
78. Frau, A.; Ijaz, U.Z.; Slater, R.; Jonkers, D.; Penders, J.; Campbell, B.J.; Kenny, J.G.; Hall, N.; Lenzi, L.; Burkitt, M.D.; et al. Inter-kingdom relationships in Crohn’s disease explored using a multi-omics approach. *Gut Microbes* **2021**, *13*, 1930871, doi:10.1080/19490976.2021.1930871.
79. Jiang, T.T.; Shao, T.Y.; Ang, W.X.G.; Kinder, J.M.; Turner, L.H.; Pham, G.; Whitt, J.; Alenghat, T.; Way, S.S. Commensal fungi recapitulate the protective benefits of intestinal bacteria. *Cell Host Microbe* **2017**, *22*, 809-816.e4, doi:10.1016/j.chom.2017.10.013.
80. Rizzetto, L.; Ifrim, D.C.; Moretti, S.; Tocci, N.; Cheng, S.C.; Quintin, J.; Renga, G.; Oikonomou, V.; De Filippo, C.; Weil, T.; et al. Fungal chitin induces trained immunity in human monocytes during cross-talk of the host with *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **2016**, *291*, 7961–7972, doi:10.1074/jbc.M115.699645.
81. Quintin, J.; Saeed, S.; Martens, J.H.A.; Giamarellos-Bourboulis, E.J.; Ifrim, D.C.; Logie, C.; Jacobs, L.; Jansen, T.; Kullberg, B.J.; Wijmenga, C.; et al. *Candida albicans* infection affords protection against reinfection via functional reprogramming of monocytes. *Cell Host Microbe* **2012**, *12*, 223–232, doi:10.1016/j.chom.2012.06.006.
82. Iliiev, I.D.; Funari, V.A.; Taylor, K.D.; Nguyen, Q.; Reyes, C.N.; Strom, S.P.; Brown, J.; Becker, C.A.; Fleshner, P.R.; Dubinsky, M.; et al. Interactions between commensal fungi and

- the C-type lectin receptor dectin-1 influence colitis. *Science*. **2012**, *336*, 1314–1317, doi:10.1126/science.1221789.
83. Naglik, J.R.; Moyes, D.L. Mucosal immunity and *Candida albicans* infection. *Clin. Dev. Immunol.* 2011, *2011*, 346307, doi: 10.1155/2011/346307.
  84. Sokol, H.; Conway, K.L.; Zhang, M.; Choi, M.; Morin, B.; Cao, Z.; Villablanca, E.J.; Li, C.; Wijmenga, C.; Yun, S.H.; et al. Card9 mediates intestinal epithelial cell restitution, T-helper 17 responses, and control of bacterial infection in mice. *Gastroenterology* **2013**, *145*, doi:10.1053/j.gastro.2013.05.047.
  85. Lanternier, F.; Mahdavian, S.A.; Barbati, E.; Chaussade, H.; Koumar, Y.; Levy, R.; Denis, B.; Brunel, A.S.; Martin, S.; Loop, M.; et al. Inherited *CARD9* deficiency in otherwise healthy children and adults with *Candida* species-induced meningoencephalitis, colitis, or both. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2015**, *135*, 1558-1568.e2, doi:10.1016/j.jaci.2014.12.1930.
  86. Conti, H.R.; Gaffen, S.L. IL-17-mediated immunity to the opportunistic fungal pathogen *Candida albicans*. *J. Immunol.* **2015**, *195*, 780–788, doi:10.4049/jimmunol.1500909.
  87. Netea, M.G.; Joosten, L.A.B.; Van Der Meer, J.W.M.; Kullberg, B.J.; Van De Veerdonk, F.L. Immune defence against *Candida* fungal infections. *Nat. Rev. Immunol.* **2015**, *15*, 630–642, doi: 10.1038/nri3897.
  88. Plato, A.; Hardison, S.E.; Brown, G.D. Pattern recognition receptors in antifungal immunity. *Semin. Immunopathol.* 2015, *37*, 97–106, doi: 10.1007/s00281-014-0462-4.
  89. De Luca, A.; Zelante, T.; D’Angelo, C.; Zagarella, S.; Fallarino, F.; Spreca, A.; Iannitti, R.G.; Bonifazi, P.; Renaud, J.C.; Bistoni, F.; et al. IL-22 defines a novel immune pathway of antifungal resistance. *Mucosal Immunol.* **2010**, *3*, 361–373, doi:10.1038/mi.2010.22.
  90. Puel, A.; Döffinger, R.; Natividad, A.; Chrabieh, M.; Barcenás-Morales, G.; Picard, C.; Cobat, A.; Ouachée-Chardin, M.; Toulon, A.; Bustamante, J.; et al. Autoantibodies against IL-17A, IL-17F, and IL-22 in patients with chronic mucocutaneous candidiasis and autoimmune polyendocrine syndrome type I. *J. Exp. Med.* **2010**, *207*, 291–297, doi:10.1084/jem.20091983.
  91. Gessner, M.A.; Werner, J.L.; Lilly, L.M.; Nelson, M.P.; Metz, A.E.; Dunaway, C.W.; Chan, Y.R.; Ouyang, W.; Brown, G.D.; Weaver, C.T.; et al. Dectin-1-dependent interleukin-22 contributes to early innate lung defense against *Aspergillus fumigatus*. *Infect. Immun.* **2012**, *80*, 410–417, doi:10.1128/IAI.05939-11.
  92. De Luca, A.; Carvalho, A.; Cunha, C.; Iannitti, R.G.; Pitzurra, L.; Giovannini, G.; Mencacci, A.; Bartolommei, L.; Moretti, S.; Massi-Benedetti, C.; et al. IL-22 and IDO1 affect immunity and tolerance to murine and human vaginal candidiasis. *PLoS Pathog.* **2013**, *9*, e1003486, doi:10.1371/journal.ppat.1003486.
  93. Conti, H.R.; Bruno, V.M.; Childs, E.E.; Daugherty, S.; Hunter, J.P.; Mengesha, B.G.; Saevig, D.L.; Hendricks, M.R.; Coleman, B.M.; Brane, L.; et al. IL-17 Receptor signaling in oral epithelial cells is critical for protection against oropharyngeal candidiasis. *Cell Host Microbe* **2016**, *20*, 606–617, doi:10.1016/j.chom.2016.10.001.
  94. Mogilnicka, I.; Ufnal, M. Gut mycobiota and fungal metabolites in human homeostasis. *Curr. Drug Targets* **2018**, *20*, 232–240, doi:10.2174/1389450119666180724125020.
  95. Shareck, J.; Belhumeur, P. Modulation of morphogenesis in *Candida albicans* by various small molecules. *Eukaryot. Cell* **2011**, *10*, 1004–1012, doi: 10.1128/EC.05030-11.
  96. Lewis, J.D.; Chen, E.Z.; Baldassano, R.N.; Otley, A.R.; Griffiths, A.M.; Lee, D.; Bittinger, K.; Bailey, A.; Friedman, E.S.; Hoffmann, C.; et al. Inflammation, antibiotics, and diet as environmental stressors of the gut microbiome in pediatric Crohn’s disease. *Cell Host Microbe* **2015**, *18*, 489–500, doi:10.1016/j.chom.2015.09.008.
  97. Hoarau, G.; Mukherjee, P.K.; Gower-Rousseau, C.; Hager, C.; Chandra, J.; Retuerto, M.A.; Neut, C.; Vermeire, S.; Clemente, J.; Colombel, J.F.; et al. Bacteriome and mycobiome interactions underscore microbial dysbiosis in familial Crohn’s disease. *MBio* **2016**, *7*, e01250-16, doi:10.1128/mBio.01250-16.
  98. Sivignon, A.; De Vallée, A.; Barnich, N.; Denizot, J.; Darcha, C.; Pignède, G.; Vandekerckove,

- P.; Darfeuille-Michaud, A. *Saccharomyces cerevisiae* CNCMI-3856 prevents colitis induced by AIEC bacteria in the transgenic mouse model mimicking Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis.* **2015**, *21*, 276–286, doi:10.1097/MIB.0000000000000280.
99. Ganji-Arjenaki, M.; Rafieian-Kopaei, M. Probiotics are a good choice in remission of inflammatory bowel diseases: a meta analysis and systematic review. *J. Cell. Physiol.* **2018**, *233*, 2091–2103, doi: 10.1002/jcp.25911.
  100. Mar Rodríguez, M.; Pérez, D.; Javier Chaves, F.; Esteve, E.; Marin-Garcia, P.; Xifra, G.; Vendrell, J.; Jové, M.; Pamplona, R.; Ricart, W.; et al. Obesity changes the human gut mycobiome. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 14600, doi:10.1038/srep14600.
  101. Vallianou, N.G.; Stratigou, T.; Tsagarakis, S. Microbiome and diabetes: Where are we now? *Diabetes Res. Clin. Pract.* **2018**, *146*, 111–118, doi: 10.1016/j.diabres.2018.10.008.
  102. Han, H.; Li, Y.; Fang, J.; Liu, G.; Yin, J.; Li, T.; Yin, Y. Gut microbiota and type 1 diabetes. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 995, doi: 10.3390/ijms19040995.
  103. Yoshida, N.; Yamashita, T.; Hirata, K. Gut microbiome and cardiovascular diseases. *Diseases* **2018**, *6*, 56, doi:10.3390/diseases6030056.
  104. Strati, F.; Cavalieri, D.; Albanese, D.; De Felice, C.; Donati, C.; Hayek, J.; Jousson, O.; Leoncini, S.; Renzi, D.; Calabrò, A.; et al. New evidences on the altered gut microbiota in autism spectrum disorders. *Microbiome* **2017**, *5*, 24, doi:10.1186/s40168-017-0242-1.
  105. Forbes, J.D.; Bernstein, C.N.; Tremlett, H.; Van Domselaar, G.; Knox, N.C. A fungal world: Could the gut mycobiome be involved in neurological disease? *Front. Microbiol.* **2019**, *9*, 3249, doi:10.3389/fmicb.2018.03249.
  106. Szabo, G. Gut-liver axis beyond the microbiome: How the fungal mycobiome contributes to alcoholic liver disease. *Hepatology* **2018**, *68*, 2426–2428, doi: 10.1002/hep.30055.
  107. Chen, Y.; Chen, Z.; Guo, R.; Chen, N.; Lu, H.; Huang, S.; Wang, J.; Li, L. Correlation between gastrointestinal fungi and varying degrees of chronic hepatitis B virus infection. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2011**, *70*, 492–498, doi:10.1016/j.diagmicrobio.2010.04.005.
  108. Coker, O.O.; Nakatsu, G.; Dai, R.Z.; Wu, W.K.K.; Wong, S.H.; Ng, S.C.; Chan, F.K.L.; Sung, J.J.Y.; Yu, J. Enteric fungal microbiota dysbiosis and ecological alterations in colorectal cancer. *Gut* **2019**, *68*, 654–662, doi:10.1136/gutjnl-2018-317178.
  109. Bayoumy, A.B.; Mulder, C.J.J.; Mol, J.J.; Tushuizen, M.E. Gut fermentation syndrome: A systematic review of case reports. *United Eur. Gastroenterol. J.* **2021**, *9*, 332, doi: 10.1002/ueg2.12062.
  110. Eiseman, B.; Silen, W.; Bascom, G.S.; Kauvar, A.J. Fecal enema as an adjunct in the treatment of pseudomembranous enterocolitis. *Surgery* **1958**, *44*, 854–9, PMID: 13592638.
  111. Junca, H.; Pieper, D.H.; Medina, E. The emerging potential of microbiome transplantation on human health interventions. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **2022**, *20*, 615–627, doi: 10.1016/j.csbj.2022.01.009.
  112. Schaedler, R.W.; Dubs, R.; Costello, R. Association of germfree mice with bacteria isolated from normal mice. *J. Exp. Med.* **1965**, *122*, 77–82, doi:10.1084/jem.122.1.77.
  113. Plaza-Diaz, J.; Ruiz-Ojeda, F.J.; Gil-Campos, M.; Gil, A. Mechanisms of action of probiotics. *Adv. Nutr.* **2019**; *10*, S49–S66, doi: 10.1093/advances/nmy063.
  114. Veiga, P.; Suez, J.; Derrien, M.; Elinav, E. Moving from probiotics to precision probiotics. *Nat. Microbiol.* **2020**, *5*, 878–880, doi: 10.1038/s41564-020-0721-1.
  115. Pais, P.; Almeida, V.; Yilmaz, M.; Teixeira, M.C. *Saccharomyces boulardii*: What makes it tick as successful probiotic? *J. Fungi* **2020**, *6*, 78, doi:10.3390/jof6020078.
  116. O'Toole, P.W.; Marchesi, J.R.; Hill, C. Next-generation probiotics: The spectrum from probiotics to live biotherapeutics. *Nat. Microbiol.* **2017**, *2*, 17057, doi: 10.1038/nmicrobiol.2017.57.
  117. Brodmann, T.; Endo, A.; Gueimonde, M.; Vinderola, G.; Kneifel, W.; de Vos, W.M.; Salminen, S.; Gómez-Gallego, C. Safety of novel microbes for human consumption: practical examples of assessment in the European Union. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 1725. doi:

- 10.3389/fmicb.2017.01725.
118. Blaak, E.E.; Canfora, E.E.; Theis, S.; Frost, G.; Groen, A.K.; Mithieux, G.; Nauta, A.; Scott, K.; Stahl, B.; van Harsselaar, J.; et al. Short chain fatty acids in human gut and metabolic health. *Benef. Microbes* **2020**, *11*, 411–455, doi: 10.3920/BM2020.0057.
  119. Kelesidis, T.; Pothoulakis, C. Efficacy and safety of the probiotic *Saccharomyces boulardii* for the prevention and therapy of gastrointestinal disorders. *Therap. Adv. Gastroenterol.* **2012**, *5*, 111–125, doi:10.1177/1756283X11428502.
  120. Sen, S.; Mansell, T.J. Yeasts as probiotics: mechanisms, outcomes, and future potential. *Fungal Genet. Biol.* **2020**, *137*, 103333, doi: 10.1016/j.fgb.2020.103333.
  121. McCullough, M.J.; Clemons, K. V.; Mccusker, J.H.; Stevens, D.A. Species identification and virulence attributes of *Saccharomyces boulardii* (nom. inval.). *J. Clin. Microbiol.* **1998**, *36*, 2613–2617, doi:10.1128/jcm.36.9.2613-2617.1998.
  122. McFarland, L. V. From Yaks to Yogurt: The history, development, and current use of probiotics. *Clin. Infect. Dis.* **2015**, *60*, S85–S90, doi:10.1093/cid/civ054.
  123. Sankoff, D. Reconstructing the history of yeast genomes. *PLoS Genet.* **2009**, *5*, e1000483, doi:10.1371/journal.pgen.1000483.
  124. McFarland, L. V. *Saccharomyces boulardii* is not *Saccharomyces cerevisiae*. *Clin. Infect. Dis.* **1996**, *22*, 200–201, doi:10.1093/clinids/22.1.200.
  125. McFarland, L. V. Systematic review and meta-analysis of *Saccharomyces boulardii* in adult patients. *World J. Gastroenterol.* **2010**, *16*, 2202–2222, doi:10.3748/wjg.v16.i18.2202.
  126. Posteraro, B.; Sanguinetti, M.; Romano, L.; Torelli, R.; Novarese, L.; Fadda, G. Molecular tools for differentiating probiotic and clinical strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. Food Microbiol.* **2005**, *103*, 295–304, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.12.031.
  127. Mallié, M.; Nguyen Van, P.; Bertout, S.; Vaillant, C.; Bastide, J.-M. Genotypic study of *Saccharomyces boulardii* compared to the *Saccharomyces sensu stricto* complex species. *J. Med. Mycol.* **2001**, *11*, 24, doi : JMM-03-2001-11-1-1156-5233-101019-ART4.
  128. Dinleyici, E.C.; Kara, A.; Ozen, M.; Vandenplas, Y. *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 in different clinical conditions. *Expert Opin. Biol. Ther.* **2014**, *14*, 1593–1609, doi: 10.1517/14712598.2014.937419.
  129. Gayathri, R.; Aruna, T.; Malar, S.; Shilpa, B.; Dhanasekar, K.R. Efficacy of *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-3856 as an add-on therapy for irritable bowel syndrome. *Int. J. Colorectal Dis.* **2020**, *35*, 139–145, doi:10.1007/s00384-019-03462-4.
  130. Ryan, J.J.; Hanes, D.A.; Schafer, M.B.; Mikolai, J.; Zwickey, H. Effect of the probiotic *Saccharomyces boulardii* on cholesterol and lipoprotein particles in hypercholesterolemic adults: a single-arm, open-label pilot study. *J. Altern. Complement. Med.* **2015**, *21*, 288–293, doi:10.1089/acm.2014.0063.
  131. Hennequin, C.; Thierry, A.; Richard, G.F.; Lecointre, G.; Nguyen, H. V; Gaillardin, C.; Dujon, B. Microsatellite typing as a new tool for identification of *Saccharomyces cerevisiae* strains. *J. Clin. Microbiol.* **2001**, *39*, 551–559, doi:10.1128/JCM.39.2.551-559.2001.
  132. Zhu, Y.O.; Sherlock, G.; Petrov, D.A. Whole genome analysis of 132 clinical *Saccharomyces cerevisiae* strains reveals extensive ploidy variation. *G3* **2016**, *6*, 2421–2434, doi:10.1534/g3.116.029397.
  133. van der Aa Kühle, A.; Jespersen, L. The taxonomic position of *Saccharomyces boulardii* as evaluated by sequence analysis of the D1/D2 domain of 26S rDNA, the ITS1-5.8S rDNA-ITS2 region and the mitochondrial cytochrome-c oxidase II gene. *Syst. Appl. Microbiol.* **2003**, *26*, 564–571, doi:10.1078/072320203770865873.
  134. Mitterdorfer, G.; Mayer, H.K.; Kneifel, W.; Viernstein, H. Clustering of *Saccharomyces boulardii* strains within the species *S. cerevisiae* using molecular typing techniques. *J. Appl. Microbiol.* **2002**, *93*, 521–530, doi:10.1046/j.1365-2672.2002.01710.x.
  135. Khatri, I.; Tomar, R.; Ganesan, K.; Prasad, G.S.; Subramanian, S. Complete genome sequence and comparative genomics of the probiotic yeast *Saccharomyces boulardii*. *Sci. Rep.* **2017**, *7*,

- 1–13, doi:10.1038/s41598-017-00414-2.
136. Fietto, J.L.R.; Araújo, R.S.; Valadão, F.N.; Fietto, L.G.; Brandão, R.L.; Neves, M.J.; Gomes, F.C.O.; Nicoli, J.R.; Castro, I.M. Molecular and physiological comparisons between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces boulardii*. *Can. J. Microbiol.* **2004**, *50*, 615–621, doi:10.1139/w04-050.
  137. Edwards-Ingram, L.C.; Gent, M.E.; Hoyle, D.C.; Hayes, A.; Stateva, L.I.; Oliver, S.G. Comparative genomic hybridization provides new insights into the molecular taxonomy of the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Genome Res.* **2004**, *14*, 1043–1051, doi:10.1101/gr.2114704.
  138. Martinsen, T.C.; Bergh, K.; Waldum, H.L. Gastric juice: a barrier against infectious diseases. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **2005**, *96*, 94–102, doi: 10.1111/j.1742-7843.2005.pto960202.x.
  139. Kabluchko, T. V.; Bomko, T. V.; Nosalskaya, T.N.; Martynov, A. V.; Osolodchenko, T.P. Survival of microorganisms from modern probiotics in model conditions of the intestine. *Annals of Mechnikov Institute* **2017**, *1*, 28–33, doi: 10.5281/zenodo.401068.
  140. Du Le, H.; Trinh, K.S. Survivability of *Lactobacillus acidophilus*, *Bacillus clausii* and *Saccharomyces boulardii* encapsulated in alginate gel microbeads. *Carpathian J. Food Sci. Technol.* **2018**, *10*, 95–103.
  141. Elmer; McFarland; Surawicz; Danko; Greenberg Behaviour of *Saccharomyces boulardii* in recurrent *Clostridium difficile* disease patients. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **1999**, *13*, 1663–1668, doi:10.1046/j.1365-2036.1999.00666.x.
  142. Blehaut, H.; Massot, J.; Elmer, G.W.; Levy, R.H. Disposition kinetics of *Saccharomyces boulardii* in man and rat. *Biopharm. Drug Dispos.* **1989**, *10*, 353–364, doi:10.1002/bdd.2510100403.
  143. Edwards-Ingram, L.; Gitsham, P.; Burton, N.; Warhurst, G.; Clarke, I.; Hoyle, D.; Oliver, S.G.; Stateva, L. Genotypic and physiological characterization of *Saccharomyces boulardii*, the probiotic strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, *73*, 2458–2467, doi:10.1128/AEM.02201-06.
  144. Offei, B.; Vandecruys, P.; De Graeve, S.; Foulquié-Moreno, M.R.; Thevelein, J.M. Unique genetic basis of the distinct antibiotic potency of high acetic acid production in the probiotic yeast *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*. *Genome Res.* **2019**, *29*, 1478–1494, doi:10.1101/gr.243147.118.
  145. Liu; Styles; Fink *Saccharomyces cerevisiae* S288C has a mutation in *FLO8*, a gene required for filamentous growth. *Genetics* **1996**, *144*, 967–978, doi:10.1093/genetics/144.3.967.
  146. Liu, J.J.; Zhang, G.C.; Kong, I.I.; Yun, E.J.; Zheng, J.Q.; Kweon, D.H.; Jin, Y.S. A mutation in *PGM2* causing inefficient galactose metabolism in the probiotic yeast *Saccharomyces boulardii*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2018**, *84*, doi:10.1128/AEM.02858-17.
  147. Mitterdorfer, G.; Kneifel, W.; Viernstein, H. Utilization of prebiotic carbohydrates by yeasts of therapeutic relevance. *Lett. Appl. Microbiol.* **2001**, *33*, 251–255, doi:10.1046/j.1472-765X.2001.00991.x.
  148. McFarland, L. V. Use of probiotics to correct dysbiosis of normal microbiota following disease or disruptive events: a systematic review. *BMJ Open* **2014**, *4*, doi: 10.1136/bmjopen-2014-005047.
  149. Zoppi, C.; Cinquetti, M.; Benini, A.; Bonamini, E.; Minelli, E.B. Modulation of the intestinal ecosystem by probiotics and lactulose in children during treatment with ceftriaxone. *Curr. Ther. Res.* **2001**, *62*. 418–435, doi:10.1016/S0011-393X(01)89006-8.
  150. Girard-Pipau, F.; Pompei, A.; Nano, J.L.; Boquet, X.; Rampal, P.; Schneider, S.; Hebuterne, X.; Boquet, P. Intestinal microflora, short chain and cellular fatty acids, influence of a probiotic *Saccharomyces boulardii*. *Microb. Ecol. Health Dis.* **2002**, *14*, 220–227, doi:10.1080/08910600310002109.
  151. Swidsinski, A.; Loening-Baucke, V.; Verstraelen, H.; Osowska, S.; Doerffel, Y. Biostructure of

- fecal microbiota in healthy subjects and patients with chronic idiopathic diarrhea. *Gastroenterology* **2008**, *135*, 568-79, doi: 10.1053/j.gastro.2008.04.017.
152. Cifuentes, S.G.; Prado, M.B.; Fornasini, M.; Cohen, H.; Baldeón, M.E.; Cárdenas, P.A. *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 supplementation modifies the fecal resistome during *Helicobacter pylori* eradication therapy. *Helicobacter* **2022**, *27*, e12870 doi: 10.1111/hel.12870.
  153. Wu, X.; Vallance, B.A.; Boyer, L.; Bergstrom, K.S.B.; Walker, J.; Madsen, K.; O’Kusky, J.R.; Buchan, A.M.; Jacobson, K. *Saccharomyces boulardii* ameliorates *Citrobacter rodentium*-induced colitis through actions on bacterial virulence factors. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2008**, *294*, G295-306, doi: 10.1152/ajpgi.00173.2007.
  154. Castagliuolo, I.; Riegler, M.F.; Valenick, L.; LaMont, J.T.; Pothoulakis, C. *Saccharomyces boulardii* protease inhibits the effects of *Clostridium difficile* toxins A and B in human colonic mucosa. *Infect. Immun.* **1999**, *67*, 302–307, doi: 10.1128/IAI.67.1.302-307.1999.
  155. Castagliuolo, I.; Thomas Lamont, J.; Nikulasson, S.T.; Pothoulakis, C. *Saccharomyces boulardii* protease inhibits *Clostridium difficile* toxin A effects in the rat ileum. *Infect. Immun.* **1996**, *64*, 5225–5232, doi:10.1128/iai.64.12.5225-5232.1996.
  156. Buts, J.P.; Dekeyser, N.; Stilmant, C.; Delem, E.; Smets, F.; Sokal, E. *Saccharomyces boulardii* produces in rat small intestine a novel protein phosphatase that inhibits *Escherichia coli* endotoxin by dephosphorylation. *Pediatr. Res.* **2006**, *60*, 24–29, doi:10.1203/01.pdr.0000220322.31940.29.
  157. Czerucka, D.; Roux, I.; Rampal, P. *Saccharomyces boulardii* inhibits secretagogue-mediated adenosine 3',5'-cyclic monophosphate induction in intestinal cells. *Gastroenterology* **1994**, *106*, 65–72, doi:10.1016/S0016-5085(94)94403-2.
  158. Brandão, R.L.; Castro, I.M.; Bambirra, E.A.; Amaral, S.C.; Fietto, L.G.; Tropaia, M.J.M.; Neves, M.J.; Dos Santos, R.G.; Gomes, N.C.M.; Nicoli, J.R. Intracellular signal triggered by cholera toxin in *Saccharomyces boulardii* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **1998**, *64*, 564–568, doi:10.1128/aem.64.2.564-568.1998.
  159. Pontier-Bres, R.; Rampal, P.; Peyron, J.F.; Munro, P.; Lemichez, E.; Czerucka, D. The *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 strain shows protective effects against the *B. anthracis* LT toxin. *Toxins* **2015**, *7*, 4455–4467, doi:10.3390/toxins7114455.
  160. Tiago, F.C.P.; Martins, F.S.; Souza, E.L.S.; Pimenta, P.F.P.; Araujo, H.R.C.; Castro, I.M.; Brandão, R.L.; Nicoli, J.R. Adhesion to the yeast cell surface as a mechanism for trapping pathogenic bacteria by *Saccharomyces* probiotics. *J. Med. Microbiol.* **2012**, *61*, 1194–1207, doi:10.1099/JMM.0.042283-0.
  161. Gedek, B.R. Adherence of *Escherichia coli* serogroup O 157 and the *Salmonella* Typhimurium mutant DT 104 to the surface of *Saccharomyces boulardii*. *Mycoses* **1999**, *42*, 261–264, doi:10.1046/J.1439-0507.1999.00449.X.
  162. Pontier-Bres, R.; Munro, P.; Boyer, L.; Anty, R.; Imbert, V.; Terciolo, C.; André, F.; Rampal, P.; Lemichez, E.; Peyron, J.F.; et al. *Saccharomyces boulardii* modifies *Salmonella* Typhimurium traffic and host immune responses along the intestinal tract. *PLoS One* **2014**, *9*, e103069, doi: 10.1371/journal.pone.0103069.
  163. Martins, F.S.; Dalmaso, G.; Arantes, R.M.E.; Doye, A.; Lemichez, E.; Lagadec, P.; Imbert, V.; Peyron, J.F.; Rampal, P.; Nicoli, J.R.; et al. Interaction of *Saccharomyces boulardii* with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium protects mice and modifies T84 cell response to the infection. *PLoS One* **2010**, *5*, e8925, doi: 10.1371/journal.pone.0008925.
  164. Qamar, A.; Aboudola, S.; Warny, M.; Michetti, P.; Pothoulakis, C.; LaMont, J.T.; Kelly, C.P. *Saccharomyces boulardii* stimulates intestinal immunoglobulin A immune response to *Clostridium difficile* toxin A in mice. *Infect. Immun.* **2001**, *69*, 2762–2765, doi:10.1128/IAI.69.4.2762-2765.2001.
  165. Dalmaso, G.; Cottrez, F.; Imbert, V.; Lagadec, P.; Peyron, J.F.; Rampal, P.; Czerucka, D.; Groux, H. *Saccharomyces boulardii* inhibits inflammatory bowel disease by trapping T-cells in

- mesenteric lymph nodes. *Gastroenterology* **2006**, *131*, 1812–1825, doi: 0.1053/j.gastro.2006.10.001.
166. Moré, M.I.; Vandenplas, Y. *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 improves intestinal enzyme function: a trophic effects review. *Clin. Med. Insights Gastroenterol.* 2018, *11*, 1179552217752679, doi: 10.1177/1179552217752679.
  167. Buts, J.P.; Bernasconi, P.; Van Craynest, M.P.; Maldague, P.; Meyer, R. Response of human and rat small intestinal mucosa to oral administration of *Saccharomyces boulardii*. *Pediatr. Res.* **1986**, *20*, 192–196, doi:10.1203/00006450-198602000-00020.
  168. Buts, J.P.; Keyser, N. De; Raedemaeker, L. De. *Saccharomyces boulardii* enhances rat intestinal enzyme expression by endoluminal release of polyamines. *Pediatr. Res.* **1994**, *36*, 522–527, doi:10.1203/00006450-199410000-00019.
  169. Zaouche, A.; Loukil, C.; De Lagausie, P.; Peuchmaur, M.; Macry, J.; Fitoussi, F.; Bernasconi, P.; Bingen, E.; Cezard, J.P. Effects of oral *Saccharomyces boulardii* on bacterial overgrowth, translocation, and intestinal adaptation after small-bowel resection in rats. *Scand. J. Gastroenterol.* **2000**, *35*, 160–165, doi:10.1080/003655200750024326.
  170. Buts, J.P.; De Keyser, N.; Marandi, S.; Hermans, D.; Sokal, E.M.; Chae, Y.H.E.; Lambotte, L.; Chanteux, H.; Tulkens, P.M. *Saccharomyces boulardii* upgrades cellular adaptation after proximal enterectomy in rats. *Gut* **1999**, *45*, 89–96, doi:10.1136/gut.45.1.89.
  171. Harms, H.-K.; Bertele-Harms, R.-M.; Bruer-Kleis, D. Enzyme-substitution therapy with the yeast *Saccharomyces cerevisiae* in congenital sucrase-isomaltase deficiency. *N. Engl. J. Med.* **1987**, *316*, 1306–1309, doi:10.1056/NEJM198705213162104.
  172. Buts, J.P.; De Keyser, N.; Stilmant, C.; Sokal, E.; Marandi, S. *Saccharomyces boulardii* enhances N-terminal peptide hydrolysis in suckling rat small intestine by endoluminal release of a zinc-binding metalloprotease. *Pediatr. Res.* **2002**, *51*, 528–534, doi:10.1203/00006450-200204000-00021.
  173. Jahn, H.U.; Ullrich, R.; Schneider, T.; Liehr, R.M.; Schieferdecker, H.L.; Holst, H.; Zeitz, M. Immunological and trophic effects of *Saccharomyces boulardii* on the small intestine in healthy human volunteers. *Digestion* **1996**, *57*, 95–104, doi:10.1159/000201320.
  174. Hennequin, C.; Kauffmann-Lacroix, C.; Jobert, a; Viard, J.P.; Ricour, C.; Jacquemin, J.L.; Berche, P. Possible role of catheters in *Saccharomyces boulardii* fungemia. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2000**, *19*, 16–20, doi: 10.1007/s100960050003.
  175. Pérez-Torrado, R.; Querol, A. Opportunistic strains of *Saccharomyces cerevisiae*: a potential risk sold in food products. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 1522, doi:10.3389/fmicb.2015.01522.
  176. Imre, A.; Rácz, H.V.; Antunovics, Z.; Rádai, Z.; Kovács, R.; Lopandic, K.; Pócsi, I.; Pfliegler, W.P. A new, rapid multiplex PCR method identifies frequent probiotic origin among clinical *Saccharomyces* isolates. *Microbiol. Res.* **2019**, *227*, 126298, doi:10.1016/j.micres.2019.126298.
  177. Poncelet, A.; Ruelle, L.; Konopnicki, D.; Miendje Deyi, V.Y.; Dauby, N. *Saccharomyces cerevisiae* fungemia: risk factors, outcome and links with *S. boulardii*-containing probiotic administration. *Infect. Dis. Now* **2021**, *51*, 293–295, doi:10.1016/j.idnow.2020.12.003.
  178. Cassone, M.; Serra, P.; Mondello, F.; Girolamo, A.; Scafetti, S.; Pistella, E.; Venditti, M. Outbreak of *Saccharomyces cerevisiae* subtype *boulardii* fungemia in patients neighboring those treated with a probiotic preparation of the organism. *J. Clin. Microbiol.* **2003**, *41*, 5340–5343, doi:10.1128/JCM.41.11.5340-5343.2003.
  179. Wombwell, E.; Bransteitter, B.; Gillen, L. Incidence of *Saccharomyces cerevisiae* fungemia in hospitalized patients administered *Saccharomyces boulardii* probiotic. *Mycoses* **2021**, *64*, 1521–1526, doi: 10.1111/myc.13375.
  180. Arastehfar, A.; Fang, W.; Badali, H.; Vaezi, A.; Jiang, W.; Liao, W.; Pan, W.; Hagen, F.; Boekhout, T. Low-cost tetraplex PCR for the global spreading multi-drug resistant fungus, *Candida auris* and its phylogenetic relatives. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 1119, doi:10.3389/fmicb.2018.01119.

181. Arastehfar, A.; Fang, W.; Pan, W.; Lackner, M.; Liao, W.; Badiee, P.; Zomorodian, K.; Badali, H.; Hagen, F.; Lass-Flörl, C.; et al. Yeast panel multiplex PCR for identification of clinically important yeast species: stepwise diagnostic strategy, useful for developing countries. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2019**, *93*, 112–119, doi:10.1016/j.diagmicrobio.2018.09.007.
182. Enache-Angoulvant, A.; Hennequin, C. Invasive *Saccharomyces* infection: a comprehensive review. *Clin. Infect. Dis.* **2005**, *41*, 1559–1568, doi:10.1086/497832.
183. Muñoz, P.; Bouza, E.; Cuenca-Estrella, M.; Mari, J.; Jesu, M.; Sa, M.; Rinco, C.; Hortal, J.; Pela, T.; Maran, G. *Saccharomyces cerevisiae* fungemia: an emerging infectious disease. *Clin. Infect. Dis.* **2005**, *40*, 1625–1634, doi:10.1086/429916.
184. de Llanos, R.; Querol, A.; Planes, A.M.; Fernández-Espinar, M.T. Molecular characterization of clinical *Saccharomyces cerevisiae* isolates and their association with non-clinical strains. *Syst. Appl. Microbiol.* **2004**, *27*, 427–35, doi:10.1078/0723202041438473.
185. Anoop, V.; Rotaru, S.; Shwed, P.S.; Tayabali, A.F.; Arvanitakis, G. Review of current methods for characterizing virulence and pathogenicity potential of industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains towards humans. *FEMS Yeast Res.* **2015**, *15*, fov057, doi: 10.1093/femsyr/fov057.
186. Clemons, K. V.; McCusker, J.H.; Davis, R.W.; Stevens, D.A. Comparative pathogenesis of clinical and nonclinical isolates of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Infect. Dis.* **1994**, *169*, 859–67, doi: 10.1093/infdis/169.4.859.
187. Klingberg, T.D.; Lesnik, U.; Arneborg, N.; Raspor, P.; Jespersen, L. Comparison of *Saccharomyces cerevisiae* strains of clinical and nonclinical origin by molecular typing and determination of putative virulence traits. *FEMS Yeast Res.* **2008**, *8*, 631–640, doi:10.1111/j.1567-1364.2008.00365.x.
188. McCusker, J.H.; Clemons, K. V.; Stevens, D.A.; Davis, R.W. Genetic characterization of pathogenic *Saccharomyces cerevisiae* isolates. *Genetics* **1994**, *136*, 1261–1269, doi:10.1093/genetics/136.4.1261.
189. de Llanos, R.; Fernández-Espinar, M.T.; Querol, A. A comparison of clinical and food *Saccharomyces cerevisiae* isolates on the basis of potential virulence factors. *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* **2006**, *90*, 221–231, doi:10.1007/s10482-006-9077-7.
190. Zupan, J.; Raspor, P. Quantitative agar-invasion assay. *J. Microbiol. Methods* **2008**, *73*, 100–104, doi:10.1016/j.mimet.2008.02.009.
191. Pérez-Torrado, R.; Llopis, S.; Jespersen, L.; Fernández-Espinar, T.; Querol, A. Clinical *Saccharomyces cerevisiae* isolates cannot cross the epithelial barrier *in vitro*. *Int. J. Food Microbiol.* **2012**, *157*, 59–64, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.04.012.
192. Yáñez, A.; Murciano, C.; Llopis, S.; Fernández-espinar, T.; Gil, M.L.; Gozalbo, D. *In vivo* and *in vitro* studies on virulence and host responses to *Saccharomyces cerevisiae* clinical and non-clinical isolates. *Open Mycol. J.* **2009**, *3*, 37–47, doi: http://dx.doi.org/10.2174/1874437000903010037.
193. van der Aa Kühle, A.; Skovgaard, K.; Jespersen, L. *In vitro* screening of probiotic properties of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* and food-borne *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Int. J. Food Microbiol.* **2005**, *101*, 29–39, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.10.039.
194. Llopis, S.; Querol, A.; Heyken, A.; Hube, B.; Jespersen, L.; Fernández-Espinar, M.; Pérez-Torrado, R. Transcriptomics in human blood incubation reveals the importance of oxidative stress response in *Saccharomyces cerevisiae* clinical strains. *BMC Genomics* **2012**, *13*, 419, doi:10.1186/1471-2164-13-419.
195. de Llanos, R.; Llopis, S.; Molero, G.; Querol, A.; Gil, C.; Fernández-Espinar, M.T. *In vivo* virulence of commercial *Saccharomyces cerevisiae* strains with pathogenicity-associated phenotypical traits. *Int. J. Food Microbiol.* **2011**, *144*, 393–9, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.10.025.
196. Llopis, S.; Hernández-Haro, C.; Monteoliva, L.; Querol, A.; Molina, M.; Fernández-Espinar, M.T. Pathogenic potential of *Saccharomyces* strains isolated from dietary supplements. *PLoS One* **2014**, *9*, e98094, doi:10.1371/journal.pone.0098094.

197. Pfliegler, W.P.; Boros, E.; Pázmándi, K.; Jakab, Á.; Zsuga, I.; Kovács, R.; Urbán, E.; Antunovics, Z.; Bácsi, A.; Sipiczki, M.; et al. Commercial strain-derived clinical *Saccharomyces cerevisiae* can evolve new phenotypes without higher pathogenicity. *Mol. Nutr. Food Res.* **2017**, *61*, doi:10.1002/mnfr.201601099.
198. Rácz, H.V.; Mukhtar, F.; Imre, A.; Rádai, Z.; Gombert, A.K.; Rátonyi, T.; Nagy, J.; Pócsi, I.; Pfliegler, W.P. How to characterize a strain? Clonal heterogeneity in industrial *Saccharomyces* influences both phenotypes and heterogeneity in phenotypes. *Yeast* **2021**, *38*, 453-470, doi: 10.1002/yea.3562.
199. Poissy, J.; Damonti, L.; Bignon, A.; Khanna, N.; Von Kietzell, M.; Boggian, K.; Neofytos, D.; Vuotto, F.; Coiteux, V.; Artru, F.; et al. Risk factors for candidemia: a prospective matched case-control study. *Crit. Care* **2020**, *24*, 109, doi:10.1186/S13054-020-2766-1.
200. Hatinguais, R.; Willment, J.A.; Brown, G.D. PAMPs of the fungal cell wall and mammalian PRRs. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **2020**, *425*, 187–223, doi:10.1007/82\_2020\_201.
201. Bourgeois, C.; Kuchler, K. Fungal pathogens—a sweet and sour treat for toll-like receptors. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2012**, *2*, 142, doi: 10.3389/fcimb.2012.00142.
202. Hardison, S.E.; Brown, G.D. C-type lectin receptors orchestrate antifungal immunity. *Nat. Immunol.* **2012**, *13*, 817–822, doi:10.1038/ni.2369.
203. Pietrella, D.; Bistoni, G.; Corbucci, C.; Perito, S.; Vecchiarelli, A. *Candida albicans* mannoprotein influences the biological function of dendritic cells. *Cell. Microbiol.* **2006**, *8*, 602–612, doi:10.1111/J.1462-5822.2005.00651.x.
204. Pathakumari, B.; Liang, G.; Liu, W. Immune defence to invasive fungal infections: A comprehensive review. *Biomed. Pharmacother.* **2020**, *130*, 110550, doi: 10.1016/j.biopha.2020.110550.
205. Dubourdeau, M.; Athman, R.; Balloy, V.; Huerre, M.; Chignard, M.; Philpott, D.J.; Latgé, J.-P.; Ibrahim-Granet, O. *Aspergillus fumigatus* induces innate immune responses in alveolar macrophages through the MAPK pathway independently of TLR2 and TLR4. *J. Immunol.* **2006**, *177*, 3994–4001, doi: 10.4049/jimmunol.177.6.3994.
206. Brown, G.D.; Gordon, S. Immune recognition. A new receptor for  $\beta$ -glucans. *Nature* **2001**, *413*, 36–37, doi:10.1038/35092620.
207. Wells, C.A.; Salvage-Jones, J.A.; Li, X.; Hitchens, K.; Butcher, S.; Murray, R.Z.; Beckhouse, A.G.; Lo, Y.-L.-S.; Manzanero, S.; Cobbold, C.; et al. The macrophage-inducible C-type lectin, mincle, is an essential component of the innate immune response to *Candida albicans*. *J. Immunol.* **2008**, *180*, 7404–7413, doi:10.4049/JIMMUNOL.180.11.7404.
208. Gross, O.; Gewies, A.; Finger, K.; Schäfer, M.; Sparwasser, T.; Peschel, C.; Förster, I.; Ruland, J. Card9 controls a non-TLR signalling pathway for innate anti-fungal immunity. *Nature* **2006**, *442*, 651–656, doi:10.1038/nature04926.
209. Cottier, F.; Pavelka, N. Complexity and dynamics of host-fungal interactions. *Immunol. Res.* **2012**, *53*, 127–135, doi: 10.1007/s12026-012-8265-y.
210. Zelante, T.; Iannitti, R.G.; De Luca, A.; Arroyo, J.; Blanco, N.; Servillo, G.; Sanglard, D.; Reichard, U.; Palmer, G.E.; Latgé, J.P.; et al. Sensing of mammalian IL-17A regulates fungal adaptation and virulence. *Nat. Commun.* **2012**, *3*, 683, doi: 10.1038/ncomms1685.
211. Dan, J.M.; Kelly, R.M.; Lee, C.K.; Levitz, S.M. Role of the mannose receptor in a murine model of *Cryptococcus neoformans* infection. *Infect. Immun.* **2008**, *76*, 2362–2367, doi:10.1128/IAI.00095-08.
212. Serrano-Gómez, D.; Domínguez-Soto, A.; Ancochea, J.; Jimenez-Heffernan, J.A.; Leal, J.A.; Corbí, A.L. Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin mediates binding and internalization of *Aspergillus fumigatus* conidia by dendritic cells and macrophages. *J. Immunol.* **2004**, *173*, 5635–5643, doi: 10.4049/jimmunol.173.9.5635.
213. Cambi, A.; Gijzen, K.; de Vries, I.J.M.; Torensma, R.; Joosten, B.; Adema, G.J.; Netea, M.G.; Kullberg, B.J.; Romani, L.; Figdor, C.G. The C-type lectin DC-SIGN (CD209) is an antigen-uptake receptor for *Candida albicans* on dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* **2003**, *33*, 532–538,

doi: 10.1002/immu.200310029.

214. Imre, A.; Kovács, R.; Pázmándi, K.; Nemes, D.; Jakab, Á.; Fekete, T.; Rácz, H.V.; Dóczy, I.; Bácskay, I.; Gácsér, A.; et al. Virulence factors and in-host selection on phenotypes in infectious probiotic yeast isolates (*Saccharomyces 'boulardii'*). *J. fungi* **2021**, *7*, 746, doi:10.3390/jof7090746.
215. Dlouhy, A.C.; Outten, C.E. The iron metallome in eukaryotic organisms. *Met. Ions Life Sci.* **2013**, *12*, 241, doi:10.1007/978-94-007-5561-1\_8.
216. Cassat, J.E.; Skaar, E.P. Iron in infection and immunity. **2013**, *13*, 509-519, doi:10.1016/j.chom.2013.04.010.
217. Nairz, M.; Weiss, G. Iron in infection and immunity. *Mol. Aspects Med.* **2020**, *75*, 100864, doi: 10.1016/j.mam.2020.100864.
218. Nathan, D.; Oski, F.; Ginsburg, D.; Orkin, S.; Look, A. Nathan and Oski's Hematology and Oncology of Infancy and Childhood. *Saunders* **2003**, ISBN: 9781455754144.
219. Kosmachevskaya, O. V.; Topunov, A.F. Alternate and additional functions of erythrocyte hemoglobin. *Biochem.* **2019**, *83*, 1575–1593, doi:10.1134/S0006297918120155.
220. Peyssonnaud, C.; Zinkernagel, A.; Datta, V.; Lauth, X.; Johnson, R.; Nizet, V. TLR4-dependent hepcidin expression by myeloid cells in response to bacterial pathogens. *Blood* **2006**, *107*, 3727–3732, doi:10.1182/blood-2005-06-2259.
221. Drakesmith, H.; Prentice, A. Hepcidin and the iron-infection axis. *Science* **2012**, *338*, 768–772, doi:10.1126/science.1224577.
222. Nairz, M.; Schroll, A.; Sonnweber, T.; Weiss, G. The struggle for iron - a metal at the host-pathogen interface. *Cell. Microbiol.* **2010**, *12*, 1691–1702, doi:10.1111/J.1462-5822.2010.01529.x.
223. Weiss, G. Modification of iron regulation by the inflammatory response. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* **2005**, *18*, 183–201, doi:10.1016/j.beha.2004.09.001.
224. Masson, P.; Heremans, J.; Schonke, E. Lactoferrin, an iron-binding protein in neutrophilic leukocytes. *J. Exp. Med.* **1969**, *130*, 643–658, doi:10.1084/jem.130.3.643.
225. Ramos-Alonso, L.; Romero, A.; Martínez-Pastor, M.; Puig, S. Iron regulatory mechanisms in *Saccharomyces cerevisiae*. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 582830, doi:10.3389/fmicb.2020.582830.
226. Kim, D.; Yukl, E.T.; Moënne-Loccoz, P.; Ortiz De Montellano, P.R. Fungal heme oxygenases: functional expression and characterization of Hmx1 from *Saccharomyces cerevisiae* and CaHmx1 from *Candida albicans*. *Biochemistry* **2006**, *45*, 14772–14780, doi:10.1021/bi061429r.
227. Protchenko, O.; Philpott, C.C. Regulation of Intracellular Heme Levels by *HMX1*, a homologue of heme oxygenase, in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 36582–36587, doi:10.1074/jbc.M306584200.
228. Chakraborty, T.; Tóth, Z.; Tóth, R.; Vágvölgyi, C.; Gácsér, A. Iron metabolism, pseudohypha production, and biofilm formation through a multicopper oxidase in the human-pathogenic fungus *Candida parapsilosis*. *mSphere* **2020**, *5*, e00227-20, doi: 10.1128/mSphere.00227-20.
229. Gerwien, F.; Safyan, A.; Wisgott, S.; Hille, F.; Kaemmer, P.; Linde, J.; Brunke, S.; Kasper, L.; Hube, B. A novel hybrid iron regulation network combines features from pathogenic and nonpathogenic yeasts. *MBio* **2016**, *7*, e01782-16, doi: 10.1128/mBio.01782-16.
230. Skrzypek, M.S.; Binkley, J.; Binkley, G.; Miyasato, S.R.; Simison, M.; Sherlock, G. The *Candida* Genome Database (CGD): incorporation of assembly 22, systematic identifiers and visualization of high throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45*, D592–D596, doi:10.1093/nar/gkw924.
231. Navarathna, D.H.M.L.P.; Roberts, D.D. *Candida albicans* heme oxygenase and its product CO contribute to pathogenesis of candidemia and alter systemic chemokine and cytokine expression. *Free Radic. Biol. Med.* **2010**, *49*, 1561–1573, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.08.020.

232. Weissman, Z.; Pinsky, M.; Donegan, R.K.; Reddi, A.R.; Kornitzer, D. Using genetically encoded heme sensors to probe the mechanisms of heme uptake and homeostasis in *Candida albicans*. *Cell. Microbiol.* **2021**, *23*, doi:10.1111/cmi.13282.
233. Roy, U.; Kornitzer, D. Heme-iron acquisition in fungi. *Curr. Opin. Microbiol.* **2019**, *52*, 77–83, doi: 10.1016/j.mib.2019.05.006.
234. Fourie, R.; Kuloyo, O.O.; Mochochoko, B.M.; Albertyn, J.; Pohl, C.H. Iron at the centre of *Candida albicans* interactions. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2018**, *8*, 185, doi: 10.3389/fcimb.2018.00185.
235. Weissman, Z.; Kornitzer, D. A Family of *Candida* cell surface haem-binding proteins involved in haemin and haemoglobin-iron utilization. *Mol. Microbiol.* **2004**, *53*, 1209–1220, doi:10.1111/j.1365-2958.2004.04199.x.
236. Manns, J.M.; Mosser, D.M.; Buckley, H.R. Production of a hemolytic factor by *Candida albicans*. *Infect. Immun.* **1994**, *62*, 5154–5156, doi: 10.1128/iai.62.11.5154-5156.1994.
237. Malcok, H.K.; Aktas, E.; Ayyildiz, A.; Yigit, N.; Yazgi, H. Hemolytic activities of the *Candida* species in liquid medium. *Eurasian J. Med.* **2009**, *41*, 95–98, PMID: 25610076.
238. Tsang, C.S.P.; Chu, F.C.S.; Leung, W.K.; Jin, L.J.; Samaranayake, L.P.; Siu, S.C. Phospholipase, proteinase and haemolytic activities of *Candida albicans* isolated from oral cavities of patients with type 2 diabetes mellitus. *J. Med. Microbiol.* **2007**, *56*, 1393–1398, doi:10.1099/jmm.0.47303-0.
239. Shuster, A.; Osherov, N.; Rosenberg, M. Alcohol-mediated haemolysis in yeast. *Yeast* **2004**, *21*, 1335–1342, doi:10.1002/yea.1183.
240. Shuster, A.; Korem, M.; Jacob-Hirsch, J.; Amariglio, N.; Rechavi, G.; Rosenberg, M. Microbial alcohol-conferred hemolysis is a late response to alcohol stress. *FEMS Yeast Res.* **2011**, *11*, 315–323, doi:10.1111/j.1567-1364.2011.00722.x.
241. Pereira, R.; Jadhav, R.; Baghela, A.; Barretto, D. *In vitro* assessment of probiotic potential of *Saccharomyces cerevisiae* DABRP5 isolated from bollo batter, a traditional goan fermented food. *Probiotics Antimicrob. Proteins* **2021**, *13*, 796–808, doi:10.1007/S12602-020-09734-8.
242. Fernández-Pacheco, P.; Monge, I.M.R.; Fernández-González, M.; Colado, J.M.P.; Arévalo-Villena, M. Safety evaluation of yeasts with probiotic potential. *Front. Nutr.* **2021**, *8*, 659328, doi:10.3389/fnut.2021.659328.
243. Hanna, M.; Xiao, W. Isolation of nucleic acids. *Methods Mol. Biol.* **2006**, *313*, 15–20, doi:10.1385/1-59259-958-3:015.
244. Lööke, M.; Kristjuhan, K.; Kristjuhan, A. Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications. *Biotechniques* **2011**, *50*, 325–328, doi:10.2144/000113672.
245. Fay, J.C.; Benavides, J.A. Evidence for domesticated and wild populations of *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genet.* **2005**, *1*, 0066–0071, doi:10.1371/journal.pgen.0010005.
246. Ayoub, M.J.; Legras, J.L.; Saliba, R.; Gaillardin, C. Application of multi locus sequence typing to the analysis of the biodiversity of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts from Lebanon. *J. Appl. Microbiol.* **2006**, *100*, 699–711, doi:10.1111/j.1365-2672.2006.02817.x.
247. White, T.J.; Bruns, T.; Lee, S.; Taylor, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols; Academic Press* **1990**, 315–322, New York
248. Garde, M.; Bruns, T.D. ITS primers with enhanced specificity for Basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol. Ecol.* **1993**, *2*, 113–118, doi:10.1111/j.1365-294X.1993.tb00005.x.
249. Bengtsson-Palme, J.; Ryberg, M.; Hartmann, M.; Branco, S.; Wang, Z.; Godhe, A.; De Wit, P.; Sánchez-García, M.; Ebersberger, I.; de Sousa, F.; et al. Improved software detection and extraction of ITS1 and ITS2 from ribosomal ITS sequences of fungi and other eukaryotes for analysis of environmental sequencing data. *Methods Ecol. Evol.* **2013**, *4*, 914–919,

doi:10.1111/2041-210X.12073.

250. Kumar, S.; Stecher, G.; Li, M.; Knyaz, C.; Tamura, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* **2018**, *35*, 1547–1549, doi:10.1093/molbev/msy096.
251. Letunic, I.; Bork, P. Interactive Tree Of Life (ITOL) v4: recent updates and new developments. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, W256–W259, doi:10.1093/nar/gkz239.
252. Pfliegler, W.P.; Horváth, E.; Kállai, Z.; Sipiczki, M. Diversity of *Candida zemplinina* isolates inferred from RAPD, micro/minisatellite and physiological analysis. *Microbiol. Res.* **2014**, *169*, 402–410, doi:10.1016/j.micres.2013.09.006.
253. Legras, J.L.; Karst, F. Optimisation of interdelta analysis for *Saccharomyces cerevisiae* strain characterisation. *FEMS Microbiol. Lett.* **2003**, *221*, 249–255, doi:10.1016/S0378-1097(03)00205-2.
254. Pfliegler, W.P.; Sipiczki, M. Does fingerprinting truly represent the diversity of wine yeasts? A case study with interdelta genotyping of *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Lett. Appl. Microbiol.* **2016**, *63*, 406–411, doi:10.1111/lam.12679.
255. Malgoire, J.Y.; Bertout, S.; Renaud, F.; Bastide, J.M.; Mallié, M. Typing of *Saccharomyces cerevisiae* clinical strains by using microsatellite sequence polymorphism. *J. Clin. Microbiol.* **2005**, *43*, 1133–1137, doi:10.1128/jcm.43.3.1133-1137.2005.
256. Jubany, S.; Tomasco, I.; Ponce De León, I.; Medina, K.; Carrau, F.; Arrambide, N.; Naya, H.; Gaggero, C. Toward a global database for the molecular typing of *Saccharomyces cerevisiae* strains. *FEMS Yeast Res.* **2008**, *8*, 472–484, doi:10.1111/j.1567-1364.2008.00361.x.
257. Clark, L. V.; Jasieniuk, M. Polysat: An R package for polyploid microsatellite analysis. *Mol. Ecol. Resour.* **2011**, *11*, 562–566, doi:10.1111/j.1755-0998.2011.02985.x.
258. Kamvar, Z.N.; Tabima, J.F.; Grünwald, N.J. Poppr: An R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction. *PeerJ* **2014**, *2*, e281, doi:10.7717/peerj.281.
259. Yue, J.-X.; Liti, G. Long-read sequencing data analysis for yeasts. *Nat. Protoc.* **2018**, *13*, 1213–1231, doi:10.1038/nprot.2018.025.
260. Katoh, K.; Rozewicki, J.; Yamada, K.D. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Brief. Bioinform.* **2019**, *20*, 1160–1166, doi:10.1093/bib/bbx108.
261. Baker, E.; Wang, B.; Bellora, N.; Peris, D.; Hulfachor, A.B.; Koshalek, J.A.; Adams, M.; Libkind, D.; Hittinger, C.T. The genome sequence of *Saccharomyces eubayanus* and the domestication of lager-brewing yeasts. *Mol. Biol. Evol.* **2015**, *32*, 2818–2831, doi:10.1093/molbev/msv168.
262. Naseeb, S.; Alsammar, H.; Burgis, T.; Donaldson, I.; Knyazev, N.; Knight, C.; Delneri, D. Whole genome sequencing, *de novo* assembly and phenotypic profiling for the new budding yeast species *Saccharomyces jurei*. *G3* **2018**, *8*, 2967–2977, doi:10.1534/g3.118.200476.
263. Scannell, D.R.; Zill, O.A.; Rokas, A.; Payen, C.; Dunham, M.J.; Eisen, M.B.; Rine, J.; Johnston, M.; Hittinger, C.T. The awesome power of yeast evolutionary genetics: new genome sequences and strain resources for the *Saccharomyces sensu stricto* genus. *G3* **2011**, *1*, 11–25, doi:10.1534/g3.111.000273.
264. Kim, S.; Liachko, I.; Brickner, D.G.; Cook, K.; Noble, W.S.; Brickner, J.H.; Shendure, J.; Dunham, M.J. The dynamic three-dimensional organization of the diploid yeast genome. *eLife* **2017**, *6*, e23623, doi:10.7554/eLife.23623.
265. Li, H.; Durbin, R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* **2009**, *25*, 1754–1760, doi:10.1093/bioinformatics/btp324.
266. Li, H.; Handsaker, B.; Wysoker, A.; Fennell, T.; Ruan, J.; Homer, N.; Marth, G.; Abecasis, G.; Durbin, R. The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics* **2009**, *25*, 2078–2079, doi:10.1093/bioinformatics/btp352.
267. Quinlan, A.R.; Hall, I.M. BEDTools: A flexible suite of utilities for comparing genomic

- features. *Bioinformatics* **2010**, *26*, 841–842, doi:10.1093/bioinformatics/btq033.
268. Poplin, R.; Ruano-Rubio, V.; DePristo, M.A.; Fennell, T.J.; Carneiro, M.O.; Auwera, G.A. Van der; Kling, D.E.; Gauthier, L.D.; Levy-Moonshine, A.; Roazen, D.; et al. Scaling accurate genetic variant discovery to tens of thousands of samples. *bioRxiv* **2018**, 2011178, doi:10.1101/2011178.
  269. Van der Auwera, G.A.; Carneiro, M.O.; Hartl, C.; Poplin, R.; del Angel, G.; Levy-Moonshine, A.; Jordan, T.; Shakir, K.; Roazen, D.; Thibault, J.; et al. From FastQ data to high-confidence variant calls: the genome analysis toolkit best practices pipeline. *Curr. Protoc. Bioinforma.* **2013**, *43*, 11.10.1-11.10.33, doi:10.1002/0471250953.bi1110s43.
  270. Fay, J.C.; Liu, P.; Ong, G.T.; Dunham, M.J.; Cromie, G.A.; Jeffery, E.W.; Ludlow, C.L.; Dudley, A.M. A polyploid admixed origin of beer yeasts derived from European and Asian wine populations. *PLOS Biol.* **2019**, *17*, e3000147, doi:10.1371/journal.pbio.3000147.
  271. Cingolani, P.; Platts, A.; Wang, L.L.; Coon, M.; Nguyen, T.; Wang, L.; Land, S.J.; Lu, X.; Ruden, D.M. A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain W1118; Iso-2; Iso-3. *Fly* **2012**, *6*, 80–92, doi:10.4161/fly.19695.
  272. Engel, S.R.; Wong, E.D.; Nash, R.S.; Aleksander, S.; Alexander, M.; Douglass, E.; Karra, K.; Miyasato, S.R.; Simison, M.; Skrzypek, M.S.; et al. New data and collaborations at the *Saccharomyces* Genome Database: updated reference genome, alleles, and the alliance of genome resources. *Genetics* **2021**, *220*, iyab224, doi:10.1093/genetics/iyab224.
  273. *HMX1* interactions, online: <https://www.yeastgenome.org/locus/S000004195/interaction> (Utolsó letöltés: 2022.03.07.).
  274. Ortiz, E.M. Vcf2phylip v2.0: Convert a VCF matrix into several matrix formats for phylogenetic analysis. **2019**, doi:10.5281/zenodo.2540861.
  275. Huson, D.H.; Bryant, D. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Mol. Biol. Evol.* **2006**, *23*, 254–267, doi:10.1093/molbev/msj030.
  276. Minh, B.Q.; Schmidt, H.A.; Chernomor, O.; Schrempf, D.; Woodhams, M.D.; Von Haeseler, A.; Lanfear, R.; Teeling, E. IQ-TREE 2: New models and efficient methods for phylogenetic inference in the genomic era. *Mol. Biol. Evol.* **2020**, *37*, 1530–1534, doi:10.1093/molbev/msaa015.
  277. Kalyaanamoorthy, S.; Minh, B.Q.; Wong, T.K.F.; Von Haeseler, A.; Jermin, L.S. ModelFinder: Fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nat. Methods* **2017**, *14*, 587–589, doi:10.1038/nmeth.4285.
  278. Hoang, D.T.; Chernomor, O.; Von Haeseler, A.; Minh, B.Q.; Vinh, L.S. UFBoot2: Improving the ultrafast bootstrap approximation. *Mol. Biol. Evol.* **2018**, *35*, 518–522, doi:10.1093/molbev/msx281.
  279. Csoma, H.; Zakany, N.; Capece, A.; Romano, P.; Sipiczki, M. Biological diversity of *Saccharomyces* yeasts of spontaneously fermenting wines in four wine regions: comparative genotypic and phenotypic analysis. *Int. J. Food Microbiol.* **2010**, *140*, 239–248, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.03.024.
  280. Huxley, C.; Green, E.; Dunham, I. Rapid assessment of *S. cerevisiae* mating type by PCR. *Trends Genet.* **1990**, *6*, 236, doi:10.1016/0168-9525(90)90190-h.
  281. Luo, G.; Samaranyake, L.P.; Yau, J.Y.Y. *Candida* species exhibit differential *in vitro* hemolytic activities. *J. Clin. Microbiol.* **2001**, *39*, 2971–2974, doi:10.1128/jcm.39.8.2971-2974.2001.
  282. CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts, 4th ed.; CLSI standard M38; Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, USA, 2017.
  283. Jakab, Á.; Mogavero, S.; Förster, T.M.; Pekmezovic, M.; Jablonowski, N.; Dombrádi, V.; Pócsi, I.; Hube, B. Effects of the glucocorticoid betamethasone on the interaction of *Candida albicans* with human epithelial cells. *Microbiol.* **2016**, *162*, 2116–2125, doi:10.1099/mic.0.000383.

284. Nemes, D.; Kovács, R.; Nagy, F.; Mező, M.; Poczok, N.; Ujhelyi, Z.; Pető, Á.; Fehér, P.; Fenyvesi, F.; Váradi, J.; et al. Interaction between different pharmaceutical excipients in liquid dosage forms—assessment of cytotoxicity and antimicrobial activity. *Mol.* **2018**, *23*, 1827, doi:10.3390/molecules23071827.
285. Fuchs, B.B.; O'Brien, E.; Khoury, J.B.E.; Mylonakis, E. Methods for using *Galleria mellonella* as a model host to study fungal pathogenesis. *Virulence* **2010**, *1*, 475–482, doi:10.4161/viru.1.6.12985.
286. Constante, M.; De Palma, G.; Lu, J.; Jury, J.; Rondeau, L.; Caminero, A.; Collins, S.M.; Verdu, E.F.; Bercik, P. *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 modulates the microbiota–gut–brain axis in a humanized mouse model of irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol. Motil.* **2020**, *33*, e13985, doi:10.1111/nmo.13985.
287. Benchling, available online: <https://benchling.com> (Utolsó elérés: 2022. 08. 30.)
288. Lee, M.E.; Deloache, W.C.; Cervantes, B.; Dueber, J.E. A highly characterized yeast toolkit for modular, multipart assembly. **2015**, *4*, 975–86, doi:10.1021/sb500366v.
289. Akhmetov, A.; Laurent, J.M.; Gollihar, J.; Gardner, E.C.; Garge, R.K.; Ellington, A.D.; Kachroo, A.H.; Marcotte, E.M. Single-step precision genome editing in yeast using CRISPR-Cas9. *Bio-protocol* **2018**, *8*, e2765, doi:10.21769/BioProtoc.2765.
290. Inoue, H.; Nojima, H.; Okayama, H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **1990**, *96*, 23–28, doi:10.1016/0378-1119(90)90336-p.
291. Ganz, T. Systemic iron homeostasis. *Physiol. Rev.* **2013**, *93*, 1721–1741, doi:10.1152/physrev.00008.2013.
292. Petropavlovskiy, A.; Tauro, M.; Lajoie, P.; Duennwald, M. A Quantitative imaging-based protocol for yeast growth and survival on agar plates. *STAR Protoc.* **2020**, *1*, doi:10.1016/j.xpro.2020.100182.
293. Imre, A.; Kovács, R.; Tóth, Z.; Majoros, L.; Benkő, Z.; Pfliegler, W.; Pócsi, I. Heme oxygenase-1 (*HMOX1*) loss of function increases the in-host fitness of the *Saccharomyces “boulardii”* probiotic yeast in a mouse fungemia model. *J. Fungi* **2022**, *8*, 522, doi: 10.3390/jof8050522.
294. Legras, J.-L.; Galeote, V.; Bigey, F.; Camarasa, C.; Marsit, S.; Nidelet, T.; Sanchez, I.; Couloux, A.; Guy, J.; Franco-Duarte, R.; et al. Adaptation of *S. cerevisiae* to fermented food environments reveals remarkable genome plasticity and the footprints of domestication. *Mol. Biol. Evol.* **2018**, *35*, 1712–1727, doi:10.1093/molbev/msy066.
295. Csoma, H.; Ács-Szabó, L.; Papp, L.A.; Sipiczki, M. Application of different markers and data-analysis tools to the examination of biodiversity can lead to different results: a case study with *Starmerella bacillaris* (synonym *Candida zemplinina*) strains. *FEMS Yeast Res.* **2018**, *18*, doi:10.1093/femsyr/foy021.
296. Suez, J.; Zmora, N.; Segal, E.; Elinav, E. The pros, cons, and many unknowns of probiotics. *Nat. Med.* **2019**, *25*, 716–729, doi: 10.1038/s41591-019-0439-x.
297. Sitterlé, E.; Maufrais, C.; Sertour, N.; Palayret, M.; d'Enfert, C.; Bougnoux, M.-E. Within-host genomic diversity of *Candida albicans* in healthy carriers. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 2563, doi:10.1038/s41598-019-38768-4.
298. Forche, A.; Cromie, G.; Gerstein, A.C.; Solis, N. V.; Pisithkul, T.; Srifa, W.; Jeffery, E.; Abbey, D.; Filler, S.G.; Dudley, A.M.; et al. Rapid phenotypic and genotypic diversification after exposure to the oral host niche in *Candida albicans*. *Genetics* **2018**, *209*, 725–741, doi: 10.1534/genetics.118.301019.
299. Phadke, S.S.; Maclean, C.J.; Zhao, S.Y.; Mueller, E.A.; Michelotti, L.A.; Norman, K.L.; Kumar, A.; James, T.Y. Genome-wide screen for *Saccharomyces cerevisiae* genes contributing to opportunistic pathogenicity in an invertebrate model host. *G3* **2018**, *8*, 63–78, doi:10.1534/g3.117.300245.
300. Grimberg, B.; Zeyl, C. The Effects of sex and mutation rate on adaptation in test tubes and to mouse hosts by *Saccharomyces cerevisiae*. *Evolution* **2005**, *59*, 431–438, doi:10.1111/j.0014-

3820.2005.tb01001.x.

301. Mroczyńska, M.; Brillowska-Dąbrowska, A. Virulence of clinical *Candida* isolates. *Pathog.* **2021**, *10*, 466, doi:10.3390/pathogens10040466.
302. Pérez-Torrado, R.; Querol, A. *Saccharomyces cerevisiae* show low levels of traversal across the human blood brain barrier *in vitro*. *F1000Research* **2017**, *6*, 944, doi:10.12688/f1000research.11782.2.
303. Czerucka, D.; Rampal, P. Diversity of *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 mechanisms of action against intestinal infections. *World J. Gastroenterol.* **2019**, *25*, 2188–2203, doi:10.3748/wjg.v25.i18.2188.
304. Stier, H.; Bischoff, S.C. Influence of *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 on the gut-associated immune system. *Clin. Exp. Gastroenterol.* **2016**, *9*, 269–279, doi:10.2147/ceg.S111003.
305. Smith, I.M.; Christensen, J.E.; Arneborg, N.; Jespersen, L. Yeast modulation of human dendritic cell cytokine secretion: an *in vitro* study. *PLoS One* **2014**, *9*, 12–14, doi:10.1371/journal.pone.0096595.
306. Di Paola, M.; Rizzetto, L.; Stefanini, I.; Vitali, F.; Massi-Benedetti, C.; Tocci, N.; Romani, L.; Ramazzotti, M.; Lionetti, P.; De Filippo, C.; et al. Comparative immunophenotyping of *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida* spp. strains from Crohn's disease patients and their interactions with the gut microbiome. *J. Transl. Autoimmun.* **2020**, *3*, 100036, doi:10.1016/j.jtauto.2020.100036.
307. Rizzetto, L.; Kuka, M.; De Filippo, C.; Cambi, A.; Netea, M.; Beltrame, L.; Napolitani, G.; Torcia, M.; D'Oro, U.; Cavalieri, D. Differential IL-17 production and mannan recognition contribute to fungal pathogenicity and commensalism. *J. Immunol.* **2010**, *184*, 4258–4268, doi:10.4049/jimmunol.0902972.
308. Cohen, L.; Ranque, S.; Raoult, D. *Saccharomyces cerevisiae boulardii* transient fungemia after intravenous self-inoculation. *Med. Mycol. Case Rep.* **2013**, *2*, 63–64, doi:10.1016/j.mmcr.2013.02.003.
309. Dauby, N. Risks of *Saccharomyces boulardii*-containing probiotics for the prevention of *Clostridium difficile* infection in the elderly. *Gastroenterology* **2017**, *153*, 1450–1451, doi:10.1053/j.gastro.2017.04.054.
310. Ragonnaud, E.; Biragyn, A. Gut microbiota as the key controllers of “healthy” aging of elderly people. *Immun. Ageing* **2021**, *18*, 2, doi:10.1186/S12979-020-00213-w.
311. Santino, I.; Alari, A.; Bono, S.; Teti, E.; Marangi, M.; Bernardini, A.; Magrini, L.; Di Somma, S.; Teggi, A. *Saccharomyces cerevisiae* fungemia, a possible consequence of the treatment of *Clostridium difficile* colitis with a probiotic. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* **2014**, *27*, 143–146, doi:10.1177/039463201402700120.
312. Rannikko, J.; Holmberg, V.; Karpelin, M.; Arvola, P.; Huttunen, R.; Mattila, E.; Kerttula, N.; Puhto, T.; Tamm, Ü.; Koivula, I.; et al. Fungemia and other fungal infections associated with use of *Saccharomyces boulardii* probiotic supplements. *Emerg. Infect. Dis.* **2021**, *27*, 2103–2109, doi:10.3201/eid2708.210018.
313. Caudal, E.; Friedrich, A.; Jallet, A.; Garin, M.; Hou, J.; Schacherer, J. Population-level survey of loss-of-function mutations revealed that background dependent fitness genes are rare and functionally related in yeast. *bioRxiv* **2021**, doi:10.1101/2021.08.25.457624.
314. Wibawa, T.; Praseno; Aman, A.T. Virulence of *Candida albicans* isolated from HIV infected and non infected individuals. *Springerplus* **2015**, *4*, 408, doi:10.1186/S40064-015-1215-0.
315. Coutinho, J.; Peixoto, T.; de Menezes, G.; Carvalho, C.; Ogaki, M.; Gomes, E.; Rosa, C.; Rosa, L.; Arantes, R.; Nicoli, J.; et al. *In vitro* and *in vivo* evaluation of the probiotic potential of antarctic yeasts. *Probiotics Antimicrob. Proteins* **2021**, *13*, 1338–1354, doi:10.1007/s12602-021-09758-8.
316. Siscar-Lewin, S.; Hube, B.; Brunke, S. Antivirulence and avirulence genes in human pathogenic fungi. *Virulence* **2019**, *10*, 935–947, doi:10.1080/21505594.2019.1688753.

317. Takada, Y.; Nishino, Y.; Ito, C.; Watanabe, H.; Kanzaki, K.; Tachibana, T.; Azuma, M. Isolation and characterization of baker's yeast capable of strongly activating a macrophage. *FEMS Yeast Res.* **2014**, *14*, 261–269, doi:10.1111/1567-1364.12098.
318. Wheeler, R.T.; Kupiec, M.; Magnelli, P.; Abeijon, C.; Fink, G.R. A *Saccharomyces cerevisiae* mutant with increased virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100*, 2766–2770, doi:10.1073/pnas.0437995100.
319. Roy, U.; Jessani, L.G.; Rudramurthy, S.M.; Gopalakrishnan, R.; Dutta, S.; Chakravarty, C.; Jillwin, J.; Chakrabarti, A. Seven cases of *Saccharomyces* fungaemia related to use of probiotics. *Mycoses* **2017**, *60*, 375–380, doi:10.1111/myc.12604.

## TÁRGYSZAVAK

*Saccharomyces 'boulardii'*

probiotikus élesztő

virulencia faktor

fungémia

multiplex PCR

hem oxigenáz-1

CRISPR/Cas9

géndeléción

immunhiány

genomika

## KEYWORDS

*Saccharomyces 'boulardii'*

probiotic yeast

virulence factor

fungemia

multiplex PCR

heme oxygenase-1

CRISPR/Cas9

gene deletion

immunocompromised

genomics

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőimnek Prof. Dr. Pócsi Istvánnak és Dr. Pfliegler Valter Péternek a doktori értekezésem elkészüléséhez nyújtott segítségért. Szeretném továbbá megköszönni nekik, hogy töretlenül hittek bennem és szakmailag támogattak az elmúlt 5 évben, mely jelentősen hozzájárult a PhD munkám során elért eredményekhez és sikerekhez.

Szeretném megköszönni az együttműködést a doktori értekezésem alapjául szolgáló publikációk társszerzőinek (Prof. Dr. Bácskay Ildikó, Prof. Dr. Gácsér Attila, Dr. Antunovics Zsuzsa, Dr. Benkő Zsigmond, Dr. Dóczy Ilona, Dr. Farkas Zoltán, Dr. Fekete Tünde, Dr. Jakab Ágnes, Dr. Kovács Károly, Dr. Kovács Renátó László, Dr. Ksenija Lopandic, Dr. Majoros László, Dr. Nemes Dániel, Dr. Pázmándi Kitti Lilla, Dr. Rádai Zoltán, Lovászné Rác Hanna Viktória, Tóth Zoltán) is, munkájukkal és szakmai tanácsaikkal jelentősen emelték a dolgozatom színvonalát.

Köszönöm a Molekuláris Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszék munkatársainak, hogy kérdéseimmel mindig bizalommal fordulhattam hozzájuk.

A kutatást támogatta a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal Fiatal Kutatói Pályázata (NKFIH FK 138910), az Innovációs és Technológiai Minisztérium Tématerületi Kiválóság Program Pályázata (TKP2021-EGA-20), az Új Nemzeti Kiválóság Program (ÚNKP-18-3-I-DE-4, ÚNKP-19-3-I-DE-234, ÚNKP-20-3-II-DE-103), valamint az Osztrák-Magyar Akció Alapítvány Pályázata (98öu7).