

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Egy gomba specifikus protein foszfatáz vizsgálata

Tóthné Szabó Krisztina

Témavezető: Dr. Dombrádi Viktor Béla



DEBRECENI EGYETEM

**MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA
Debrecen, 2020**

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések	5
2. Bevezetés	7
3. Irodalmi áttekintés	9
3.1 A <i>Candida</i> genus klinikai jelentősége.....	9
3.1.1 A <i>Candida</i> genus evolúciója és genetikája	9
3.1.2 <i>Candida</i> fertőzések	11
3.1.3 A <i>C. albicans</i> , mint opportunistá patogén	13
3.1.4 A <i>C. albicans</i> virulencia faktorai	14
3.2 Protein foszforiláció és defoszforiláció	19
3.3 A protein foszfatázok	21
3.3.1 A foszfatázokról általánosságban	21
3.3.2 A gomba PPPL foszfatázok	23
3.4 A gomba specifikus protein foszfatáz Z.....	26
3.4.1 A Ppz foszfatáz evolúciója	27
3.4.2 A Ppz foszfatázok szerkezete	28
3.4.3 A Ppz foszfatázok szabályozása	31
3.4.4 A Ppz foszfatázok funkciói.....	32
3.4.4.1 A CaPpz1 funkciói	35
4. Célkitűzések	38
5. Anyagok és módszerek.....	39
5.1 Anyagok	39
5.1.1 Vegyszerek.....	39
5.1.2 Oligonukleotidok.....	40
5.1.3 Oldatok.....	44
5.1.4 Tápoldatok	44
5.1.5 <i>C. albicans</i> törzsek	44
5.2 Módszerek	45
5.2.1 Biológiai módszerek.....	45
5.2.1.1 <i>C. albicans</i> sejtek tenyésztése.....	45
5.2.1.2 Növekedés vizsgálata	45
5.2.1.3 Biofilm képződés vizsgálata.....	45
5.2.1.4 Kolóniaképző képesség meghatározása	46

5.2.1.5 Életképesség és vitalitás vizsgálata	46
5.2.1.6 Morfológiai vizsgálatok	47
5.2.2 <i>Biokémiai módszerek</i>	48
5.2.2.1 Enzimaktivitás mérések.....	48
5.2.2.2 Glutation koncentrációk meghatározása	48
5.2.2.3 Genomi DNS izolálása	48
5.2.2.4 Polimeráz láncreakció (PCR)	49
5.2.3 <i>Proteomikai módszerek</i>	49
5.2.3.1 Fehérjeminták kinyerése és tisztítása	49
5.2.3.2 Kétdimenziós elektroforézis.....	50
5.2.3.3 Denzitometria	51
5.2.3.4 Gélben való emésztés	51
5.2.3.5 Tömegspektrometria (MS)	52
5.2.4 <i>Transzkriptomikai módszerek</i>	53
5.2.4.1 RNS izolálás.....	53
5.2.4.2 Az RNS minőségi ellenőrzése.....	53
5.2.4.3 DNS chip hibridizáció	54
5.2.4.4 RNS szekvenálás	54
5.2.4.5 Reverz transzkripció és kvantitatív PCR (RT-qPCR)	55
5.2.5 <i>Bioinformatikai módszerek</i>	56
5.2.5.1 Általános statisztikai számítások.....	56
5.2.5.2 Proteomikai adatok elemzése	56
5.2.5.3 Transzkriptomikai adatok elemzése	57
6. Eredmények	59
6.1 A CaPpz1 foszfatáz funkcióinak felderítése proteomikai és foszfoproteomikai vizsgálatokkal.....	59
6.1.1 A CaPPZ1 gén deléciójának hatása a fehérje foszforilációra	60
6.1.2 CaPPZ1 gén deléciójának hatása a fehérje mennyiségre.....	62
6.1.3 A foszfoproteomikai és proteomikai vizsgálatok együttes kiértékelése	62
6.1.4 A CaPPZ1 gén deléciójának hatása a biofilm képzésre	66
6.2 A CaPpz1 foszfatáz funkcióinak felderítése transzkriptom analízissel	68
6.2.1 A CaPpz1 hiánya és az oxidatív stressz fiziológiai hatásai	69
6.2.2 A DNS chip adatok kiértékelése	74
6.2.3 RNS szekvenálási adatok kiértékelése.....	75
6.2.4 Gének ontológiai (GO) elemzése	78

6.2.5 Génexpressziós változások kvantitatív elemzése hőterképek segítségével	80
6.2.6 RNS szekvenálási adatok megerősítése RT-qPCR segítségével	84
6.2.7 RNS érés folyamatának ellenőrzése RT-qPCR-rel	91
7. Megbeszélés	94
7.1 A CaPpz1 szerepe a proteom és a foszfoproteom vizsgálata alapján.....	94
7.2 A CaPpz1 szerepe a transzkriptom analízis szerint.....	101
7.2.1 A CaPpz1 új funkciói	104
7.2.1 Az oxidatív stressz válasz	106
7.2.3 A CaPpz1 szerepe az oxidatív stressz válaszban	108
7.3 Konklúziók	113
8. Összefoglalás	116
9. Summary	117
10. Irodalomjegyzék	118
11. Tárgyszavak	138
12. Köszönetnyilvánítás	139
13. Publikációs lista	140
14. Függelék	142

1. Rövidítések

cAMP	ciklikus adenosin-monofoszfát
DMSO	dimetil-szulfoxid
dNTP	dezinukleozid-trifoszfát
DTT	ditiotreitol
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
FSC-A	forward scatter area
FSC-H	forward scatter height
GPI	glicerofoszfoinózitol
H ₂ O ₂	hidrogén-peroxid
IPG	immobilizált pH gradiens
KO	<i>cappz1</i> deléció mutáns törzs
KOt	<i>tBOOH</i> -al kezelt <i>cappz1</i> deléció mutáns törzs
log ₂ FC	fold change érték kettes alapú logaritmus
NADPH	nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát
NaOH	nátrium-hidroxid
NFW	nukleázmentes víz
OD	optikai sűrűség (abszorbancia)
PBS	foszfát-puffer
PMSF	fenilmetilszulfonil-fluorid
RNA-Seq	RNS szekvenálás
rpm	fordulat/perc
SDS	nátrium-dodecilszulfát
TAE	Tris-acetát-EDTA
<i>tBOOH</i>	<i>tercier</i> -butil-hidroperoxid
TF	transzkripció faktor
WT	vad törzs (QMY23)
WTt	<i>tBOOH</i> -val kezelt vad törzs (QMY23)
YPD	Yeast Extract-Peptone-Dextrose
β-ME	β-merkaptotanol

Megjegyzés:

A kémiai elemek, aminosavak, fehérjék, gének, fajok neveit rövidítve a nemzetközi nomenklátúra szerint használtuk (pl. CaPpz1-*Candida albicans* protein foszfatáz Z1 (fehérje) és CaPPZ1-*Candida albicans* protein foszfatáz Z1 (gén)). Kétféle rövidítéssel jeleztük, hogy az adott fehérje vagy gén melyik fajból származik.

2. Bevezetés

Az invazív candidiasis a *Candida* genusba tartozó gombák által okozott súlyos fertőzés. A betegekből leggyakrabban izolált *Candida* faj a *Candida albicans* (Poulain, 2015). Egy 2008 és 2011 között végzett tanulmány szerint 2329 klinikai mintából 885 (38 %) esetben izoláltak *C. albicans*-t, de emellett más *Candida* fajok - mint a *Candida glabrata* vagy a *Candida parapsilosis* - is kezdenek elterjedni a kórházi fertőzéseket okozó kórokozók körében (Lockhart és mtsai., 2012). A *C. albicans* a normál humán mikrobiom tagja (Sardi és mtsai., 2013). Egészséges emberek 65 %-ában található meg ez az opportunistá patogén úgy, hogy nem okoz komoly tüneteket (Odds, 1987). A környezeti tényezők változásával viszont veszélyes patogén gombaként viselkedik. Ismeretes, hogy a legyengült immunrendszerű betegekben (AIDS, autoimmun betegség, immunszuppresszív kezelés) a candidiasis halálos kimenetelű lehet (Perlroth és mtsai., 2007). Magas a fertőzés rizikófaktor a cukorbetegség, daganatos megbetegedésekben szenvedők, terhes nők, valamint idős emberek között, továbbá szteroid és antibiotikum terápia használata esetén (Perlroth és mtsai., 2007). Mivel a jelenleg használt gombaölő szerekkel szemben egyre gyakoribb a rezisztencia, szükségessé vált olyan új hatáspontú gyógyszerek és kombinált terápiák kifejlesztése, amelyekkel hatékonyan szállhatunk szembe a *C. albicans* fertőzésekkel. A manapság forgalmazott gyógyszerek jelentős része jelátviteli útvonalakat érint, ezért úgy gondoljuk, hogy a szignáltranszdukciós terápia hatékony lehet a *C. albicans* elleni küzdelemben is. Az egyik leggyakoribb jelátviteli szignál a fehérjék foszforilációs állapota, amit a protein foszforiláció és defoszforiláció viszonya határoz meg (Shi, 2009). Számos ismert gyógyszer célpontjai a foszforilációt végző protein kinázok (Hunter, 2009), amelyek mind egy ősi családból származnak (Manning és mtsai., 2002). Emellett ígéretes megközelítés lehet, hogy a defoszforilációt végző foszfatázok csoportjából választunk gyógyszer célpontot. A protein foszfatázok családja sokkal változatosabb (Chen és mtsai., 2017), evolúciójuk szerteágazó, és több gombaspecifikus képviselőjüket is ismerjük (Ariño és mtsai., 2019). Az egyik ilyen gomba specifikus Ser/Thr foszfatáz a protein foszfatáz Z1, amelyet elsőként a *Saccharomyces cerevisiae* modellszervezetben írtak le (Posas és mtsai., 1992). A *C. albicans*-ban egyetlen protein foszfatáz Z gén található, amit *CaPPZ1*-nek nevezték el (Kovács és mtsai., 2010), és kimutatták, hogy számos fiziológiás folyamatban játszik szerepet (Ádám és mtsai., 2012). Azt javasoljuk, hogy a gén terméke, a CaPpz1 protein megfelelő antifungális gyógyszer-célpont lehet a következő megfontolások alapján:

1. Ismeretes, hogy a CaPpz1 gomba specifikus foszfatáz szerepet játszik a fertőzőképesség kialakításában (Ádám és mtsai., 2012). A *CaPPZ1* gén deléciója nem pusztítja el a gombát, de lassítja annak kitapadását és az azt követő élesztő-hifa átalakulást (Nagy és mtsai., 2014). Tehát a foszfatáz gátlása képes blokkolni az invazív hifa forma fejlődését, ami összefüggésben áll a virulenciával (Sudbery és mtsai., 2004). Úgy tűnik, hogy a *C. albicans* képes kompenzálni a foszfatáz hiányát, így a foszfatáz gátlása csak viszonylag enyhe következményekkel járna, ezért úgy gondoljuk, hogy a jelentősebb hatás kiváltására szükség van egy másik jelátviteli útvonal megzavarására is. Miután korábban kimutatták a CaPpz1 szerepét az oxidatív stressz válaszban (Leiter és mtsai., 2012) azt javasoljuk, hogy a foszfatáz gátlását enyhe oxidatív kezeléssel kombinálva egy specifikus antifungális kezelést lehetne kifejleszteni.

2. A CaPpz1 fiziológiás gátlószere a CaCab3 fehérje (Petrényi és mtsai., 2016), ami nagy mérete és többirányú funkciója miatt nem tekinthető optimális gyógyszer-alapanyagnak. Ismeretes azonban, hogy a fehérje konzervált C-terminális doménjében található két CaPpz1 specifikus szerkezeti elem (az L1-csavarulat, és a specifikus C-terminális hélix) (Chen és mtsai., 2016), valamint a foszfatáz egyedi N-terminális doménje szabályozó funkcióval rendelkezik (Szabó és mtsai., 2019a). Tehát a CaPpz1 specifikus C- és N-terminális szerkezeti elemei lehetővé teszik kis molekula tömegű CaPpz1 specifikus inhibítorok tervezését (Chen és mtsai., 2016).

A fenti érvek alapján indokolt a CaPpz1 foszfatáz működésének és szabályozásának további kutatása. Mivel a korábbi célzott vizsgálatok (Ádám és mtsai., 2012; Petrényi és mtsai., 2016; Szabó és mtsai., 2019a) a klasszikus élesztő modellel, a *S. cerevisiae*-vel végzett kísérletek logikáját követték, elképzelhető, hogy a *C. albicans* fonalas gombában éppen a fertőzőképességgel kapcsolatos funkciók nem kerültek felszínre. Ezért munkám során hipotézismentes, globális proteomikai és transzkriptomikai megközelítéseket alkalmaztam a foszfatáz új célpontjainak megismerésére, valamint eddig még nem ismert funkcióinak felkutatására. Kiemelt témám volt a *CaPPZ1* gén hiánya és az oxidatív stressz kombinációjának együttes vizsgálata.

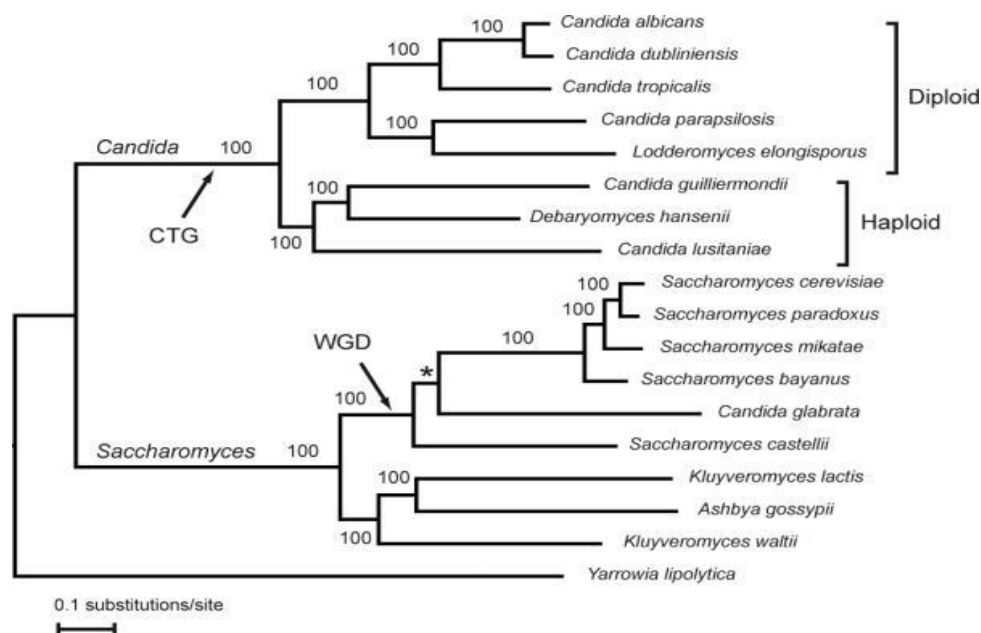
3. Irodalmi áttekintés

3.1 A *Candida* genus klinikai jelentősége

A gombás megbetegedések mára globális problémává váltak, hiszen nem csak az emberekre és az emlősökre, de számos mezőgazdasági növényre, egyes denevérfajokra és számos kételtű élőlényre jelentenek veszélyt (Sellam és Whiteway, 2016). A gombafertőzések száma egyre jobban növekedik az emberek körében is, aminek hátterében egyrészt az AIDS megbetegedések, a daganatos megbetegedések, valamint a szerv transzplantációk számának növekedése áll (Perlroth és mtsai., 2007). Emellett a kórházi ápolás során bekövetkező nosokomiális fertőzésekért főleg az antibiotikumok széleskörű használata, valamint az antifungális szerekkel szembeni megnövekedett rezisztencia tehető felelőssé. Ezen gombás megbetegedések nagy részéért a *Candida* genus a felelős (Perlroth és mtsai., 2007).

3.1.1 A *Candida* genus evolúciója és genetikája

A legfontosabb *Candida* fajokat Butler és munkatársai (2009) műve alapján mutatom be. A szerzők összehasonlították az egyes *Candida* és *Saccharomyces* fajok genomját. Mivel a *Saccharomyces* genusba tartozó *S. cerevisiae* a legismertebb gomba modellszervezet, legtöbbször ezt használják összehasonlító vizsgálatokban (1. ábra).



1. ábra A *Candida* és a *Saccharomyces* fajok filogenetikája (Butler és mtsai., 2009)

Az ábrán összevetették a *C. albicans* SC5314 törzs, a *Debaryomyces hansenii* tengeri élesztő és számos *Saccharomyces* törzs, a *C. albicans* WO-1 izolátum; a *Candida tropicalis* és *C. parapsilosis*, patogének; a *Lodderomyces elongisporus*, valamint két haploid patogén, a *Candida guilliermondii* és a *Candida lusitaniae* genom szekvenciáit. Az itt felsorolt fajok széles evolúciós spektrumot fednek le és nagyban különböznek egymástól a patogenitás valamint a szaporodás szempontjából.

Nyilak mutatják a WGD: teljes genom duplikáció, és CTG: specifikus kodon használat megjelenését. Az utóbbi azt jelenti, hogy a CUG kodon leucin helyett szerint kódol. Skála: 0,1 aminosav szubsztitúció/hely (100 aminosavankét 0,1 mutáció). A jelzett elágazások valószínűsége 100%. A *-gal jelölt ágon levő fajok esetében az egyes gének csoportjai azonos relatív pozícióban helyezkednek el a genomban, amelyeket szintenikus régióknak hívunk.

A *Saccharomyces* fajok esetében teljes genom duplikáció történt, ami jelentősen megnövelte a génkészletet. A *Candida* genusban jelent meg a nem konvencionális CTG kodon használat (Butler és mtsai., 2009). A *Candida* genuson belül a *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. dubliniensis* és további két képviselő diploid, míg a *C. guilliermondii*, *D. hansenii* és *C. lusitaniae* haploid genommal rendelkezik (1. ábra). A *C. glabrata* névvel ellentétben nem a *Candida* genushoz tartozik, hanem a *S. cerevisiae*-vel van rokonságban. A CTG- Ser specifikus kodon használatot mutató *Candida* fajok (pl. *C. albicans*, Santos és Tuite, 1995) számos tagja, ha nem az összes aszexuálisan szaporodik (Tavanti és mtsai., 2005; Butler és mtsai., 2009), vagyis a meiózis hiányzik a szaporodási ciklusukból. Ebből az következik, hogy nem lehet keresztezni őket és az allélok egymástól függetlenül fejlődnek. Ez megnehezíti genetikai vizsgálatukat, ui. diploid élőlényként sokszor egy gén kiütése mindkét allélon szükséges a megfelelő fenotípus elérése érdekében. Az évek során számos anyagcsere gént távolítottak el a

genomból és használtak fel szelekcióra, mint pl. az *URA3* orotidin-5'-monofoszfát dekarboxiláz gént (Fonzi és Irwin, 1993). Azonban ezen gének kiütése megváltoztathatja a kromoszómák számát (Samaranayake és mtsai., 2011) és befolyásolhatja a virulenciát (Kirsch és Whitney, 1991). Emellett a *C. albicans* különösen toleráns az aneuploidiával szemben (Rustchenko, 2007). Később a *LEU2* (3-izopropilmalát dehidrogenáz) és *HIS1* (ATP-foszforibozil transzferáz) markerek használata terjedt el, amikor az eredeti *C. albicans* SC5314 törzsből Noble és Johnson génkiütések céljára létrehozta az *LEU2* és *HIS1* auxotróf SN87 *C. albicans* törzset, aminek a genotípusa *ura3Δ-iro1Δ::imm⁴³⁴/URA3-IRO1, his1Δ/his1Δ, leu2Δ/leu2Δ* (Noble és Johnson, 2005). Ez a törzs nem mutatott kariotípus változást, a markerek stabilan a kiütött gén helyén maradtak és nem befolyásolták az eredeti törzs virulenciáját sem. Munkacsoportunk korábban az SN87-ből hozta létre a *ppz1* null mutáns törzset, és ezt a szülői törzset használta kontrollként (Ádám és mtsai., 2012). Fontos megjegyezni, hogy a *LEU2* marker a *C. maltosa*-ból, míg a *HIS1* a *C. dubliniensis*-ből származott (Noble és Johnson, 2005). A markergének eltérő eredete azért előnyös, mert a heterológ markerek valószínűleg kizárják a markerek kromoszómális lókuszával való rekombinációt. Mivel az SN87 két markerben is különbséget mutatott a *ppz1* mutáns törzsünkhöz képest, újabb kutatásaink során a QMY23 kontroll törzset használtuk fel, amely csak a *PPZ1* gén jelenlétében különbözik a *ppz1* törzstől. Az Alexander Johnson professzor által számunkra megküldött új kontroll törzs genotípusa a következő: *his1Δ/his1Δ, leu2Δ::C. dubliniensis HIS1 /leu2Δ::C. maltosa LEU2,URA3/ura3Δ::imm⁴³⁴, IRO1/iro1Δ::imm⁴³⁴* (Mitrovich és mtsai., 2007). Mivel az általunk használt *C. albicans* törzsek mind a SC5314 szülői törzsből származtak, munkánk során az SC5314 genom szekvenciáját (Jones és mtsai., 2004; Skrzypek és mtsai., 2017) tekintettük törzsgenomnak.

3.1.2 *Candida* fertőzések

A *Candida* genus közel 200 fajt tartalmaz, amelyek közül 20 fajról bizonyították biztosan, hogy képes fertőzést okozni az emberi szervezetben. Ezek közül a *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* és *Candida krusei* felelősek a fertőzések többségéért (Lockhart és mtsai., 2012). Ezek a fajok az egészséges normál flóra részei. Jelen vannak a bőr felszínén, szájban, torokban, bélben és a vaginában, anélkül hogy bármilyen komolyabb tünetet okoznának. Azonban kóros elszaporodásuk súlyos, akár életveszélyes állapothoz vezethet. A candidiasis kialakulhat a szájban és a torokban, amit összefoglaló néven szájpenésznek nevezünk vagy a nyelőcsőben, amit nyelőcsői candidiasisnak hívunk. A másik leggyakoribb

fertőzés a vaginát érinti, amit vulvovaginális candidiasisnak is hívunk. Ez a nők csaknem 75 %-t érinti (Perlroth és mtsai., 2007). Végül invazív candidiasisról beszélhetünk akkor, amikor a *Candida* sejtek bejutnak a véráramba (candidemia) és a fertőzés széterjed a szervezetben (disszeminált candidiasis) és így kialakul az egyes szerveket érintő „mély” fertőzés (Pfaller és mtsai., 2011). Ennek számos klinikai megnyilvánulása ismeretes, mint pl. az agyhártyagyulladás vagy a hashártyagyulladás. A candidémia 2013 és 2017 között évente kb. 25 000 megbetegedést okozott az USA-ban (Tsay és mtsai., 2018). A megbetegedések kb. 20 %-a a csecsemőket, míg kb. 30 %-a a 65 év felettieket érinti, ami mögött valószínűleg az immunrendszer nem megfelelő állapota áll (Benedict és mtsai., 2018). Végezetül meg kell említeni, hogy az invazív *Candida* fertőzések sokszor halálhoz vezetnek. A kórházi halálozási arány a *Candida* fajtól függő módon 20-60 % közé tehető. Azonban a betegek általában már más betegségben is szenvednek, ezért nehéz megmondani, mekkora a candidémia által okozott valós halálozási arány.

A szisztémás (vérárami) fertőzéseket okozó fajok eloszlása a következő a CDC (Centers for Disease Control and Prevention) 2019. évi adatbázisa szerint: *C. albicans* (37 %), *C. glabrata* (27 %), *C. parapsilosis* (14 %), *C. tropicalis* (8 %) és *C. krusei* (2 %). Ezek közül a *C. albicans*-t a 4. leggyakoribb kórokozóként tartják számon, amely a nosokomiális fertőzésekért felelős az USA-ban (Morgan, 2005). Emellett egyre növekedik a 2009-ben azonosított *Candida auris* által okozott fertőzések incidenciája, ugyanis ez a gombafaj az USA-ban 1 év alatt (2018) 318 %-os növekedést mutatott a 2015-2017 időszakban diagnosztizált megbetegedések átlagával szemben. Súlyosítja a helyzetet, hogy ez a faj multi-rezisztenciát mutat az antifungális szerekkel szemben, ui. a klinikai izolátumok 90 %-a min. 1 antifungális szerre rezisztens (<https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/threats-report/candida-auris-508.pdf>).

A *Candida* fertőzés diagnózisának felállítására az egyik legfontosabb módszer a mikroszkópos vizsgálat, de szerológiai vizsgálatokat is használnak (Gergely, 2003). Az esetek többségében vérmintából végeznek tenyésztést, de a diagnosztizálásban nincs egy általánosan elfogadott módszer (CGD).

Jelenleg a betegek kezelésére a fluconazol és az echinokandinok a legelterjedtebbek, azonban egyre több törzs válik rezisztenssé velük szemben (Perlin, 2014; Morschhäuser, 2016; Pappas és mtsai., 2016; Robbins és mtsai., 2017). Ezeknek az antimikotikus szereknek az elsődleges célpontja a gomba sejtfala és a plazmamembránja. Számos antifungális szer célozza az ergoszterolt, amely egy fluiditásért és permeabilitásért felelős lipid a gombasejt membránjában. Ezek közül az azol származékok a legelterjedtebbek, mint pl. a fluconazol

(Debono és mtsai., 1994). Az azolok a 14- α dimetiláz enzim gátlásán keresztül gátolják a lanoszterol $\rightarrow$ ergoszterol átalakulást és ezáltal az ergoszterol bioszintézist (Kathiravan és mtsai., 2012). A poliének, mint a nisztatin és az amfotericin B az ergoszterolhoz kötődve komplexet képeznek, amely egyértékű ionok és más citoplazmatikus komponensek szivárgásához vezet (Odds és mtsai., 2003; Walsh és mtsai., 2008; Baginski és Czub, 2009). Az echinokandinok (anidulafungin, caspofungin és micafungin) az azolokkal és poliénekkal szemben a sejtfalat támadják (Lockhart és mtsai., 2012). A sejtfalban levő β -1,3 glükán szintéziséért felelős fehérjekomplexet megcélozva gátolják a glükán szintézist (Odds és mtsai., 2003).

Az antimikotikus szerekkel szembeni rezisztencia számos mechanizmusnak köszönhető, mint pl. a hatékony gyógyszer koncentráció csökkenése, a gyógyszer-célpontok megváltozása vagy túltermelése, valamint metabolikus elkerülő utak használata (Sanglard, 2016). Az azolokkal szembeni rezisztencia a kipumpáló mechanizmusok aktiválásával, a célmolekula minőségének vagy mennyiségének megváltozásával, valamint a sejtfal összetétel változásával állhat összefüggésben (Scorozoni és mtsai., 2017). Ezeknek a problémáknak az áthidalására kombinált terápiák alkalmazása lehetne a megoldás. Egynél több gyógyszer használata fokozhatja a hatékonyságot azáltal, hogy egyszerre több célpont ellen is fellépünk, valamint a két gyógyszer növelheti egymás hatását (Chen és mtsai., 2014). A tricolsan pl. növelte a fluconazol hatását *C. albicans* ellen (Yu és mtsai., 2011). Továbbá kimutatták, hogy az amfifil tobramycin származékok (C_{12} és C_{14}) az azolokkal (pl. fluconazol) kombinálva hatékonyak a *C. albicans* törzsekkel szemben (Shrestha és mtsai., 2015). Egy még frissebb kutatás kimutatta, hogy a flukonazol D-penicillinammal kombinálva növeli a *C. albicans*-sal fertőzött *Galleria mellonella* lárva túlélését, úgy, hogy nem csak a planktonikus sejtekre, de a biofilm sejteire is hatott (Li és mtsai., 2019). A fentiekkel összhangban munkám egyik célja egy *C. albicans* elleni kombinált kezelés alapjainak feltárása volt.

3.1.3 A *C. albicans*, mint oportunistá patogén

A *C. albicans* az Ascomycota-k törzsébe, Saccharomycetes-ek osztályába, Saccharomycetales-ek rendjébe, Debaryomycetaceae-k családjába és a *Candida* genusba tartozó gombafaj. A *Candida* genus speciesei közül a *C. albicans* a legjelentősebb, hiszen ez okoz a legtöbb esetben oportunistá fertőzést. Egészséges személyekben a kolonizációs ráta nagyjából 50 %-ra tehető a szájban, 40 %-os a hüvelyi szövetekben és 73 %-os a gasztrointesztinális traktusban, valamint a genitális traktusban (Odds, 1987). Számos tényező

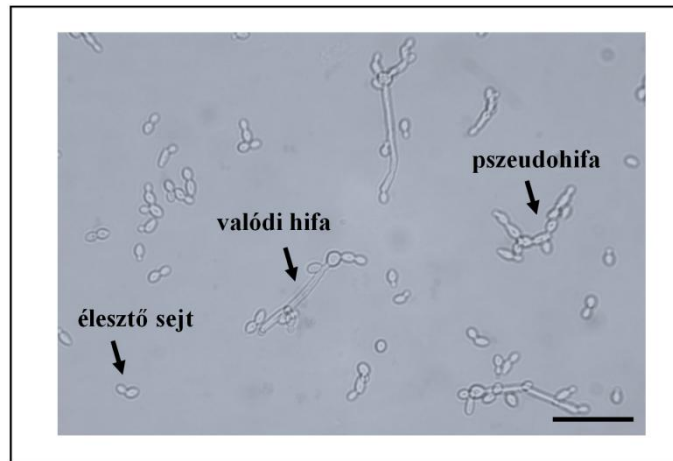
elősegítheti azonban a gomba túlszaporodását a szervezetben, amit már korábban részleteztem (Martins és mtsai., 2014). Egy 2017-es tanulmány szerint a járóbetegiek székletmintáinak 59 %-ban detektáltak *Candida*-t, és ezen minták 60 %-ból *C. albicans*-t izoláltak (Barcella és mtsai., 2017). A kórházi páciensek között ez még magasabb arányt jelentett: a minták 67 %-ban azonosítottak *Candidát* és ezeknek az izolátumoknak a 65 %-ában *C. albicans* volt jelen. Mára a candidemia vezető oka lett az életet veszélyeztető szisztémás fertőzéseknek az USA-ban és ezért az invazív fajok közül leggyakrabban a *C. albicans* a felelős. A halálozási ráta magas, különösen abban az esetben, ha a fertőzést későn diagnosztizálják (Blot és mtsai., 2002; Brown és mtsai., 2012).

A *C. albicans* normál körülmények között vékony sejtfallal körülhatárolt ovális élesztő sejtek formájában található. Ezek az élesztősejtek bimbózással szaporodnak. Elkülöníthetünk pszeudohifa formákat, amelyek szét nem vált élesztősejtek, és valódi hifákat. Emellett klamidospórákat is tud képezni, amely a zord környezeti tényezők mellett a túlélésüket segíti elő (Staib és Morschhäuser, 2007). Ha megváltoznak a környezeti tényezők, a gomba képes túlszaporodni és különböző súlyosságú betegségeket okozni.

A betegség lefolyása során 3 jól elkülöníthető stádiumot írtak le: (i) adhézió, (ii) invázió és (iii) a gazdasejt károsítása (Martin és mtsai., 2011; Naglik és mtsai., 2011). A folyamat során gyulladás alakul ki, ami egy jellegzetes válasz a gomba okozta fertőzésekre. A gomba megtapadása a gazdasejten fontos lépése a patogenezisnek, amelyet számos faktor befolyásol, köztük GPI-proteinek, melyek a sejt felszínén expresszálódnak. Az invázió folyamata egyrészt történhet fagocitotikus sejtek endocitózis indukciójával, másrészt aktív penetrációval. Végül a gazdasejt károsítása közvetlenül történik; a hifa formák betörnek a szövetekbe és számos virulencia faktort szekretálnak, köztük hidrolázokat és egyéb károsító faktorokat szekretálnak, amelyek szintén elősegítik a további penetrációt és a hifa növekedést (Wächtler és mtsai., 2011).

3.1.4 A *C. albicans* virulencia faktorai

A *C. albicans* számos virulencia faktorral rendelkezik, amelyek közé sorolható többek között az élesztő-hifa átalakulás, a gazdasejteket károsító hatás és a biofilm képzés (Mayer és mtsai., 2013). Az élesztő-hifa (pszeudohifa, valódi hifa) (2. ábra) átalakulás képessége esszenciális a szöveti invázió kialakításában, valamint a biofilm képzésben is (Gow és mtsai., 2002). Ezt a gyors morfológiai átalakulást nevezzük dimorfizmusnak.



2. ábra A *C. albicans* különböző morfológiai formái

Az élesztő formák 4-6 μm átmérőjű, kissé ovális alakú sejtek. A pszeudohifák olyan bimbózó sejtek, amelyek még nem váltak el, míg a valódi hifák többsejtes organizmusok. A valódi hifák sejtjei közötti szeptumokon pórusok találhatóak, amelyek lehetővé teszik a folyamatos anyagáramlást (ezek a sejtek már metabolikusan nem aktívak). A képet fáziskontraszt mikroszkóp segítségével készítettük a QMY23 kontroll törzsről. Skála: 50 μm

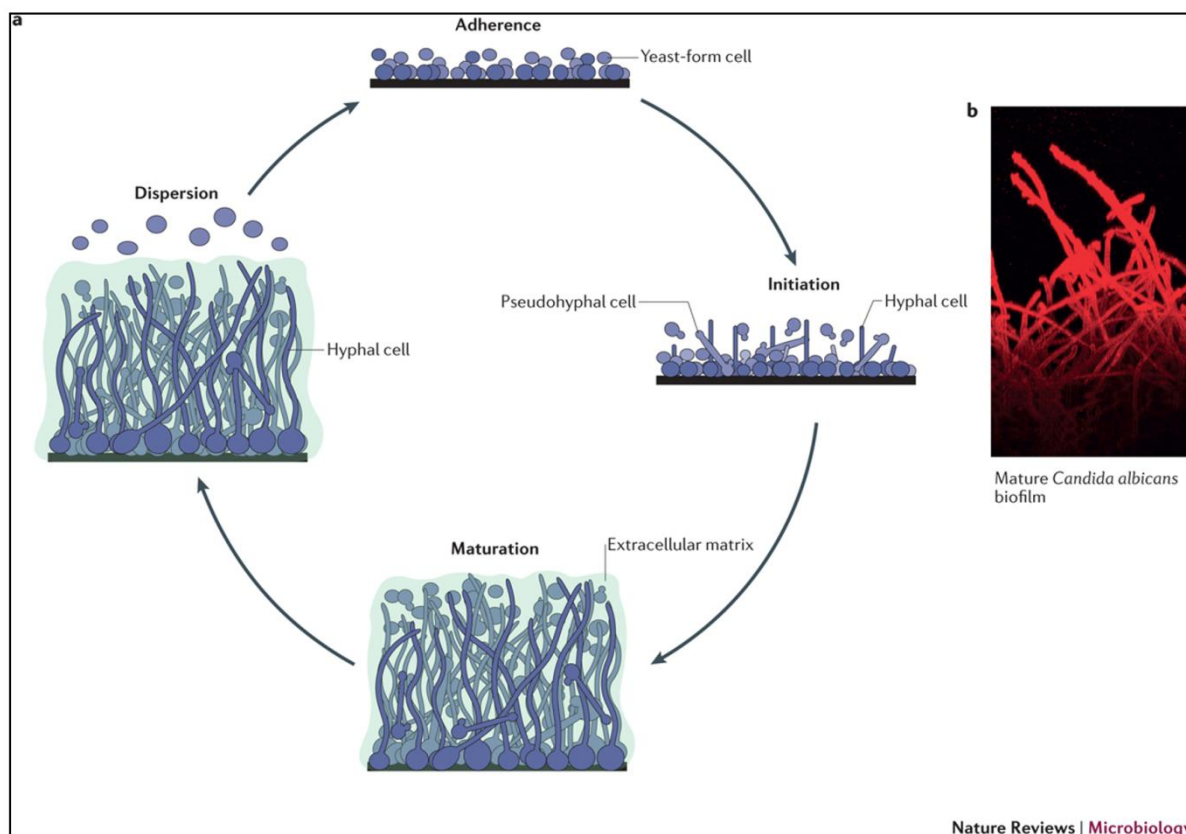
Számos szignál kiválthatja a gombák filamentózus növekedését, többek között a pH, a hőmérséklet megváltozása vagy az N-acetilglükózamin és a prolin jelenléte. A szervezetben a gomba fertőzőképességének kialakításában elsősorban a szérum vagy makrofágok általi élesztő $\rightarrow$ hifa morfológiai átalakulás játszik szerepet (Cutler, 1991). A növekedési dinamika, a sejtek felépítése, a génexpresszió, a sejtfelszíni molekulák és a fertőzőképesség mind olyan tulajdonság, ami meghatározza a sejtek morfológiáját, vagyis azt, hogy az élesztősejteknek vagy a hifanövekedésnek kedvez-e a környezet (Gow és mtsai., 2011). Számos kutatás bizonyította, hogy a filamentózus növekedést a környezeti tényezők és az általuk kiváltott számos szignálút vonal befolyásolja (Huang, 2012). Jó példa erre az éhezésre, vagy a szérum jelenlétére adott válasz a cAMP-függő PKA útvonalon keresztül Efg1 (Enhanced Filamentous Growth) és Flo8 transzkripciós szabályozás (Huang, 2012). A PKA aktivációja az Efg1, valamint a Flo8 foszforilációját okozva elindítja az élesztő $\rightarrow$ hifa átalakulást, ui. ezek a foszforilált TF-k különböző hifa specifikus gének aktiválását végzik (*ALS1*, *HWP1* és *HYR1*). Defoszforilált állapotban mind a Flo8, mind az Efg1 gátolja a filamentózus növekedést. A Hog1 MAP kináz útvonal pedig nem csak az ozmotikus stressz, de az oxidatív stressz által indukált válaszban is kulcsszereppel bír (San Hosé és mtsai., 1996; Smith és mtsai., 2004). Természetesen vannak negatív regulátorai is a folyamatnak, mint a Tup1 általános transzkripciós represszor mediált gátlás (Braun és mtsai., 1997).

A gazdasejtek károsításáért elősorban az invazív hifa formák a felelősek, de számos hidrolitikus enzimet is szekretálnak a gombasejtek, amelyek részt vesznek az adhézióban,

szövetkárosításban, valamint a gazdaszervezet immunrendszerével szembeni védelemben. A *C. albicans* által szekretált legfontosabb hidrolitikus enzimek az aszpartil proteázok (Sap), foszfolipázok és a lipázok (Naglik és mtsai., 2003). Összesen 10 SAP gént tartalmaz a *C. albicans* genomja. Ezeknek szerepük van az extracelluláris mátrix proteinek, proteáz inhibitor fehérjék és antimikrobiális fehérjék lebontásában (Naglik és mtsai., 2003). A foszfolipázoknak eddig négy csoportját azonosították (foszfolipáz A-D). A foszfolipázok szekretált lipolitikus enzimek, amelyek csak gombákban fordulnak elő (Sugiyama és mtsai., 1999) és a sejtmembrán károsításában vesznek részt (Schaller és mtsai., 2005). Végül legalább 10 lipáz kódoló gént (*LIP*) hordoz a *C. albicans* genomja (Stehr és mtsai., 2000). A gének különbözőképpen expresszálódnak a szénforrásra vagy fertőzésre adott válaszban (Hube és mtsai., 2000). A lipázok szerepet játszanak különböző mono-, di- és trigliceridek bontásában valamint elősegítik a gombasejtek adhézióját (Stehr és mtsai., 2000). A károsításban részt vesz a *C. albicans* sejtfa is, amely két részre osztható. A fal belső része β -1,3 glükánt és β -1,6 glükánt, valamint kitint tartalmaz, a külső főleg mannánt, adhezineket és invazinokat, amelyek a sejtadhézióban játszanak kulcsszerepet (Gow és mtsai., 2011).

Végezetül szeretnék kitérni a *C. albicans* biofilm képződésére. A gombák biofilm képzése kulcsfontosságú, ami lehetővé teszi a gomba megtapadását és proliferációját orvosi eszközökön (katéterek, pacemakerek) csakúgy, mint a gazdaszervezet szövetein. Emellett segít a gombaölő szerekkel szembeni rezisztencia kialakulásában. A biofilm maga egy vékony mátrix réteg, amelynek β -1,3 glükán és egyéb alkotói képesek megkötni az antifungális szereket (Nett és mtsai., 2007; VEDIYAPPAN és mtsai., 2010). Szintén kimutatták, hogy a biofilm metabolikusan inaktív sejtjei rezisztensek számos gombaölő szerrel szemben (Mathé és Van Dijck, 2013; Nobile és Johnson, 2015). A biofilm egy komplex háromdimenziós szerkezet, amelyet csak élesztő vagy élesztő és hifa formák együttes csoportosulása alkot. Ezt a sejtcsoportosulást egy extracelluláris mátrix (ECM) veszi körbe, amely pajzsként védi az alatta levő mikrobákat (Al-Fattani és mtsai., 2006).

A biofilm képzés folyamata 4 jól elkülöníthető lépésre osztható: (i) adhézió, (ii) iniciáció, (iii) érés és (iv) terjeszkedés (3. ábra). Ez a folyamat normál esetben 24-48 órába telik (Tsui és mtsai., 2016).



3. ábra A *C. albicans* biofilm képzése (Lohse és mtsai., 2018)

a. A biofilm képzésének négy fő lépése van. Az első lépés az adhézió, amelyben csak élesztősejtek vesznek részt. Ilyenkor az élesztő sejtek kitapadnak a szilárd felszínhez és biztosítják a biofilm képződés folyamatát. Az iniciációnak nevezett folyamat során az élesztősejtek elkezdnek osztódni, de az újabb élesztő sejtek is a bazális réteghez kitapadva maradnak. Ezután pszeudohifa, majd valódi hifa sejtek jelennek meg. Az érés során létrejön az extracelluláris mátrix. Végül a biofilm élesztő sejteket bocsát ki, hogy ezáltal új biofilm képző ciklusok kezdődhessenek. Egy érett biofilmréteg vastagsága akár több száz mikrométert is elérhet.

b. A *C. albicans* érett biofilmjének oldal-irányú mikroszkópos képe konfokális lézer-pásztázó mikroszkóppal. A festék, amivel láthatóvá tették a biofilmet, egy concanavalin A-Alexa Fluor 594 konjugátum, ami nem volt képes behatolni a biofilm aljára, így a bazális rétegben található élesztő sejtek alig láthatóak. Emellett az ECM se látható, mivel a festék ehhez nem kötődött, viszont a hifák szépen festődtek és pirosan fluoreszkáltak.

Az adhézió során az élesztő sejtek megtapadnak az adott felszínen és egy alap (bazális) réteget hoznak létre. A sejtek tapadhatnak élő és élettelen felülethez és más *C. albicans* sejtekhez is. Ezt követően az élesztő sejtek proliferálódnak, valamint egy részük megnyúlik és hifává fejlődik, amit filamentózus növekedésnek hívunk. Ez az iniciáció lépése, amikor a sejtek morfológiai változásokon mennek keresztül, valamint elárasztják a rendelkezésre álló műanyag felületet (katéterek) vagy a nyálkahártya felszínét. Ebben a lépésben a gomba különböző enzimeket szekretál, mint pl. az aszpartil proteinázok (Sap-ok), amelyek segítik a gombát a szöveti invázióban (Tsui és mtsai., 2016). Az érés során a hifa képződése és az

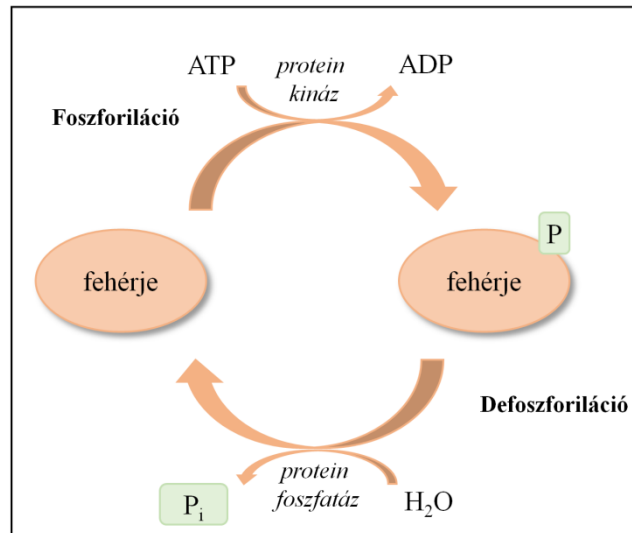
ECM szekréció a kulcsszerep. Az ECM fehérjéket, szénhidrátokat, nukleinsavakat és lipideket is tartalmaz. A biofilm ECM 3 fő poliszacharidból áll: mannán, β -1,3 glükán és β -1,6 glükán. Ezek közül a legfontosabb a β -1,3 glükán az antifungális szerekkel szembeni rezisztencia kialakításában. A hifa formák egy scaffold-ot (állványszerűséget) hoznak létre, ami a biofilm stabilitását növeli. Fontos megjegyezni, hogy a biofilmen belül a sejtek képesek egymással kommunikálni quorum érzékeléssel (Chong és mtsai., 2018). Quorum érzékelés alatt azt értjük, hogy a sejtek nem csak a környezetükben, hanem a saját maguk által termelt jelmolekulákat is képesek érzékelni (autokrin szabályozás), amely által a génexpresszió megváltozik. Ilyen molekula például a farnezol, ami szabályozhatja a biofilm képzést (Polke és mtsai., 2018). Végül a biofilm terjedése során az érett biofilmből élesztő sejtek bocsátódnak ki, melyek szétszóródva újabb biofilm ciklusokat indíthatnak el. Uppuluri és mtsai. (2010) kimutatták, hogy ezek az érett biofilm által kibocsátott sejtek főleg élesztő formák, amelyek megnövekedett adhéziós és biofilm képző képességgel rendelkeznek, valamint erőteljesebb rezisztenciát mutatnak az azolok iránt. Továbbá fertőzőképességük is magasabb planktonikus társaikkal szemben.

A biofilm képzés számos transzkripciós faktor által szabályozott folyamat. Több transzkripciós faktort tartanak számon, amelyek kulcsszereppel bírnak a biofilm képződése során: Efg1, Bcr1 (Biofilm and Cell wall Regulator TF), Ndt80 (meiózis specifikus TF), Tec1 (TEA/ATTS TF) és Rob1 (Zn(II)2Cys6 TF) (Nobile és mtsai., 2012; Fox és mtsai., 2012). Az Efg1 és a Tec1 a sejtek morfológiai átalakulását szabályozzák, míg a Ndt80 a biofilm képzésben vesz részt. A Brg1 és a Rob1 TF-okat csak a *C. albicans*-ban és a hozzá nagyon közel álló fajokban azonosították: mindkettő a biofilm érésében vesz részt (Nobile és mtsai., 2012). Később Fox és munkatársai további 3 szabályozó elemet azonosítottak, amelyek szintén a biofilm érését szabályozzák: Rfx2, Flo8 és Gal4. Ezek közül a Gal4 (Zn(II)2Cys6 TF) és Rfx2 (transzkripciós represszor) negatív regulátorai a biofilm képzésének (Fox és mtsai., 2015). Az adhézió folyamatában 29 olyan TF-t azonosítottak, amely részt vesz a *C. albicans* szilikon felülethez való tapadásában (Finkel és mtsai., 2012). Számos target gén ismeretes, amelyet ezek a TF-k szabályoznak, mint pl. az *ALS1* (sejtfelszíni adhezin), a *TPO4* (gomba specifikus lehetséges spermidin transzporter) vagy a *CAN2* (aminosav permeáz). Az *ALS1* gén promoteréhez a Bcr1, Tec1, Efg1, Ndt80, és Brg1; a *TPO4* promoteréhez a Tec1 és Ndt80 TF-ok kötődnek, míg a *CAN2* gén expresszióját az Efg1 szabályozza. Ezen kívül még számos gén és transzkripciós faktor játszik szerepet a biofilm képzésben, amit nem részleteznék tovább (Nobile és mtsai., 2012).

A *C. albicans* invazív elszaporodását a szervezetben a gazdaszervezet és a patogén asszociált faktorok közötti eltolódással magyarázzák (Gow és Hube, 2012). Úgy tartják, hogy az élesztő sejtek elszaporodása a nyálkahártya felszínén nem képes erős gyulladásos folyamatot beindítani, de a hifák behatolása a sejtekbe, szövetekbe már indukálja a gyulladásos folyamatokat, mint pl. a neutrofilek toborzását a gyulladásos területre. Ezen folyamatokat a sejtfal fehérjekomponensei indíthatják be, és a szénhidrátkomponensek egy úgynevezett PAMP mintázatot (patogén asszociált molekuláris mintázat) alkotnak, amely kulcsszereppel bír az immunválasz beindításában és a gyulladásos folyamatok kialakításában. Úgy tartják, hogy a sejtfal poliszacharid komponenseinek mindegyike részt vesz a *C. albicans* immunológiai megbélyegzésében (Netea és mtsai., 2008). Ezeket a PAMP mintázatokat a PRR receptorok (mintázat felismerő receptor) közül a TLR (Toll like receptor) receptorokkal, valamint a CLR (C-típusú lektin receptor) receptorokkal (mannóz, dektin-1 és -2) rendelkező sejtek képesek felismerni, mint pl. a neutrofilek és a makrofágok (Netea és mtsai., 2015). Emellett NOD-szerű és RIG-I-szerű receptorok is részt vesznek az antifungális immunválaszban (Netea és mtsai., 2015). A *C. albicans* elleni védekezésben nem csak a veleszületett immunitás sejtjei (makrofágok, neutrofil limfociták), de az adaptív immunválaszban szerepet játszó T- és B-limfociták is részt vesznek (Netea és mtsai., 2015). Munkám során arra kerestem választ, hogy a foszfofehérjék defoszforilációját katalizáló foszfatázok egyik gomba specifikus formája milyen szerepet játszhat a fenti folyamatokban.

3.2 Protein foszforiláció és defoszforiláció

A protein foszforiláció egy gyakori poszttranszlációs módosítás, amelyet protein kinázok katalizálnak. A fehérjék foszforilációja elsősorban a tirozin (Tyr), szerin (Ser) és treonin (Thr) oldaláncon történik, de hisztidin (His), lizin (Lys) és arginin (Arg) odalláncon is történhet foszforiláció (Brautigan, 2012). A foszfoproteinek számát 13 000-re becsülik az emberben, míg élesztőben 3000-re tehető ez a szám (Vlastaridis és mtsai., 2017). Ehhez képest sokkal nagyobb a becsült foszforilációs helyek száma: emberben 230 000, míg élesztőben 40 000 (Vlastaridis és mtsai., 2017). Egy proteomikai analízis során 2244 humán fehérjében 6600 foszforilációs helyet vizsgáltak és kimutatták, hogy a foszforilált Ser, Thr és Tyr oldalláncok százalékos eloszlása 86,4 %, 11,8 % és 1,8 % (Olsen, 2006). Ebből azt a következtetést vonták le, hogy a Ser a kinázok leggyakoribb célpontja. A kinázok által katalizált foszforiláció során az ATP gamma-foszfát csoportja helyeződik át a fent említett aminosav oldalláncok egyikére. A defoszforilációnak nevezett folyamatban ezt a foszfátészter kötést bontják fel a foszfatázok (4. ábra).



4. ábra Protein foszforiláció és defoszforiláció

A fehérje foszforilációt a protein kinázok, míg a defoszforilációt a protein foszfatázok katalizálják. A reakció reverzibilis. A folyamat során az ATP gamma-foszfát csoportja (P) áthelyeződik a target fehérje Ser, Thr vagy Tyr aminosav oldalláncára úgy, hogy foszfátészter kötést hoz létre a hidroxilcsoporttal. A foszfatáz ezt a kötést víz hozzáadásával inorganikus foszfát (P_i) felszabadítás közben hidrolitikusan bontja.

A fehérjék térszerkezetének, működésének foszforilációval és defoszforilációval történő befolyásolása az egyik fő szabályozó mechanizmus az eukarióta sejtekben (Shi, 2009). A kinázok és a foszfatázok által katalizált folyamatok lehetnek aktiváló vagy inaktiváló jellegűek a jelátviteli folyamatokban, befolyásolhatják receptorok, intracelluláris jelátviteli molekulák vagy effektor fehérjék működését (Hardie, 1990).

A kinázok működése biokémiai szempontból egyszerű, hiszen mind azonos szerkezettel rendelkezik, és azonos módon katalizálja a foszfátészter kötés kialakítását. Ennek evolúciós magyarázata van, ui. a kinázok egy közös ősből származnak, míg a foszfatázok több szupercsaládot alkotnak (Manning és mtsai., 2002, Moorhead és mtsai., 2009). A foszfatázok konvergens evolúció során alakultak ki, ezért számos képviselőjük van, melyeket szubsztrátspecifitásuk, katalikus alegységük elsődleges szerkezete és az általuk katalizált reakció mechanizmusa alapján több csoportba sorolunk. A foszfatázok által alkotott diverz csoportot összességében foszfatómnak hívjuk. A humán foszfatóm a SCOP adatbázis alapján összesen 264 foszfatázt foglal magába, amely a teljes proteom 1,17 %-át teszi ki (Chen és mtsai., 2017). Ezzel szemben a humán kinóm közel 518 protein kinázt tartalmaz, ami a humán proteom 2,2 %-a (Manning és mtsai., 2002; Heath és mtsai., 2003). Ezek a számok igazolják a fehérje foszforiláció és defoszforiláció jelentőségét. A továbbiakban a foszfatázokat mutatom be részletesebben.

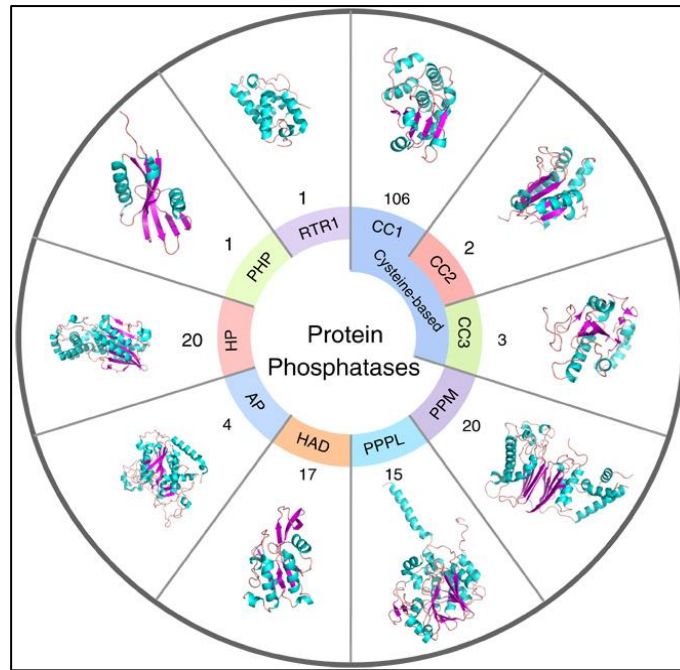
3.3 A protein foszfatázok

3.3.1 A foszfatázokról általánosságban

A protein foszfatázok hidrolízissel távolítják el a foszfát csoportot a fehérjék oldalláncairól. Számos katalitikus alegységük ismert, amelyek különféle szabályozó alegységekkel összekapcsolódva sokféle holoenzimet tudnak létrehozni (Shi, 2009).

Ha enzimológiai szempontból közelítjük meg a kérdést, akkor a Ser/Thr specifikus protein foszfatázokat két nagy csoportra oszthatjuk: 1-es típusú foszfatázok és 2-es típusú foszfatázok (Ingebritsen és Cohen, 1983). Az 1-es típusú foszfatázok inhibítor-1 fehérjével gátolhatóak, míg a 2-es típusú foszfatázok nem. Az 1-es típus fő képviselője a protein foszfatáz 1 (PP1). A 2-es típusba tartozik a fémiontól független protein foszfatáz 2A (PP2A), a kalcium ionnal aktiválható protein foszfatáz 2B (PP2B), vagy más néven a kalcineurin, valamint az aktivitásához magnézium- vagy mangániont igénylő protein foszfatáz 2C (PP2C). Ez a nevezéktan a klasszikus biokémiai módszerekkel izolálható foszfatázok csoportosítását tette lehetővé. A katalitikus alegységük szerkezete alapján, a mai ismereteink szerint a PP1, PP2A és PP2B a foszfoprotein foszfatázok (PPP) családba, míg a PP2C a fémionfüggő protein foszfatázok (PPM) családba tartozik. Ez a csoportosítás nem vette figyelembe a PPP csoport több tagját (PP4, PP5, PP6, PP7), amelyeket csak a molekuláris klónozás módszerével tudtak kimutatni. Ugyancsak kimaradtak az osztályozásból a *Homo sapiensben* nem található különleges foszfatázok, amelyeket betűjelzéssel láttak el (pl. PPY, PPZ stb.). Ezeket a biokémiai módszerekkel nehezen izolálható klónozott foszfatázokat új típusú foszfatázoknak nevezték el (Cohen, 1997).

Az idők folyamán újabb és újabb foszfatáz családokat fedeztek fel és időszerűvé vált az osztályozás újragondolása. 2017-ben Chen és munkatársai bevezettek egy új módszert, ami a katalitikus alegységek háromdimenziós szerkezetén alapul. A 264 ismert humán foszfatáz között 189 olyat találtak, amelyek enzimaktivitását kísérletesen is igazolták. Ezeket háromdimenziós szerkezetük, vagyis a fehérje feltekeredése alapján 10 nagy csoportra (fold) osztottak (Chen és mtsai., 2017). Ez a rendszer jól szemlélteti a foszfatázok evolúciós diverzitását, és szélesebb látókörben foglalja össze a jól ismert és az eddig még alig kutatott foszfatázokat (5. ábra).



5. ábra A humán protein foszfatázok csoportosítása 3D szerkezetük szerint (Chen és mtsai., 2017)

A protein foszfatázokat 10 csoportba osztották harmadlagos szerkezetük alapján. Az adott csoportok képviselőinek feltekeredését a szerkezeti képek mutatják egy-egy példán keresztül. A CC családok egy közös katalitikus mechanizmuson osztoznak. A képek melletti szám az adott csoportban található humán foszfatázok számát jelzi.

Az egyes foldok rövidítése a következő: **CC1-3:** Cisztein-alapú foszfatáz 1-3; **PPM:** fémion függő protein foszfatáz; **PPPL:** foszfoprotein foszfatáz-szerű; **HAD:** halogénsav-dehidrogenáz-szerű foszfatáz; **AP:** alkalikus foszfatáz; **HP:** hisztidin foszfatáz; **PHP:** protein hisztidin foszfatáz; **RTR1:** transzkripció regulátor 1 foszfatáz

A három hasonló nevű fold: CC1, CC2 és CC3 tagjai azonos CX₅R katalitikus motívummal, de eltérő térszerkezettel rendelkeznek, ami konvergens evolúcióra utal (Alonso és mtsai., 2004). Katalitikus mechanizmusuk során az aktív Cys oldallánc foszforilált átmeneti terméket alkot (Pannifer és mtsai., 1998). A CC1 fold filogenetikai vizsgálata kimutatta, hogy a humán protein foszfatázok több mint fele ebbe a csoportba tartozik. Ide sorolhatók a protein tirozin foszfatázok (PTP), a széles specifitású foszfatázok (DSP) valamint a PTEN (Phosphatase and tensin homolog: foszfatidil-inozitol-3,4,5-triszfoszfát-3-foszfatáz), myotubularin és egyéb lipid foszfatázok is. A CC2 család a kis molekulású foszfatázokat, valamint az SSU2-t (RNA Polymerase II CTD Phosphatase) foglalja magába. A CC3 a sejtosztódás egyik fontos regulátorát, a CDC25 (Cell division cycle 25) foszfatázt tartalmazza. A fémion-függő foszfatázok (PPM), valamint a foszfoprotein foszfatázok (PPPL) olyan Ser/Thr specifikus foszfatázok, amelyek katalitikus reakciójához két fémion által aktivált vízmolekulára van szükség. Chen és mtsai., (2017) kiterjesztették a PPPL családhoz tartozó enzimek körét: a klasszikus PPP-k mellett ide sorolták a prosztatikus savi foszfatázok (PAP) néhány

képviselőjét is. A különböző szerkezet ellenére azonos katalitikus mechanizmust követő PPM és PPPL foszfatázok a konvergens evolúció egy másik szép példáját mutatják. A további Ser/Thr foszfatáz családtagok speciális mechanizmussal rendelkeznek. A HAD foszfatázokban a DxDxT szekvencia-motívum aszpartátjai felelősek az enzim aktivitásért (Brautigan, 2012), és valószínűleg egy magnéziumion vesz részt a katalízisben (Shi, 2009). A hisztidin foszfatáz (HP) család tagjaiban a katalízist egy aktív His oldallánc végzi. Az alkalikus foszfatáz (AP) család tagjainak katalitikus centrumában két cink-, egy magnéziumion és egy aktív Ser található, a reakció során foszfo-Ser köztitermék jön létre. Végül a transzkripció regulátor 1 foszfatáz (RTR1) család tagjait csak nemrég ismerték fel, újszerű katalitikus mechanizmusuk részletei még nem ismertek. A protein hisztidin foszfatáz (PHP) fold azért különleges, mert foszfo-His oldalláncok defoszforilálásáért felelős. A katalízis során a szubsztrát 4 hidrogénkötéssel kapcsolódik a His-foszfatázhoz. A His-53 aktiválja a vízmolekulát, amely nukleofilként működik a foszfát szubsztrát támadása során, míg a Lys-21 segít az átmeneti állapot stabilizálásában (Gong és mtsai., 2009, Attwood és mtsai., 2010).

3.3.2 A gomba PPPL foszfatázok

Mivel kutatásaink során a gombákkal, azon belül is a *C. albicans*-al foglalkoztunk, szeretnénk részletesebben kitérni a gombákban megtalálható foszfatázokra, kiemelve a PPPL családot. A gombák világában a foszfatóm lecsökken, pl. a *S. cerevisiae* modellszervezetben csupán 75 foszfatáz található (Chen és mtsai., 2017). Ez magyarázható a teljes proteom csökkenésével, hiszen az élesztő proteom a humán proteom 1/4-e, és ha megnézzük a foszfatázok számbeli változását, szintén ezt az arányt kapjuk. Ezzel szemben mi 77 protein foszfatázt azonosítottunk a *S. cerevisiae*-ben, ui. adatbázis kutatással megtaláltuk a Sia1 PAP foszfatázt és az Ldh1 foszfatáz domént tartalmazó lipázt. A Sia1 foszfatáz nagyon hasonlít a Dcr2-re, ezért valószínűsíthető, hogy génduplikációval jött létre. Az Ldh1 inaktív foszfatáz doménje regulátor szereppel bír, valószínűleg ezért nem vették figyelembe.

A PPP családot vizsgálva a *S. cerevisiae* modell szervezetben, 12 foszfatázt azonosítottak (Ariño és mtsai., 2019). A PPP családban van az 1-es típusú PP1 (Glc7), valamint a 2-es típusú PP2A (Pph21, Pph22) és a PP2B (Cna1, Cna2) foszfatáz enzimek. Ezeket összefoglaló néven kanonikus foszfatázoknak hívják (Ariño és mtsai., 2019). Korábban ezt nevezték klasszikus csoportnak (Ingebritsen és Cohen, 1983). Emellett az élesztő tartalmaz PP1-szerű (Ppz1, Ppz2 és Ppq1), és PP2A-szerű (Ppg1, PP4/Pph3, PP6/Sit4 és PP5/Ppt1) fehérjéket,

amiket nem kanonikus foszfatázoknak hívnak. Korábban ezeket nevezték új típusúaknak (Cohen, 1997). Ariño és mtsai. (2019) azonban nem vették figyelembe a prosztatikus savi foszfatázokat ebben a csoportban. Emellett Offley és Schmidt 2019-ben szintén vizsgálták a *S. cerevisiae* PPP családot és ők 13 tagot írtak le, mivel ők sem vették számításba a PAP csoport tagjait. Mi Chen és munkatársai (2017) gondolatmenetét követtük és ez alapján azonosítottuk a *C. albicans*-ban található PPPL foszfatázokat (6. ábra).

A *C. albicans*-ra irányuló evolúciós vizsgálataink során összesen 77 protein foszfatázt találtunk az opportunistá patogénben. Ez megegyezik a *S. cerevisiae* foszfatómában levő foszfatázok számával, de a két gombafajban nem azonos a foszfatázok eloszlása a csoportok között (nem közölt adat). A *C. albicans*-ban a számunkra érdekes PPPL fold összesen 12 foszfatázt foglal magába (6. ábra). Ezen foszfatázok mindegyike tartalmazza a foszfatáz domént, ami a katalitikus aktivitásért felelős. Ha megnézzük a *Candida* fajok filogenetikai fáját, a Sia1 és Dcr2 PAP prosztatikus savi foszfatázok külön ágon helyezkednek el. A Dcr2 *S. cerevisiae* ortológjáról ismert, hogy protein foszfatáz aktivitással rendelkezik (Pathak és mtsai., 2007), tehát beillesztése a PPPL családfába kísérleti eredményekkel támasztható alá. A *SIA1* gén a *DCR2* duplikációjával keletkezett és csak gombákban található meg. A Ppn2 külön ágat alkot és nem sorolható egyik korábban ismertetett alcsaládba sem. Katalitikus alegysége csak 18 %-os hasonlóságot mutat a Glc7 katalitikus alegységgel (Offley és Schmidt, 2019). Tudjuk, hogy a Ppn2 egy PPPL domén tartalmú cinkfüggő polifoszfatáz, de protein foszfatáz aktivitását eddig nem bizonyították (Gerasimatié és Mayer, 2017).

közel áll a Ppz1 és Sal6 új típusú foszfatáz, ezért őket PP1-szerű alcsaládtagokként tartják számon (6. ábra). A PP2 képviselője a *C. albicans*-ban a Pph21, a PP3-é a Cmp1, a PP4 alcsaládé a Pph3, míg a PP5 alcsaládé a Ppt1. Az új típusú Ppg1 a PP2 alcsaládhoz áll közel (Offley és Schmidt, 2019).

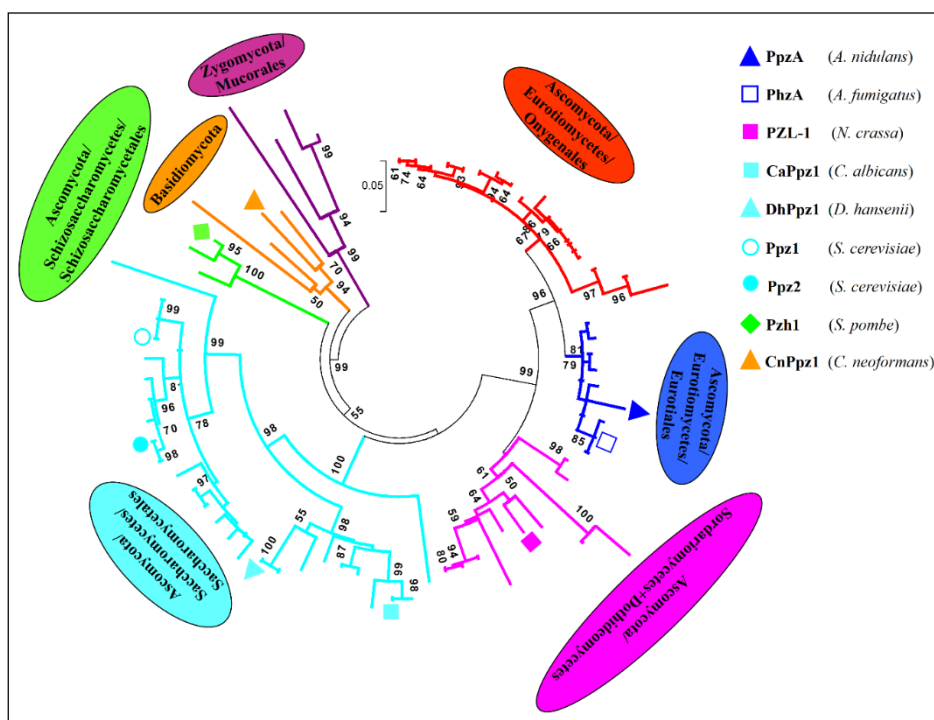
A PPPL csoporton belül négy gomba specifikus foszfatáz található, amit az 6. ábrán késsel jelöltünk. Ezek vizsgálata azért is előnyös, mert segítségével jobban megérthetjük a gombákra specifikus folyamatokat (pl. fertőzőképesség, hifanövekedés, szaporodás). A PAP családba tartozó Sial-et korábban ismertettem. A Ppg1-ről kimutatták, hogy szükséges a *C. albicans* virulenciájának kialakításában (Noble és mtsai., 2010). Ezt támasztotta alá egy későbbi kutatás, ahol egér modellben bizonyították a Ppg1 szerepét a filament növekedésben, valamint az invázió folyamatában (Albataineh és mtsai., 2014). A Ppq1/Sal6 foszfatázról még nem sok adat áll rendelkezésre. Lehetséges, hogy szerepet játszik a transzláció szabályozásában (Ariño, 2002), de még ismeretlen hogyan, ui. kimutatták, hogy a Sal6 nem defoszforilálja az eRF1-t (eucaryotic release factor) (Kallmeyer és mtsai., 2006). Nemrégiben publikálták szerepét a fémion háztartásban (Schulz és mtsai., 2014) és *S. cerevisiae*-ben leírták negatív szabályozó szerepét a párosodás folyamatában (Shim és Park, 2014), azonban ennek *C. albicans*-ban nincs biológiai jelentősége. A Sit4 szerepét bizonyították a sejtciklusban, ui. ez felel a G₁/S átmenet megfelelő lefolyásáért (Sutton és mtsai., 1991; Mann és mtsai., 1993). Számos fehérjével hat kölcsön, például a SAP-okkal (Sit4-asszociált fehérjék), amelyekről nem tisztázott, hogy hogyan hatnak a Sit4-re (Ariño, 2002). Kimutatták szerepét a sejtnövekedésben és tápanyag érzékelésben is a Tap42-hez való kötődésén keresztül (Jian és Broach, 1999, Beck és mtsai., 1999). Fontos megjegyezni, hogy a Sit4 és a Ppz1 ellentétes szerepet tölt be a sejtciklus szabályozásában. Disszertációmban az ScPpz1 és ScPpz2 foszfatázok *C. albicans*-ban megtalálható egyetlen ortológjával foglalkozom, ezért a Ppz foszfatázokat részletesebben ismertetem.

3.4 A gomba specifikus protein foszfatáz Z

A protein foszfatáz Z (Ppz) egy gomba specifikus új típusú Ser/Thr protein foszfatáz. A foszfoprotein foszfatázokon belül PP1-szerű foszfatázként tartják számon (Ariño és mtsai., 2019). Számos lényeges funkcióval rendelkezik, amit több gombafajban is leírtak. A következő fejezetben szeretnék kitérni a különböző fajokban azonosított Ppz foszfatázokra, azok jelentőségére, kiemelve a *C. albicans*-ban található CaPpz1-ra irányuló eredményeket.

3.4.1 A Ppz foszfatáz evolúciója

A protein foszfatáz Z (Ppz) egy újszerű tagja a Ser/Thr specifikus protein foszfatázoknak. Elsőként *S. cerevisiae*-ben azonosították cDNS szinten az *ScPPZ1* és *ScPPZ2* mRNS-ket (Da Cruz e Silva és mtsai., 1991). Ezt követően jellemezték az *ScPPZ1* gén termékét molekuláris klónozással (Posas és mtsai., 1992). Egy évvel később jellemezték az *ScPpz2*-t is (Posas és mtsai., 1993). Filogenetikai analízisünk szerint minden ismert gombafajban megtalálható legalább egy Ppz ortológ (7. ábra, 1. Függelék).



7. ábra A protein foszfatáz Z fehérje filogenetikája a gombák világában

Az ábra az eddig megszekvenált gombafajokban megtalálható Ppz1 foszfatázok aminosav sorrendjének filogenetikai elemzését mutatja. Az azonos rendszertani törzs (phylum)/osztály/rendbe tartozó gombafajokat azonos színnel jelöltük. Az egyes fajokból származó Ppz fehérjéket az adott színnel, de más szimbólummal tüntettük fel. Ezek a következők: *Aspergillus nidulans* PpzA, *Aspergillus fumigatus* PhzA (Leiter és mtsai., 2012), *Neurospora crassa* Pzl1 (Szöör és mtsai., 1998), *C. albicans* CaPpz1 (Kovács és mtsai., 2010), *Debaryomyces hansenii* DhPpz1 (Minhas és mtsai., 2012), *Saccharomyces cerevisiae* ScPpz1 és ScPpz2 (Posas és mtsai., 1992; Posas és mtsai., 1993), *Schizosaccharomyces pombe* Pzh (Balcells és mtsai., 1997) és *Cryptococcus neoformans* CnPPz1 (Zhang és mtsai., 2019).

A filogenetikai analízist Dr. Miskei Márton készítette.

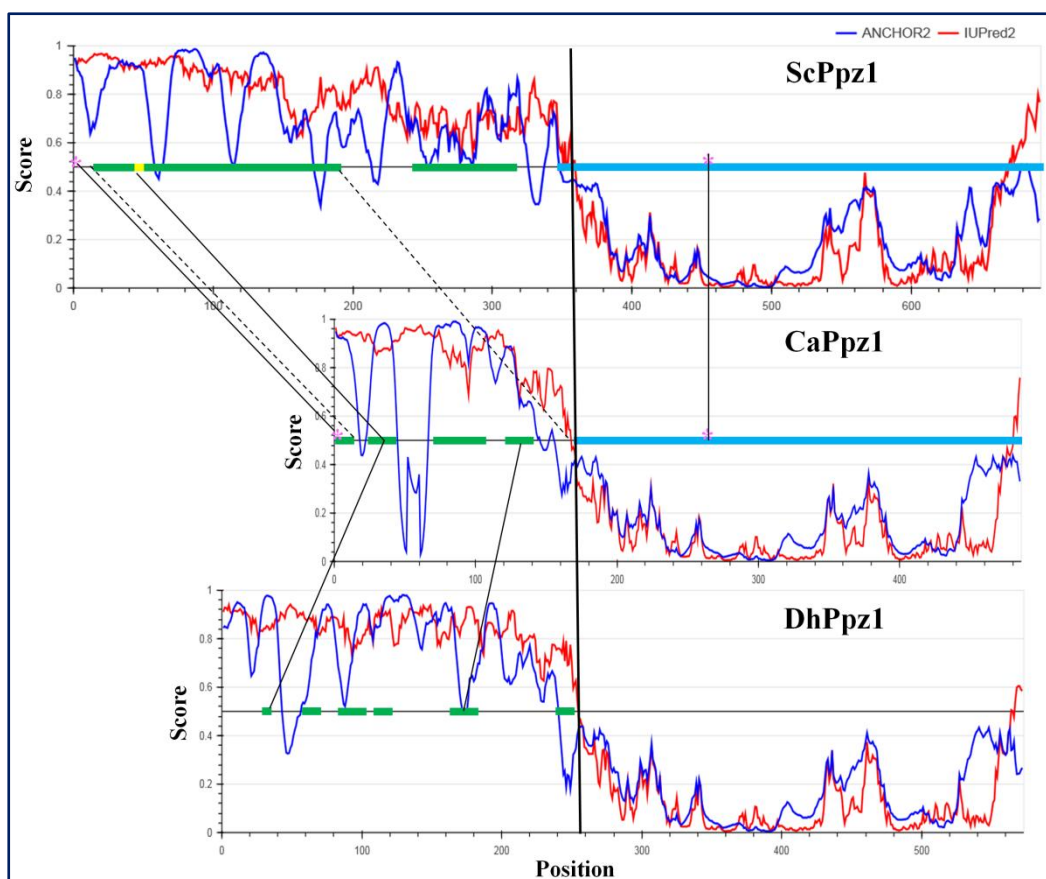
Az ábrán a 2018-ban ismert összes Ppz foszfatáz aminosav sorrendje alapján készített családfa látható (7. ábra, 1. Függelék). E szerint a foszfatáz minden vizsgált gombafajban megtalálható. Az ábrán az Ascomycota rendszertani törzs dominál, amelynek 5 családját alaposan megvizsgálták, ui. ezek elméleti és gyakorlati szempontból különösen fontosak. A

szimbólumokkal jelölt ágakhoz tartozó fajok Ppz foszfatázait már több publikációban is jellemezték, amelyeket később részletesen is tárgyalok. Ez az ábra azért is fontos, mert az evolúciós viszonyok ismerete szükséges a különböző fajokkal végzett kísérletek összevethetősége szempontjából.

A fenti adatokat úgy frissítettük, hogy néhány fontos gombafajban a legfrissebb (2019. 09.) szekvencia adatok alapján a BLAST program felhasználásával végeztük el a Ppz fehérjék vizsgálatát. A következő fajokat vizsgáltuk: *Rozella allomycis* (Cryptomycota/), *Batrachochytrium dendrobatidis* (Chytridiomycota/Chytridiomycetes), *Syncephalis fuscata* (Zoopagomycota/Zoopagomycetes), *Rhizopus microsporus* (Mucoromycota/Mucoromycetes), *S. pombe* (Ascomycota/Schizosaccharomycetes), *S. cerevisiae* (Ascomycota/Saccharomycetes), *C. albicans* (Ascomycota/Saccharomycetes), *N. crassa* (Ascomycota/Sordariomycetes), *A. nidulans* (Ascomycota/Eurotiomycetes), *Ustilago maydis* (Basidiomycota/Ustilaginomycetes) (zárójelben a rendszertani törzseket (phylum)/osztályt tüntettem fel). Azt találtuk, hogy az általunk vizsgált összes gomba fajban megtalálható a Ppz fehérje. A régebbi és az új adatok alapján azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a Ppz foszfatáz fontos lehet a gombák életében.

3.4.2 A Ppz foszfatázok szerkezete

Az összes ismert Ppz foszfatáz rendelkezik egy nagymértékben konzervált C-terminális (C-ter) katalitikus doménnel és egy sokkal változatossabb, rendezetlen N-terminális (N-ter) szabályozó doménnel (Ariño és mtsai., 2019). Ezt a variabilitást mutatja a 8. ábra, ahol három Ppz1 foszfatáz szekvencia összehasonlítása látható.



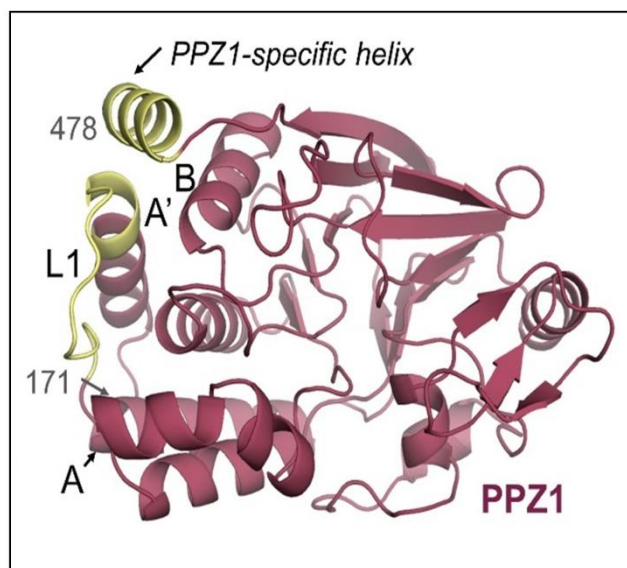
8. ábra A *S. cerevisiae* ScPpz1, *D. hansenii* DhPpz1 és a *C. albicans* CaPpz1 protein szekvencia analízise (Szabó és mtsai., 2019a)

A fehérje szekvenciákat az IUPred2 és ANCHOR2 szoftverrel analizáltuk (<https://iupred2a.elte.hu/>). A kék vonal jelzi az ANCHOR2 szoftver által jóslott lehetséges fehérjekötő régiókat, míg a piros vonal az IUPred2 szoftver segítségével megjósolt rendezetlenséget mutatja. A szekvenciákat a konzervált katalitikus domén alapján igazítottuk egymás alá, a függőleges fekete vonal mutatja az N-ter és C-ter domének határát. A zöld sávok mutatják azokat a deléciókat, amelyeket az ScPpz1 esetében Clotet és mtsai. (1996), a DhPpz1 esetében Minhas és mtsai. (2012) vizsgáltak, míg a CaPpz1 esetében mi deletáltunk *in vitro* mutagenézissel (Szabó és mtsai., 2019). A rózsaszín csillagok egyrészt az N-ter doménben levő mirisztoilációs hely, másrészt a C-ter doménben található, katalitikus aktivitásért felelős hely pontmutációit jelzik, míg a világoskék sávok a kísérletekben expresszált különálló C-ter doméneket jelzik. A sárga régiót Minhas és munkatársai (2012) vizsgálták pontmutációkkal. A kihúzott fekete vonalak a szerkezetileg azonos régiókat kötik össze, míg a szaggatott fekete vonalak az adott *C. albicans* szekvenciának megfelelő részletet jelzi az ScPpz1 szekvenciában.

C. albicans-ban végzett vizsgálatok során azt találtuk, hogy a C-ter domén önmagában sokkal aktívabb, mint a teljes hosszúságú fehérje. A teljes hosszúságú CaPpz1 fehérje is aktív volt, habár nem olyan mértékben, mint a C-ter domén. Ebből arra következtethetünk, hogy az N-ter domén jelenléte gátló hatású. Az találtuk, hogy az N-ter domén önmagában katalitikusan inaktív volt. Továbbá kimutattuk azt, hogy ez a domén szerepet játszik egyéb funkciókban, mint a sótolerancia vagy koffeinerzékenység. Ebből a szempontból az N-ter domén 1-16

aminosavból álló része a legfontosabb, mivel itt található a mirisztoilációs hely, ami a lokalizációért felelős, továbbá ez a régió befolyásolja a katalitikus aktivitást is (Szabó és mtsai., 2019a). Eredményeink jól korrelálnak az ScPpz1-el végzett vizsgálatokkal (Clotet és mtsai., 1996). Viszont a Minhas és munkatársai (2012) által kiemelt rövid szakasz jelentőségét nem tudtuk megerősíteni *C. albicans*-ban, ami valószínűleg a vizsgált fajok közötti jelentős evolúciós távolsággal magyarázható (7. ábra).

Nemrégiben röntgen krisztallográfia segítségével meghatározták a CaPpz1 katalitikus doménjének 3D szerkezetét (9. ábra).



9. ábra A CaPpz1 katalitikus doménjének 3D szerkezete (Chen és mtsai., 2016)

Az ábra a katalitikus domén 3D-s szerkezeti képét demonstrálja 2,61 Å felbontásban. A Ppz1 katalitikus doménjének modellje 308 aminosavat tartalmaz (ui. az utolsó 6 aminosav-maradék az elektronsűrűség diagramon nem volt látható). A Pp1 alegység és a Ppz1 domén között az egyik legfontosabb különbség az N-terminális régióban rejlik, ahol a PPZ1_{cat} A' hélice kiegészül még egy kanyarulattal, és az A' hélixet az A hélixszel (L₁) összekötő csavarulat (loop) a PP1 α -tól eltérő konformációt eredményez. A második jelentős eltérést az PPZ1 specifikus hélix kialakulása eredményezi. Itt arról van szó, hogy a PPZ1 C-terminális oldalláncai nem olyan rendezetlenek, mint a PP1 α -ban, hanem egy új α -hélixet alakítanak ki, ami belesimul a PPZ1 specifikus hélix kötő zsebébe.

A szerkezet alapján elmondható, hogy a *C. albicans* CaPpz1 katalitikus doménje nagyon hasonlít a protein foszfátáz 1 katalitikus alegységéhez (PP1c). A CaPpz1 katalitikus domén és a humán PP1 α katalitikus alegység szekvencia összehasonlítása 66 %-os egyezést mutatott, míg 100 %-os szekvencia egyezés volt abban a 6 oldalláncban, ami a fémionokat koordinálja a katalitikus centrumban. Mindez felveti annak a lehetőségét, hogy a Ppz foszfátázok a PP1 alcsaládból fejlődtek ki úgy, hogy katalitikus alegységük fuzionált egy flexibilis N-terminális regulátor doménnel.

Azonban a CaPpz1 számos egyéni szerkezeti elemmel is rendelkezik, mint a PPZ1-specifikus α -hélix és az L1-kanyarulat (9. ábra). Továbbá számos szabályozó fehérje kötőhelye különbözik az egyedi pontmutációk miatt. Ezek a kisebb szerkezeti változások képesek megakadályozni a PNUTS vagy a Spinophilin regulátor fehérjék kötődését. Chen és munkatársai azt is kimutatták, hogy az inhibítor-2 fehérje - a PP1-típusú foszfatázok általános gátlószere - hatását az N-terminális domén egy eddig részleteiben nem ismert sztérikus hatásnak köszönhetően megszünteti (Chen és mtsai., 2016). Tehát a hozzá kötődő N-terminális domén és a fentebb említett egyedi szerkezeti sajátosságok olyan tulajdonságok, amik lehetővé teszik a Ppz fehérje eltérő szabályozását, ami a klasszikus PP1 foszfatáztól eltérő funkciókat biztosít. Továbbá ezek az eltérések hasznosíthatók lehetnek a Ppz1 specifikus inhibítorok tervezése során.

3.4.3 A Ppz foszfatázok szabályozása

Az ScPpz1 foszfatáznak két szabályozó fehérjéje is ismeretes. A ScHal3 fehérje képes hozzákötődni a ScPpz1 katalitikus doménjéhez és gátolni annak aktivitását (de Nadal és mtsai., 1998). Több bizonyíték is arra mutatott rá, hogy a ScHal3 fehérje túltermeltetése ugyanolyan hatású, mint a ScPpz1 foszfatáz kiütése (Ferrando és mtsai., 1995, Di Como és mtsai., 1995; de Nadal és mtsai., 1998). Abrie és munkatársai 2015-ben kimutatták, hogy az ScPpz1 és az ScHal3 1:1 arányban kötődnek egymáshoz. Az ScHal3 egyik paralógja a Vhs3 protein, funkcióját tekintve hasonló a Hal3-hoz, mivel ugyancsak képes gátolni a ScPpz1 fehérjét (Ruiz és mtsai., 2004). Ismert az ScHal3-nak egy másik paralóg fehérjéje is, az ScCab3, ami azonban kisebb szekvencia hasonlóságot mutat vele és gátolni sem képes a Ppz1 működését (Ruiz és mtsai., 2009). Érdeemes megemlíteni, hogy az ScHal3, az ScVhs3 és az ScCab3 egyaránt részt vesz a CoA bioszintézisben, ugyanis heterotrimert képezve foszforantotenoil-cisztein-dekarboxiláz enzimaktivitással rendelkezik (Ruiz és mtsai., 2009). Ez a fehérjék fő funkciója, azonban a ScHal3 és az ScVhs3 ún. *moonlighting* proteinekként („feketemunkás”) képes kötődni az ScPpz1 fehérje katalitikus alegységéhez, gátolva annak foszfatáz aktivitását.

A *S. pombe*-ban is sikerült azonosítani az ScHal3 ortológját, az SpHal3-t (Molero és mtsai., 2013). Ez a fehérje egy Hal3/TS (timidilált szintáz) fúziós protein. A CoA bioszintézisben SpHal3 homotrimert alkotva látja el esszenciális funkcióját. Szintén bizonyították létfontosságú szerepét TS enzimként a DNS integritás fenntartásában. Azonban a foszfatáz

gátló *moonlighting* funkciót csak akkor észlelték, ha a Ppz1 C-ter domén önmagában volt jelen, vagyis a teljes hosszúságú foszfatázt fiziológias körülmények között nem gátolta.

Érdekes módon a *C. neoformans*-ban két hasonló Hal3-szerű fehérjét is azonosítottak, a CnHal3a-t és CnHal3b-t, de ezek egyike sem volt képes *in vivo* szabályozni vagy *in vitro* gátolni a CnPpz1 foszfatázt (Zhang és mtsai., 2019). A Hal3 fehérje *moonlighting* funkciójának elvesztését magyarázhatjuk a *S. cerevisiae*-től való evolúciós távolsággal is, hiszen mind az *S. pombe*, mind a *C. neoformans* távolabb helyezkedik el a Ppz családfán, mint a *C. albicans* (7. ábra).

Petrényi és munkatársai (2016) *C. albicans*-ban azonosítottak két lehetséges CaPpz1 regulátort. Az egyik az ScHal3 ortológja, amit CaHal3-nak neveztek el. A másik az ScCab3 ortológja, amit CaCab3-nak neveztek. Először tetrad analízissel bizonyították, hogy mindkét fehérje esszenciális szerepet játszik a CoA bioszintézisben. Ezt követően igazolták, hogy *in vitro* mindkét fehérje erősen kötődött a CaPpz1 katalitikus doménhez, valamint a teljes hosszúságú fehérjéhez is. Kimutatták, hogy az N-ter domén jelenléte csökkenti mindkét fehérje kötődési hatékonyságát a C-ter doménhez. *In vitro* foszfatáz aktivitásmérések alapján mindkét fehérje csökkentette C-ter domén, valamint a teljes hosszúságú Ppz1 aktivitását is. *In vitro* mérések szerint tehát mindkét fehérje lehetséges CaPpz1 gátlószernek tekinthető. *In vivo* fenotípusos vizsgálatok során, amikor *schal3* mutáns *S. cerevisiae* sejtekben expresszáltatták a CaCab3 vagy CaHal3 fehérjét, csak a CaCab3 volt képes Li⁺-al és toxikus kationnal szemben toleránssá tenni a sejteket. Tehát *in vivo* körülmények között csak a CaCab3 viselkedik Ppz1 regulátorként.

Mindezen eredményekből arra következtethetünk, hogy a fenti fehérjék CoA bioszintézisben betöltött esszenciális funkciója evolúciósan megőrződött. Ezzel szemben a foszfatáz gátlásban betöltött szerepük nem konzerválódott.

3.4.4 A Ppz foszfatázok funkciói

Először a *S. cerevisiae* protein foszfatáz Z funkcióit jellemezték, amelynek két paralógiát írták le, az ScPpz1-t és ScPpz2-t (Da Silva e Cruz és mtsai., 1991; Posas és mtsai., 1992; Posas és mtsai., 1993). A két izoforma közül a ScPpz1 a domináns, ugyanis míg a ScPPZ1 delécioja markáns fenotípusos változásokat okoz, addig az ScPPZ2 delécioja alig észrevehető (Ariño és mtsai.; 2019). Azonban a ScPPZ2 kiütése a scppz1 deléciós mutánsban erősíti annak fenotípusát. Hughes és munkatársai 1993-ban publikálták, hogy a ScPPZ1 mindkét paralógja szerepet játszik az ozmotikus stabilitás, ezáltal a sejt méret és integritás fenntartásában. Az

scppz1, *scppz2* egyszeres és a *scppz1/scppz2* duplamutáns egyaránt életképes volt, de a növekedés késői log fázisában valamint a stacionárius fázisában megnövekedett a sejtek mérete, amit az ozmotikus stabilitást biztosító 1 M szorbitol oldat hozzáadása részlegesen helyre tudott hozni. A sejtméret növekedés a dupla mutáns esetében súlyosabb volt, ezért feltételezhető, hogy a két gén egymás hatását erősíti. Koffein jelenlétében az *scppz1* és a *scppz1/ppz2* mutánsok lítikus fenotípust mutattak, míg ez nem volt olyan látványos a *scppz2* törzs esetében. *S. cerevisiae*-ben a *scppz1* és *scppz1/scppz2* élesztő mutánsok toleránsak voltak Li^+ és Na^+ ionokkal, szemben a vad típusú törzsszel, ami nem volt képes Li^+ és Na^+ jelenlétében növekedni. A toleranciát részben az *ENA1* gén megnövekedett expressziójával magyarázzák, ugyanis *ena1* mutáns törzsben a *scppz1* és *scppz1/scppz2* deléció nem volt képes növelni a kation toleranciát. Ez a gén a fő Na^+ -transzportert kódolja, amin keresztül a Ppz1 hiánya fokozott kation kiáramlást okoz (Posas és mtsai., 1995). Szintén toleránsak voltak a sejtek a megnövekedett K^+ koncentrációval szemben, aminek hátterében a *TRK1* és *TRK2* gén által kódolt K^+ pumpák szabályozása áll (Yenush és mtsai., 2002). A megváltozott K^+ transzport által létrehozott csökkent membránpotenciálhoz kötik a foszfatáz deléciós törzsek megnövekedett érzékenységét olyan toxikus kationokkal szemben, mint a higromicin B és a spermin (Yenush és mtsai., 2002). Végül Yenush és munkatársai (2002) bizonyították a ScPpz1 szerepét a sejtfal bioszintézisben is. Megfigyelték, hogy a foszfatáz hiányos törzs érzékeny volt sejtfalkárosító szerekkel szemben, mint a koffein vagy a Kalkofluor fehér. Feltételezik, hogy a *ScPPZ1,2* gének termékeinek hiánya fokozza a K^+ beáramlást a sejtekbe, ami megváltoztatja a membránpotenciált, ezáltal ozmotikus instabilitást eredményezve. Ezt a sejtek a megnövekedett Na^+ és H^+ ion kiáramlással próbálják kompenzálni, ami az intracelluláris környezet alkalizációját okozva megváltoztatja a pH-függő génexpressziót. Lee és munkatársai (1993) kimutatták, hogy genetikai interakció van a *ScPPZ1,2* és a PKC által regulált SLT2/MPK1 mitogén aktivált protein kináz között, ami a sejtfal integritásért (CWI) felelős útvonalat szabályozza (Levin, 2005). Az *slt2* deléciós mutáns lítikus fenotípust mutatott és ezt a fenotípust tovább súlyosbította a *ppz1/2* deléció (Lee és mtsai., 1993), míg az ScPpz1 túltermeltetése az *slt2* mutáns törzsben csökkentette ezt a lítikus fenotípust (de Nadal és mtsai., 1998). Az Slt2 túltermelése a *scppz1* hiányos törzsben pedig megnövelte az Slt2 foszforilációs szintjét. Igazolták, hogy a *scppz1* hiányos törzsben megemelkedett a K^+ steady-state szintje, és ezért a gomba érzékeny volt a megnövekedett KCl koncentrációkra. Mivel a K^+ a fő meghatározója a turgor nyomásnak, megállapították, hogy a *ScPPZ1,2* és az *MPK1* közötti kapcsolat a *ppz1* hiányos törzsekben megemelkedett belső turgornyomásnak és az *mpk1* hiányos törzsekben megfigyelt sejtfal instabilitásnak a következménye. (Merchan és

mtsai., 2004). Ennek az lehet a magyarázata, hogy a sejtek mérete korlátozott, tehát amikor magasabbá válik az intracelluláris K^+ koncentráció, aktiválódik a Mpk1 útvonal a sejtfal megerősítése és a sejtek lízisének megelőzése céljából.

Ezeket a funkciókat megvizsgálták más gombafajokban is és hasonló eredményeket kaptak. *S. pombe*-ban található SpPzh1-ről bizonyították a sóháztartásban betöltött szerepét, de ezt a H^+ -ATPáz és Trk1 pumpán keresztül történő transzport szabályozásával magyarázták (Balcells és mtsai., 1997; Balcells és mtsai., 1998; Balcells és mtsai., 1999). A fenotípusok mögött álló mechanizmusok változatosságát az evolúciós távolsággal lehet magyarázni (7. ábra). A SpPzh1 deléciós mutáns törzs nem mutatott érzékenységet koffeinnel szemben és az SpPzh1 overexpressziója *ppz1* mutáns törzsekben képes volt komplementálni a hiányzó foszfatázt (Balcells és mtsai., 1999).

A *N. crassa*-ban azonosított NcPzl1 foszfatáz (Szöör és mtsai., 1998) expressziója *scppz1* hiányos *S. cerevisiae* törzsben csökkentette a sejtek Li^+ ion iránti toleranciáját és képes volt menekíteni a foszfatáz hiányos törzset koffein jelenlétében. Hasonlóan az ScPpz1 fehérjéhez, a NcPzl1 overexpressziója is képes volt csökkenteni az *slt2* hiányos törzs lítikus fenotípusát (Vissi és mtsai., 2001).

A só toleráns *D. hansenii*-ben a *DhPPZ1* gén deléciója hasonló fenotípust eredményezett toxikus kationokkal valamint Li^+ ionnal végzett vizsgálatok során, vagyis a foszfatáz hiányos törzs toleráns volt. Ennek hátterében viszont a *DhNHA1* gén által kódolt Na^+/H^+ antiporter megnövekedett expressziója áll (Minhas és mtsai., 2012). Ebből az következik, hogy még az evolúciósan közelebb álló fajok is (*S. cerevisiae*, *D. hansenii*) (7. ábra) más és más mechanizmusokat fejlesztettek ki az adott feladatok ellátására.

Végezetül vizsgálták a PpzA (*A. nidulans*), és a PzhA (*A. fumigatus*) foszfatázok funkcionális szerepét (Leiter és mtsai., 2012). Mindkét fehérje képes volt komplementálni a ScPpz1 foszfatáz hiányát Li^+ és koffein jelenlétében, *scppz1* deléciós mutáns törzsben, tehát visszaállította a sejtek Li^+ érzékenységét és koffein toleranciáját, amit a vad törzs ScPpz1 fehérje jelenlétében mutat. Emellett mindkét fehérje túltermelése menekítette az *slt2* mutáns törzs lítikus fenotípusát. Továbbá a *ppza* deléciós mutáns törzs lassabb növekedést mutatott oxidálószer (tBOOH, diamid) jelenlétében, vagyis Ppz foszfatáznak szerepe van az oxidatív stressz válaszban. A H_2O_2 -vel végzett vizsgálatok során csak kis növekedésbeli különbségek mutatkoztak (Leiter és mtsai., 2012). Ezzel összhangban később igazolták, hogy a patogén *A. fumigatus*-ban a PzhA fehérje részt vesz az oxidatív stressz válaszban (Muszkietta és mtsai., 2014). Leiter és munkatársai (2012) nem csak az ScPpz1 foszfatáznak az oxidatív stressz válaszban betöltött szerepét bizonyították, hanem azt is kimutatták, hogy a *C. albicans*

CaPPZ1 gén deléciója érzékennyé tette a sejteket oxidálószerekkel szemben, tehát ez a funkció gombákban általánosan érvényesül.

A 1. táblázatban szeretném összefoglalni a *ScPpz1* funkcióit és egyben szeretném kiemelni a *CaPpz1* foszfatázzal való hasonlóságait. A *CaPpz1* funkcióit a következő fejezetben ismertetem.

1. táblázat Az *ScPpz1* és *CaPpz1* foszfatáz funkciói null mutánsokkal végzett vizsgálatok alapján

Kondíció/folyamat	<i>scppz1</i> <i>S. cerevisiae</i>	<i>cappz1</i> <i>C. albicans</i>	Funkció(k)
Li⁺	toleráns	toleráns	Ozmotikus stabilitás
Na⁺	toleráns	nincs hatás	Ozmotikus stabilitás
K⁺	toleráns	toleráns	Turgor nyomás
Higromicin B	toleráns	toleráns	Membránpotenciál
Spermin	toleráns	toleráns	Membránpotenciál
Koffein	érzékeny	érzékeny	Sejtfal bioszintézis
Kalkofluor fehér	érzékeny	érzékeny	Sejtfal bioszintézis
Kongóvíörös	érzékeny	érzékeny	Sejtfal bioszintézis
Terc-butil hidroperoxid	érzékeny	érzékeny	Oxidatív stressz
Diamid	érzékeny	érzékeny	Oxidatív stressz
Hifanövekedés iniciációja	-	csökkent	Iniciáció és szabályozás
Sejtadhézió	-	késik	Invázió
Fertőzőképesség	-	csökkent	Patogenitás

3.4.4.1 A *CaPpz1* funkciói

A *C. albicans*-ban egyetlen protein foszfatáz *Z* gént azonosítottak, amit *CaPPZ1*-nek neveztek el (Kovács és mtsai., 2010). A génnek négy allélja van, ami jelentős szekvencia polimorfimust mutat és ezek az allélok funkció szempontjából egyenértékűek.

2008-ban Hanaoka és munkatársai kimutatták, hogy a *CaPPZ1* gén kiütése nem okoz letális fenotípust. A nem esszenciális funkciók kiderítése érdekében 2012-ben munkacsoportunk kiütötte a *CaPPZ1* gén mindkét allélját (Ádám és mtsai., 2012). Vizsgálták a *CaPpz1* szerepét a sóháztartásban és bizonyították a null mutáns Li⁺ toleranciáját, valamint K⁺ toleranciáját;

ezzel igazolták, hogy a CaPpz1 hasonlóan működik, mint a ScPpz1 (Posas és mtsai., 1995; Yenush és mtsai., 2002). Érdekes módon, szemben a *S. cerevisiae*-ban található ScPpz1-el, a *cappz1* mutáns törzs nem mutatott különbséget a vad típusú törzzsel szemben, Na^+ ion jelenlétében. A *cappz1* mutáns sejtek toleránsak voltak Higromicin B-vel és sperminnel szemben, ami a membránpotenciál depolarizációját okozva csökkenti a toxikus ágensek felvételét, ahogy már korábban leírták (Yenush és mtsai., 2002). A CaPpz1-nek szintén szerepe van a sejtfal bioszintézisben, ugyanis a *cappz1* mutáns érzékeny volt sejtfalkárosító szerekkel szemben, mint a koffein, Kalkofluor fehér (CFW) vagy Kongó vörös. Komplementációs kísérletekben bizonyították, hogy a CaPpz1 expressziója *S. cerevisiae* *scppz1* mutáns törzsekben részlegesen normalizálta a sejtek Li^+ toleranciáját, de nem volt képes a sejtek Na^+ ionnal szembeni érzékenységét helyreállítani. A CaPpz1 expressziója menekítette továbbá a *scppz1* mutáns sejteket koffein jelenlétében. Korábban kimutatták, hogy az *slt2* mutáns *S. cerevisiae* törzsek lítikus fenotípust mutattak a sejtfalkárosító ágensekkel szemben és az ScPpz1 overexpressziója gyengítette ezt a fenotípust (de Nadal és mtsai., 1998). A CaPpz1 túlermelése szintén képes volt ezt a lítikus fenotípust menekíteni sejtfalkárosító ágensek jelenlétében (koffein, CFW), vagyis valószínű, hogy a CaPpz1 is kölcsönhatásban van az SLT2/MAP kinázzal. Leiter és munkatársai (2012) kimutatták a CaPpz1 oxidatív stresszben betöltött szerepét, hiszen különböző oxidálószer (pl. *tBOOH*) jelenlétében csökkent a *ppz1* null mutáns törzs növekedése. A *tBOOH* egy lipidoldékony szerves hidroperoxid, amely peroxil, alkoxil és szén-központú szabadgyököket képez (Davies, 1989). Ezek a szabadgyökök a membránlipidek peroxidációját okozzák (Greenly és Davies, 1992), hosszú távú fiziológiás hatásokat kiváltva a gombában (Emri és mtsai., 1997 és 1999). Kimutatták, hogy a *tBOOH* növeli a lipid peroxidációs folyamat által létrehozott lipid-hidroperoxidokat és konjugált diéneket (Fekete és mtsai., 2007).

A *C. albicans* vizsgálata lehetőséget nyújtott a Ppz fehérje olyan funkcióinak feltárására is, amire *S. cerevisiae*-ben nincs lehetőség. Ilyen a hifanövekedésben betöltött szerep vagy a virulencia. A *CaPPZ1* gén deléciója csökkentette a gomba csírázási-képességét (Ádám és mtsai., 2012), valamint csökkentette a hifanövekedést (Nagy és mtsai., 2014). Emellett kimutatták, hogy a *cappz1* deléziós mutáns lassabban tudott kitapadni a tenyésztőedény felületéhez (Nagy és mtsai., 2014). Hanaoka és munkatársai 2008-ban selyemhernyó modellen vizsgálták a törzsek virulenciáját és azt találták, hogy a *cappz1* deficiens törzs virulenciája nem mutatott változást a vad típusú törzséhez képest. Ezzel szemben Noble és munkatársai (2010) azt találták BALB/c egerekkel végzett vizsgálatok során, hogy a *ppz1* null mutáns törzs fertőzőképessége lecsökkent és a morfológiai átalakulás sebessége is lassult, de nem

történt változás a proliferáció folyamatában. Ezzel összhangban szintén a BALB/c egereken történő vizsgálatok szerint a *ppz1* mutáns törzs kevésbé volt virulens a kontroll törzshöz képest (Ádám és mtsai., 2012). Ennek ellenőrzésére munkacsoportunk visszaintegrálta a *CaPPZ1* gén egy-egy kópiáját a kevésbé virulens mutáns fenotípusba, ezáltal heterozigóta törzseket létrehozva. A *CaPPZ1* gén egyetlen kópiája képes volt visszaállítani a gomba fertőzőképességét, amivel bizonyították a CaPpz1 szerepét a patogén gomba virulenciájának kialakításában (Ádám és mtsai., 2012).

Összefoglalva, a CaPpz1-nek szerepe van a kation homeosztázis és membránpotenciál fenntartásában, a sejtfal bioszintézisben, az oxidatív stresszben, a hifanövekedésben, a sejtadhézióban, valamint a fertőzőképességben. Amellett, hogy számos fiziológiai funkciót tölt be a gomba életében, annak alapján, hogy csak gombákban található meg és specifikus szerkezeti tulajdonságainak köszönhetően, elképzelhető, hogy a CaPpz1 egy új antifungális terápia célpontja lehet.

4. Célkitűzések

Fő célunk a gomba specifikus CaPpz1 foszfatáz új funkcióinak feltárása volt normál valamint *tercier*-butil-hidroperoxid (tBOOH) kezeléssel kiváltott oxidatív stressz körülmények között. Ezt globális proteomikai és transzkriptomikai megközelítésben kívántuk vizsgálni. A kísérletekhez rendelkezésünkre állt a *cappz1* foszfatáz hiányos mutáns (KO) törzs valamint a QMY23 kontroll (vad) törzs. Az utóbbi használata azért előnyösebb az eddig használt SN87 szülői törzzsel szemben, mert a *PPZ1* gén jelenlétét leszámítva a genetikai háttere megegyezik a KO törzsével.

Először szeretnénk volna a mutáció hosszú távú hatását, vagyis a gomba adaptációs mechanizmusait megismerni. Ezt fosztoproteomikai és proteomikai vizsgálatokkal kívántuk megvalósítani, amit egy RT-qPCR alapú transzkriptomikai vizsgálattal kívántunk kiegészíteni. Az esetlegesen azonosított, eddig még le nem írt új fiziológiás funkció(k) relevanciáját kísérletesen is szeretnénk volna alátámasztani.

Másodszor meg kívántuk vizsgálni a vad és KO mutáns *C. albicans* törzsek reagálását egy gyors oxidatív stressz kezelésre. Olyan kísérleti rendszert kívántunk létrehozni, ami lehetőséget nyújt a foszfatáz hiányának, az oxidatív kezelésnek, valamint a kettő kombinációjának összehasonlító elemzésére. Ehhez be kellett állítanunk az optimális tenyésztési és kezelési körülményeket, amelyek már kimutatható hatással vannak a gombára, de nem okoznak drasztikus változást a sejtek növekedésében, életképességében, vitalitásában és morfológiájában. Mivel a QMY23 törzset eddig nem jellemezték ebből a szempontból, szeretnénk volna megismerni mind a két törzs fiziológiás viselkedését oxidatív stressz körülmények között. Az oxidatív stressz hatásosságát oxidatív enzimek aktivitásának és a sejtek glutation tartalmának mérésével kívántuk alátámasztani. A fiziológiás kísérletek beállítását és az optimalizálást követően két független módszerrel kívántuk a transzkriptomikai vizsgálatokat elvégezni. Előkísérletként egy DNS chip hibridizációs vizsgálatot terveztünk, amit egy új-generációs RNS szekvenáláson alapuló fő kísérlet követ. Az így kapott eredményeket RT-qPCR módszerrel kívántuk alátámasztani.

Mindezen vizsgálatoktól azt vártuk, hogy a CaPpz1 foszfatáz újabb funkcióit ismerhetjük fel. A globális vizsgálatok új adatokat szolgáltathatnak a foszfatáz hiánya és az oxidatív stressz közötti kölcsönhatásra. Abban reménykedtünk, hogy eredményeink hozzájárulhatnak egy specifikus CaPpz1 gátlás és egy enyhe oxidatív stressz kombinálásán alapuló új gombaellenes kezelés kidolgozásához.

5. Anyagok és módszerek

5.1 Anyagok

5.1.1 Vegyszerek

A kísérletek során használt vegyszereket/kiteket a következő gyártóktól/forgalmazóktól szereztük be:

Agilent: Eucaryotic Total RNA Nano Kit, GE Wash Buffer 1 és 2, Zorbax 300SB-C18 sómentesítő oszlop, Zorbax 300SB-C18 analitikai oszlop

Bio-Rad: agaróz, brómfenolkék, SDS, Ready-Prep™ 2-D Cleanup Kit, IPG sztrip, ammónium-hidrogén-karbonát, jódacetamid

Diagon: mikológiai pepton

Gibco: PBS tabletta

Illumina: TruSeq RNA Sample Preparation Kit

Invitrogen by Thermo Fischer Scientific: FungaLight™ CFDA, AM/Propidium Iodide Yeast Vitality Kit

Life Technologies: 1 kb DNS standard, Pro-Q Diamond™

Merck: benzamidin

Molecular Research Center: Tri Reagent

Reanal: β-merkaptó-etanol, metilénkék, trinátrium-citrát, nátrium-acetát, mangán(II) klorid, nátrium-dihidrogén-foszfát

Roche: complete EDTA-free proteáz inhibitor koktél

Serva: ServaBlue G

Sigma-Aldrich: tercier-butyl-hidroperoxid (továbbiakban *t*BOOH), RPMI-1640, szulfoszalicilsav, acetonitril, MS-tisztaságú víz, leupeptin, PMSF

Thermo Fischer Scientific: dNTP

VWR: glükóz, élesztő kivonat, bakterológiai agar, foszforsav, etanol, Tris, nukleázmentes víz (továbbiakban NFW), kloroform, izopropil-alkohol, szacharóz, EDTA, ecetsav, GelRed, hangyasav, abszolút etanol, glicerol

A kísérletekben használt enzimeket és egyéb fehérje preparátumokat a megfelelő fejezetben tüntetem fel.

5.1.2 Oligonukleotidok

A disszertációban leírt kísérletekhez felhasznált oligonukleotid primerek a *Sigma-Aldrich* cégtől származnak. Ezek részletes leírását a 2-4. táblázatokban láthatjuk:

2. táblázat A proteomikai vizsgálatok során RT-qPCR analízishez használt oligonukleotidok

Gén név	Gén ID ²	Forward (F) primer (5'-3')	Reverz (R) primer (5'-3')	T _m F - R (°C) ^{***}	Termék (bp)
<i>ACT1</i>	C1_13700W	GTTGCTCCAGAAGAACATCC	ACCATCACCAGAATCCAAAAC	61,3-61,4	192
<i>ADE12</i>	C1_09640W	TTGGTTGAAGGTGCTAATGC	ATGGTTCTTGGAGGAATACCC	62,6-62,8	122
<i>AIP2</i>	C3_03040W	CGGTGACTTCCCATTCTATG	ATTTGAGCCTCATCTTGTGC	61,9-61,8	144
<i>BMH1</i>	C1_03220C	CACCAACCCATCCAATCAG	AATCAGCAACAGCATCATCG	63,9-63,9	126
<i>C2_07290W</i>	C2_07290W	CGAAGCTCTTGGTGCTCTTG	GCTTTTTCTGAGTTTTCCCAGTG	65,1-64,8	138
<i>C5_04300C</i>	C5_04300C	GATATGGTTGCTCCTTTGACTG	ATGAAAGGGATGGGAATCTC	60,9-60,1	155
<i>CEF3</i>	C5_01580C	GATCACAATTGGGTCCAAGG	AGCAGCGGCAATCTTGTTAC	64,1-64,2	105
<i>CPR3</i>	C2_02320C	TGCTTCAAGGTGGTGATTTTG	GGACCAGCATTGGCCATAG	64,8-65,4	139
<i>CYP5</i>	C3_06360C	CAATCGCATTGATTGCTTC	ACAACCGTGCCAAAGAGAC	61,8-62,8	170
<i>EFB1**</i>	C4_04480C	ATGGTACTACTGCCACTCAAGC	CAGTGAATGAAGCAATGTGGT	62,1-62,6	102
<i>EFT2**</i>	C2_03100W	ACAAGATGGTTGCTTTCCTATTG	TTGGCAGCGGAAATAATACC	63,0-63,5	154
<i>GUK1</i>	C5_03790W	CATCTGCCAATAGACCAATCG	TGGTTTTCTGGTGGTGTTTG	64,2-63,4	128
<i>HAM1</i>	C5_03860W	GACTCCTCCTCCTCCTCATC	CAATGACTTTAGCAGCAGCTTG	61,8-63,8	148
<i>HSP70</i>	C1_13480W	CATTAGTGGTGCTTATGGTGC	ACTTCTTCAACAGTTGGTCCA	61,9-61,2	164
<i>IDH1**</i>	C1_09630W	CGTTATTGCTCAAAAGAACTCC	CTTGACCAGCACCATCACC	61,5-64,4	125
<i>PPZ1</i>	CR_06420W	TCACAACAACGTCCACAACCA	GACAACGGTGAACCTGGC	64,7-64,4	173
<i>RAD23</i>	C2_01850W	AACAACCACAACCAGCAGC	ATGCGGCTCTTAATGCAGC	63,9-65,3	129
<i>RPL20B</i>	C4_01520C	GTTGGTGCTGTTGAAACCATG	CTCTGTGTGGTAATGGGAATTTC	65,3-63,3	169
<i>RPL9B</i>	C3_02470C	CCCAGAAGGTGTCCTGTTG	GCAGCAACGTGTTTTCTGTC	63,3-63,5	165
<i>RPP0</i>	C7_00990W	TCCGAAGCTACCTTGTTGAAC	GATGGATGATGGGAAGACTTG	63,1-63,3	103

Gén név	Gén ID ²	Forward (F) primer (5'-3')	Reverz (R) primer (5'-3')	Tm F - R (°C) ^{***}	Termék (bp)
<i>RPS7A</i>	C3_01490W	TCAAGCTTTCGTTGATTGG	GGTGGTGGAAACGAAAACAG	62,7-63,0	129
<i>TIF1</i>	C1_01350C	ACCGCTACCTTTACCATTTCTG	ACCACCAATAGAAGCATGGAC	63,0-62,7	165
<i>TKL1</i>	C1_08320W	TTCACCTTCGACCAACAATC	GCACCAAATCTGTTCAAACC	62,5-62,0	141
<i>TSA1</i>	C3_06180C	AAATTTGCCGAAAAGGATGC	TCTGGACAAGGAGTGGTTGG	64,8-65,2	150
<i>UBA1</i>	C3_06500W	CAGGTGAAGAACCATTGAGC	GGCAAACCTTGACATAATCGC	62,3-62,0	113
<i>URE2</i>	C2_04710C	GGTGAATGTTTCATTATGGTCG	CTTTCTACAGCACTTGGTACTGG	61,6-61,7	152
<i>YST1*</i>	C3_05370C	TGTTATTAGCTGCCAACGTCC	CAGCAGCAATGATTCTGGC	62,5-62,0	153

* A primer pár intron szekvenciát fog közre.

**A forward primer exon-intron határon kötődik a génhez.

*** A *Sigma-Aldrich* gyártócéggel meghatározott Tm.

3. táblázat A transzkriptomikai vizsgálatok során RT-qPCR analízishez használt oligonukleotidok*

Gén név	Gén ID	Forward (F) primer (5'-3')	Reverz (R) primer (5'-3')	Tm F - R (°C) ^{**}	Termék (bp)
<i>ACT1</i>	C1_13700W	GTTGCTCCAGAAGAACATCC	ACCATCACCAGAATCCAAAAC	61,3-61,4	192
<i>AOX2</i>	C1_09150W	TGCCAATCCAAACACTTCAG	TGAGGAAACACTGGATGTGG	63,7-63,7	123
<i>BUD22</i>	CR_00680W	ACCAGAGGATGCCCAAGTAG	TATCGTCCACCGGGATAGTC	63,0-63,6	122
<i>C3_02750W</i>	C3_02750W	TTGATGTCCCCGTTAGAAATG	TTACTGGCAATGGTAGCATTC	63,5-61,5	127
<i>CAM1</i>	C3_06010W	TGTCTTTATTTGATTAACCTTGGCTG	AACTCTAGCTTCAGTTGGCAAC	62,0-61,4	129
<i>CAT1</i>	C1_06810W	TTTCTCTTTTGGGTGTGGATG	GGTGGTGAATTAGGTTCTGC	63,7-61,0	164
<i>CDC19</i>	C2_05460W	TCCACCAAACCACGAAATG	ACCTGGAGCAATGACTTTGG	64,5-64,0	112
<i>CDR1</i>	C3_05220W	AAGATGTCGTCGCAAGATG	TCACTTGTATGGGCATCAAAC	61,5-62,4	110
<i>CFL2</i>	C4_05780C	GGTGTGTGCTGCTACCATTTG	CACCATACCCTTGGTCGTC	63,0-62,9	157
<i>CFL4</i>	C5_01360W	AAACTATCCCCATTGATGTGC	CAATTGACAATAGCCCCAATAC	62,5-61,9	166
<i>CHT3</i>	CR_10110W	CCTCCACAGCACCAACTTC	TAACAACCTGGGGTTGTCTCG	63,5-62,6	111

Gén név	Gén ID	Forward (F) primer (5'-3')	Reverz (R) primer (5'-3')	Tm F - R (°C)**	Termék (bp)
<i>DIM1</i>	C1_13730C	CCGGGTTCAAATCTTCTAATG	AAACCCAGTTTCAGTCAAAACAG	62,1-63,1	170
<i>EFT2</i>	C2_03100W	ACAAGATGGTTGCTTTCACATTTG	TTGGCAGCGGAAATAATACC	63,0-63,5	154
<i>ENA2</i>	C1_00390W	GTGCTGGAAATGGTGACTTG	CCAAGTCATTGAGGCAAATG	63,2-63,1	110
<i>ENA21</i>	C7_02910W	TGGCAGAAAATGTCGCTC	TATCGTCATCGGCACCAC	62,7-63,4	168
<i>ENP1</i>	C7_03700C	ATCCCAAGGTGGGAATTTAAG	ACCGCCACCATTTTTCTTC	62,7-62,5	121
<i>FET31</i>	C6_00480C	TCTCATGTATTGCCGGTGTC	AAGAAGAAGATCCTTCATTGACG	63,6-62,4	150
<i>FGR41</i>	C1_10400C	AGAAAGTCCCGTGGAACAAG	ACTGGGGTTGGGGTAGAAG	63,0-62,7	114
<i>GAP1</i>	C5_02790C	GGGGATCATATTTTGGGTTAAC	CCCAAATATGCCAAAAGAAATC	61,9-64,0	118
<i>GAP2</i>	C3_05580C	TTGTACAGTTATGTCCCTTGGG	CACCACTAGCCATTGCATAGC	62,5-64,4	139
<i>GIT1</i>	C2_06590C	ATGTGTGCTGCTTCTCATGG	TTAGCAGCTTCACTTGCTGTC	64,0-62,3	131
<i>GPM1</i>	C2_03270W	ATCCAGAGCCATCCAAACTG	CTTGACCGTAAGCTTCCAAAG	64,0-62,6	149
<i>HGT1</i>	C1_01980W	GTGTCACCGTTCCTGCATTATAT	AAGGAATTGAGTATTGACCCAAA	63,6-62,3	129
<i>HGT12</i>	C7_00280W	TTGTTGGGCTATTTGTGGTG	CACCTTTGAACCCAAGTCG	63,3-63,2	160
<i>HPT1</i>	C2_02740C	TGAAAAGCCAGGTACCCAAG	TGCGTAATGCAAAGTGTTTC	63,9-63,6	130
<i>HSP70</i>	C1_1348W	CATTAGTGGTGCTTATGGTGC	ACTTCTTCAACAGTTGGTCCA	61,9-61,2	164
<i>IFF11</i>	C3_00600W	AATCTCTGTCGCCATTTTGG	TCCAAGGCAATACACCCAC	63,9-63,4	123
<i>IFM1</i>	C7_02940C	ATACACCTGGACACGCTGC	CGATGGTTTGAGGCATAACC	63,9-64,1	111
<i>JEN2</i>	C4_04030W	TACTTCTGGGCATTCCATCC	GAACGGAAATGTGGAGGAG	63,7-62,1	112
<i>MRPL3</i>	C1_07910C	GGGAGATTATCGGCTCATCC	TTTATTGGTTCACCATTTGCAC	64,5-63,3	170
<i>NAG3</i>	C6_04610C	ACACCATTACCATGACGAC	GTTCCAATGGCCCTAACTG	63,5-61,9	117
<i>NSA2</i>	C3_06380W	AAGGGTTGGAGAGCCAAAC	ATACGTTGGCAAGGCCTC	63,0-62,7	144
<i>OYE23</i>	C6_01510W	TTGGGATTTTTGATGCTTCG	TGCAAACCCCAACAATAGTACG	64,7-64,5	168
<i>PGK1</i>	C6_00750C	AACGATGCCTTTGGTACTGC	GGGTTTTCCAAAGCCTTAGC	63,9-63,6	125
<i>PHO84</i>	C1_11480W	GTTTGTGGGTTTGTTCGTC	ATGGCACCGACTTTACCAG	61,8-62,6	148
<i>PLB1</i>	C6_01990W	AAAATTAGACAATGGTCGTCCA	AGGTATGTTAGCTTCAGTGATAGACAAC	62,1-62,6	127
<i>RPL29</i>	C1_11040W	CAGCTCACAACCAAACCAG	AAAGCTTTGGCAGTACCATG	62,0-61,7	139
<i>RPL5</i>	C7_01790C	ATTTTCGGTGGTCACGTTG	GGTCAGCTCTAATGGCTTCG	63,4-63,8	157

Gén név	Gén ID	Forward (F) primer (5'-3')	Reverz (R) primer (5'-3')	Tm F - R (°C)**	Termék (bp)
<i>RPP1B</i>	C7_03920C	CTCCGTCTCATACGCTGC	TTTACCTTCAACGGCTTTGG	62,3-63,7	142
<i>RPS3</i>	CR_04810W	CAAGGTTATGCTGGTGTGAAG	AAATGGCAATACCTTCTGGAG	63,3-61,8	166
<i>RPS8A</i>	C2_05610C	CACAAAAGATCCGCCACTG	CCGGTTTCAACTCTCAAAGC	64,3-63,6	164
<i>RSM26</i>	C5_04530W	CTTGGCATGGACCGATTATC	TAGTTTGCTTGGCTGTGTGC	64,1-64,0	119
<i>SOD1</i>	C4_02320C	TTGAACAAGAATCCGAATCCG	GAAATGAGGACCAGCAGAAG	65,9-61,4	137
<i>SOD3</i>	C7_00110W	TGCTCAGTATGGGTCTGTTTC	ATCCTGATTGGCAGTAGTGAC	61,7-60,6	142
<i>SOD4</i>	C2_00660C	GGATTGCCTTCAGGTGTTG	AGCTGGTGTTTTGGCAGTAG	63,2-61,9	133
<i>SPB4</i>	C5_01600C	ATCTCTTGCATGGGAGAATTTAC	CCTGATCCAGTGACTGCTTC	62,1-62,5	159
<i>TRK1</i>	CR_07960C	TGAAGAGCCACAGAGACCAAG	TCAGGGTCAATCGACTTCC	64,5-62,8	109

* Minden primer azonos módon hibridizál az adott gén A és B alléljához.

** A Sigma-Aldrich gyártócégtől meghatározott Tm.

4. táblázat Az rRNS érés vizsgálatára tervezett RT-qPCR kísérletekben használt oligonukleotidok

Analízis száma**	Gén név	Gén ID	Forward (F) primer (5'-3')	Reverz (R) primer (5'-3')	Tm F – R (°C)*	Termék (bp)
1	<i>RDN18</i>	CR_08770W	CGACTGTTTGGAAGGGATG	TGAAACCATGGTAGGCCAC	63,2-63,4	167
2	<i>ITS1</i>	CR_08780W	CGGAAGGATCATTACTGATTG	CAAGAGATCCGTTGTTGAAAGT	62,1-62,0	177
3	<i>ITS2</i>	CR_08800W	CATGCCTGTTTGAGCGTC	CCTGATTTGAGGTCAAAGTTTG	63,2-62,4	191
4	<i>RDN25</i>	CR_08810W	TCGGTAAGCGTTGGATTG	AGCCGCAAAAACCAATTATC	62,3-62,6	160
5	<i>RDN5</i>	CR_08760C	TGCGGCCATATCTAGCAG	GCACAATAGTTTCGCGTATGG	62,6-64,1	110
6	<i>RRNS</i>	CM_00360W	CCAGCAGTAGCGGTCATACAC	TCTGGAGGACGGGCTATC	64,5-62,9	120
7	<i>RRNL</i>	CM_00010W	TGGTCGTCTAGGCTCAACC	GAGCCACATGCAACAGATG	62,9-63,1	134

* A Sigma-Aldrich gyártócégtől meghatározott Tm.

** A számok a primerek által közrefogott régiókat jelöli, amelyre a 25. ábra ad részletes magyarázatot.

A cDNS szintézishez használt Oligo(dT) és random primert a *Promega* gyártja.

5.1.3 Oldatok

TAE: (40 mM Tris, 20 mM ecetsav, 1 mM EDTA, pH 8,5)

6x DNS mintapuffer: 40 % szacharóz, 0,416 % brómfenolkék, 1 x TAE

5.1.4 Tápoldatok

YPD tápoldat: 1 % élesztő kivonat, 2 % mikológiai pepton (*Oxoid*), 2 % glükóz, pH = 5,6

YPD táptalaj: YPD tápoldat + 2 % bakterológiai agar

Spider tápoldat: 1 % mannit, 1 % tápleves („Nutrient broth”, *Merck*), 0,2 % K₂HPO₄, pH = 7,2

RPMI-1640 (*Sigma-Aldrich*)

Sabouraud tápoldat: 2 % mikológiai pepton (*Oxoid*), 2 % glükóz

5.1.5 *C. albicans* törzsek

Munkánk során kétfajta törzzsel dolgoztunk, a *ppz1* deléciós mutánszal (továbbiakban KO) és a genetikai háttérrel megegyező QMY23 (továbbiakban WT) kontroll törzzsel.

QMY23 (WT) törzs genotípusa:

his1Δ/his1Δ, leu2Δ::C. dubliniensis HIS1 /leu2Δ::C. maltosa LEU2,URA3/ura3Δ::imm434, IRO1/iro1Δ::imm434 (Mitrovich és mtsai., 2007)

A *ppz1* deléciós mutáns (KO) törzs genotípusa:

ura3Δ-iro1Δ::imm⁴³⁴/URA3-IRO1, his1Δ /his1Δ, leu2Δ /leu2Δ, ppz1Δ:: C. dubliniensis HIS1/ppz1Δ:: C. maltosa LEU2 (Ádám és mtsai., 2012)

Látható, hogy a KO törzsből mind a két *CaPPZ1* allél ki van ütve, máskülönben a genetikai háttere megegyezne a WT törzzsel.

5.2 Módszerek

5.2.1 Biológiai módszerek

5.2.1.1 *C. albicans* sejtek tenyésztése

A tenyésztés során a két nap alatt YPD táptalajon, 37 °C-on felnevesztett telepekből 5 ml-es kultúrákat készítettünk, melyeket 37 °C-on tenyésztettünk 18 órán át rázatás nélkül (álló tenyészet). Az így felnőtt tenyészetekből friss 20 ml-es kultúrákat hoztunk létre, melyek 640 nm-en mért optikai denzitását (OD_{640}) 0,1-re állítottuk be. A proteomikai vizsgálatokhoz ezeket a kultúrákat addig növesztettük 37 °C-on, 140 rpm rázatás mellett, amíg a KO törzs el nem érte az $OD_{640}=0,8$ értéket (2. Függelék). A sejteket ezt követően centrifugálással összegyűjtöttük, kétszer mostuk 1x PBS-sel, majd -70 °C-on tároltuk felhasználásig. A transzkriptomikai vizsgálatokhoz a sejteket *tBOOH*-val kezeltük, melynek végkoncentrációja 0,4 mM volt. A tenyésztés ez előzőekhez hasonló módon zajlott, kivéve, hogy az $OD_{640}=0,1$ értékre beállított kultúrákat ebben az esetben 4 órán át tenyésztettük, majd a minták feléhez *tBOOH*-t adtunk. A kezelés 1 órát vett igénybe, így az 5. órára kezelt (WTt, KOt) és kezeletlen (WT, KO) mintákkal rendelkezünk (3. Függelék). Minden kísérletben két-két technikai párhuzamossal dolgoztunk.

5.2.1.2 Növekedés vizsgálata

A *C. albicans* növekedését *tBOOH* nélkül illetve jelenlétében, az OD_{640} értékek mérésével követtük. A sejteket a plató fázis eléréséig növesztettük (8 óra). Meghatároztunk a kezeléshez szükséges optimális időtartamot, amelynek hatására a sejtek még nem pusztulnak el, de növekedésük jól mérhető módon lelassul. Eredményeink szerint a kezelés optimális időtartama 1 óra volt (3. Függelék).

5.2.1.3 Biofilm képződés vizsgálata

Az *in vitro* biofilm képzést kétféle tápoldatban vizsgáltuk, egyrészt Spider médiumban, másrészt pedig hidrogén-karbonátmentes RPMI-1640-ben. Az RPMI-1640 egy általánosan használt tápoldat, mert biztosítja a gombák egyenletes fonálképződését. A szelektív Spider médiumot szintén gyakran használják a biofilm vizsgálatokban (Nobile és mtsai., 2012). A gombasejtek növesztése kezeletlen 12 lyukú polisztirol tenyésztőedényekben (Multiwell Cell Culture Plates, VWR) történt Sabouraud tápoldatban 37 °C-on, 18 órán át. Másnap mintánként

2×10^6 élesztő sejtet szuszpendáltunk 2 ml Spider vagy RPMI-1640 tápoldatban, és a tenyésztőedényeket 24 órán át inkubáltuk 37 °C-on, 50 rpm rázatás mellett. A szokásos mosási lépéseket kihagytuk, mivel a két törzs különböző adhéziós tulajdonságokkal rendelkezik (Nagy és mtsai., 2014), ami befolyásolta volna az eredményeket. Az inkubáció után a tápoldatot óvatosan eltávolítottuk a biofilmről, majd mostuk kétszer 1 ml 1x PBS-sel. A tápoldatban levő planktonikus sejteket centrifugálással gyűjtöttük össze. A száraz biofilm tömegét, valamint a planktonikus/nem kötődött sejtek tömegét Nobile és mtsai. (2012) módszere alapján határoztuk meg. A tenyészetekről mikroszkópos felvételeket is készítettünk egy Olympus BD40 fáziskontraszt mikroszkóp és a hozzá rögzített digitális kamera segítségével, 40x nagyításban.

A biofilm növekedést egy másik módszerrel is vizsgáltuk. A kristályibolya festés során az inkubációt 24 lyukú tenyésztőedényekben (Linbro Tissue Culture Multiwell Plates, ICN Biomedicals) végeztük a korábbival azonos módon. A módszer leírását megtalálhatjuk Jin és mtsai. (2003) cikkében. Mindkét módszer esetén 2 technikai és 3 biológiai párhuzamos készült. A statisztikai analízis során Student-féle kétoldalú kétmintás t-próbát és a Welch-tesztet alkalmaztuk.

5.2.1.4 Kolóniaképző képesség meghatározása

Az 5.2.1.1 pont szerint tenyésztett, tBOOH-val kezelt és kezeletlen tenyészetekből a 4. (kezelés előtti) és az 5. (kezelés utáni) órában mintát vettünk. PBS felhasználásával 10x hígítási sorozatot készítettünk. A 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} hígításokból 120 μ l-t pipettáztunk szilárd YPD táptalaj felületére, amit aztán eloszlattunk a felszínen a lemezek forgatásával. Minden esetben 3 technikai párhuzamost készítettünk. A lemezeket 1 napig inkubáltuk 37°C-on, majd megszámoltuk a telepeket. Az eredményeket CFU/ml-ben adtuk meg, ami a következő módon számoltunk: kolóniaszám x hígítási faktor/minta térfogata ml-ben.

5.2.1.5 Életképesség és vitalitás vizsgálata

A sejtek életképességét metilénkék festéssel vizsgáltuk meg (Kwolek-Mirek és Zadrag-Tecza, 2014). Az 5.2.1.1 pont szerint kezelt tenyészetekből 1 ml mintát vettünk és a sejteket centrifugálással gyűjtöttük össze. Mosást követően a sejteket 300 μ l PBS-ben vettük fel. 100 μ l sejtuszuspenzióhoz hozzáadtunk 100 μ l 0,001 g/ml koncentrációjú metilénkék festéket (2 %-os trinátrium-citrátban oldva). Szobahőmérsékleten való 5 perces inkubálást követően, 10

µl mintát cseppentettünk ki tárgylemezre és fáziskontraszt mikroszkóp (*Euromex Holland*) alatt vizsgáltuk a festődésüket. A tárgylemezről random kiválasztott 5 látómezőről fényképet készítettünk MicroQ-W PRO kamera segítségével. A három független kísérlet képeit ImageJ szoftverrel értékeltük ki. Az eredeti képeket átkonvertáltuk 16 bites szürkeárnyaltos képekké, és a háttérértéket beállítottuk 211 és 232 közé. Emellett beállítottuk az objektumok méretét (30-tól végtelenig) és az alakzatát (0,2-0,8) (1 a teljes kör alakot jelenti), majd kizártuk az értékelésből a képek széleit. Az így kiválasztott sejteket és hifákat manuálisan számoltuk meg.

A sejtek vitalitását a FungaLight™ CFDA, AM/Propidium Iodide Yeast Vitality Kit segítségével vizsgáltuk meg. A kit alapja a CFDA (5-karboxi-fluoreszcein-diacetát) acetoximetilészter (AM) része, amely segíti a reagenst bejutni a sejtbe. Az intracelluláris észterázok a lipofil blokkoló és a diacetát csoportokat lehasítják a CFDA AM-ről, amely így detektálható zöld fluoreszcens jelet ad. A propidium-jodid (PI) a halott sejtek membránján jut át, majd hozzákötődve a DNS-hez piros fluoreszcens jele alapján detektálható. A kísérletek során a kezelést követően, vagyis az 5. órában 3 ml mintát vettünk a tenyészetekből, amiket centrifugálás követően 1 x PBS-sel mostunk. A sejteket 300 µl PBS-ben vettük fel és 0,3 µl PI-t (20 mM), valamint 0,6 µl CFDA, AM (0,1 mg/ml) festéket adtunk hozzá. Egy rövid vortexezés után 30 percig inkubáltuk a mintákat 37 °C-on. Ezt követően újra megkevertük a mintákat és 20 µl sejtuszpenziót cseppentettünk ki a tárgylemezre. A sejteket Leica SP8 konfokális mikroszkóp alatt vizsgáltuk. A kiértékelést itt is ImageJ szoftverrel végeztük az előzőhöz hasonlóan, viszont ebben az esetben az intenzitás értékeket mértük. A határértékeket külön állítottuk be a zöld (13) és a piros (26) csatornára a 8-bites képeken, illetve elimináltuk a kiugró értékeket. Az analízis ezt követően automatikusan a szoftverrel történt.

5.2.1.6 Morfológiai vizsgálatok

A morfológiai vizsgálatok egy részéhez felhasználtuk a metilénkék festéssel kapott eredményeket (5.2.1.5 fejezet). Ebben az esetben manuálisan számoltuk meg az élesztősejt/hifa arányt. Emellett áramlási citometriai vizsgálatokat végeztünk. A mintákat a FungaLight™ kittel, az 5.2.1.5 pontban leírt protokoll alapján készítettük elő. Az analízist a Novocyt 3000 áramlási citométerrel (*Acea Biosciences, Inc.*) végeztük. Minden minta esetén 500 000 objektumot (eseményt) analizáltunk. Az élesztő/hifa arányt a FSC-A/FSC-H sűrűség diagram alapján a dublett megkülönböztetési módszer szerint adtuk meg (Böhmer és mtsai., 2011). Az egyedi (nem hifázó) élesztősejtek adták az egysejtes eseményeket, melyek átlósan

csoportosultak a sűrűségdiagramon, míg a hifák megnövekedett FSC-A/FSC-H arányt mutattak (4. Függelék).

5.2.2 Biokémiai módszerek

5.2.2.1 Enzimaktivitás mérések

Az enzimaktivitás mérésekhez mechanikai roncsolással tártuk fel az 5.2.1.1 pont alapján készített *C. albicans* mintákat. A sejteket 400 µl PBS-ben vettük fel, amihez kb. 500 µl cc. HCl-lel kezelt és hőlégsterilizált üveggyöngyöt (1 mm Ø, *Marienfeld*) adtunk. A roncsolás 4x 1 perces maximális fordulatszámú vortexeléssel (*ZX³ VELP*) történt, az egyes lépések között a mintákat 2 percig jégen hűtöttük. Ezt követően centrifugálással elkülönítettük a sejtörmeléket a mintáktól és a tiszta felülúszót azonnal felhasználtuk. A fehérjetartalmat Bradford módszerrel határoztuk meg (Bradford, 1976). A kataláz, szuperoxid dizmutáz, glutation-reduktáz és peroxidáz enzimaktivitás méréseket a Jakab és mtsai. (2015) cikkben leírt fotometriás módszerekkel végeztük el. A szuperoxid-dizmutáz egy egysége az az enzim mennyiség, amely az enzim nélküli kontroll mintában a nitrokék-tetrazolium-klorid (NBT) oxidációjának reakciósebességét 50 %-kal csökkentette (Emri és mtsai., 1999 és Oberley és Spitz, 1984). Az enzimaktivitások meghatározásához 4 biológiai párhuzamos készült.

5.2.2.2 Glutation koncentrációk meghatározása

A minták glutation tartalmának meghatározása során az 5.2.1.1 pont szerint nyert sejteket PBS-sel való mosás után 5 %-os szulfoszalicilsavban vettük fel. Az így készült sejtszuszpenziókat -20 °C-on tároltuk felhasználásig. A négy független kísérlet mintáinak oxidált (GSSG) és redukált (GSH) glutation koncentrációit glutation reduktáz-DTNB módszer segítségével mértük le (Anderson, 1985).

5.2.2.3 Genomi DNS izolálása

A *Candida* törzsek genotípusának, valamint a disszertációban használt oligonukleotid primerek működésének bizonyításához genomi DNS-t preparáltunk (Lee és mtsai., 1988). A sejteket először kézi Potter segítségével elroncsoltuk, majd szuszpendáltuk 500 µl kivonó pufferben (50 mM Tris, 50 mM EDTA, 2% SDS + frissen hozzáadott 1% β-ME). Ezt követően 100 µg/ml végkoncentrációban RNáz A enzimet (*Serva*) adtunk a

sejtszuspenzióhoz és fél órán át 37 °C-os vízfürdőben inkubáltuk. Ezt követte a proteináz K (*Merck*) kezelés, amit 100 µg/ml végkoncentrációban adtunk a sejtekhez és ezzel inkubáltuk 50 °C-on 1 órán át. A fenol-kloroformos kicsapást kétszer végeztük el, amely során 1:1 arányban adtuk a fenol-kloroform elegyet a sejtszuspenzióhoz. Keverés után centrifugálással elválasztottuk a vizes fázist a szerves fázistól és a vizes fázissal dolgoztunk tovább. A DNS kicsapásához a mintához 2 térfogat abszolút etanolt és NaOH-t adtunk 250 mM végkoncentrációban. Az elegyet -20 °C-on inkubáltuk 30 percig, majd centrifugálással gyűjtöttük össze a kicsapódott DNS-t. A pelletet 70 %-os etanollal mostuk, majd Savant DNA 120 SpeedVac Concentrator (*Thermo Fisher*) vákuum centrifugában szárítottuk be. A beszáradt pelletet 50 µl nukleázmentes vízben (NWF) vettük fel. A DNS koncentrációját és tisztaságát NanoDrop 1000 Spektrofotométerrel (*Thermo Scientific*) határoztuk meg.

5.2.2.4 Polimeráz láncreakció (PCR)

A genotípusok ellenőrzését PCR reakcióval végeztük (5. *Függelék*) a Mastercycler nexus gradient (*Eppendorf*) készülék segítségével. Több esetben is alkalmaztuk a kolónia PCR elvét, vagyis a gombatelepek egy kis részletét NFW-ben szuszpendáltuk és ezt használtuk templátként (Petrényi és mtsai., 2016). A reakciót Phusion polimerázzal (Phusion Hot Start II High-Fidelity PCR Master Mix, *Thermo Fisher Scientific*) végeztük a gyártó utasításai szerint. Maga a polimeráz egy 2-szeres mester mixben található, ami minden reakcióelegyet (puffer, dNTP, MgCl₂) tartalmaz, így csak a templátot, primereket és DMSO-t (3 %) kellett hozzáadni a reakcióelegyhez.

Az RT-qPCR-hez használt oligonukleotidok ellenőrzése szintén PCR reakcióval történt a fentiekkel azonos módon. Minden primer pár egyetlen sávot adott a megfelelő mérettartományban (6-9. *Függelék*). Az oligonukleotid primerek tulajdonságai a 2-4. táblázatokban találhatók meg.

5.2.3 Proteomikai módszerek

5.2.3.1 Fehérjeminták kinyerése és tisztítása

A proteomikai vizsgálatokhoz az 5.2.1.1 pontban leírt tenyésztéseket követően a gomba sejtekből fehérjét preparáltunk. A 3 független kísérletet végeztünk. A sejteket 1 ml lízis pufferben (50 mM NaH₂PO₄ (pH = 7,4), 1 mM EDTA, 5 % glicerol, 1 x proteáz inhibitor koktél, 5 mM benzamidin, 10 nM leupeptin, 1 mM PMSF, 1 mM MnCl₂) szuszpendáltuk fel

és 500 µl üvegyöngyöt adtunk hozzájuk. A sejtsuszpenziókat ezt követően háromszor vortexeltük maximális fordulatszámon, miközben minden kevertetés között 2 percig jégen hűtöttük a mintákat. A sejttörmelékét centrifugálással eltávolítottuk, majd a felülúszó fehérjetartalmát Bradford reagenssel ellenőriztük (Bradford, 1976). 450 µg fehérjére volt szükségünk minden egyes minta esetén. A kapott mintákat a gyártó protokollja szerint Ready-Prep 2-D CleanUp Kit (Bio-Rad) segítségével tisztítottuk. A fehérjék kicsapása és centrifugálása után minden pelletet beszárítottunk és feloldottuk 450 µl rehidrációs pufferben (7 M karbamid, 2 M tiokarbamid, 4 m/v % CHAPS, 1 % DTT, 2 v/v % Bio-Lyte és 0,001 % brómfenolkék). Az így kapott mintákat azonnal felhasználtuk a kétdimenziós (2D) elektroforézishez. Minden kísérleti párhuzamos esetén készítettünk egy-egy kevert csoport is, amelyek egyenlő mennyiségben tartalmazták az adott kísérlet KO és WT fehérje mintáit. Ezeket a későbbiekben a foltok kivágásához használtuk fel.

5.2.3.2 Kétdimenziós elektroforézis

A 3 biológiai párhuzamost, vagyis a 3 mutáns és 3 kontroll mintát, valamint a kevert mintákat azonos napon használtuk fel kétdimenziós elektroforézisre. Először 450 µl pufferben (7 M karbamid, 2 M tiokarbamid, 4 m/v % CHAPS, 1 % DTT, 2 v/v % Bio-Lyte, 0,001 % brómfenolkék) oldott mintával rehidráltuk a 24 cm-es IPG (pH 4-7) csíkokat (sztripeket). Ez a folyamat 20 °C-on egy éjszakán át tartott. Az első dimenzió az izoelektromos fókuszálás volt, melyet 3 órán keresztül 300 V-on kezdtünk el, majd 5 óra alatt fokozatosan 3500 V-ra növeltük a feszültséget, amelyet még 18 órán keresztül alkalmaztunk. Ezt követően az IPG sztripeket 15 percig ekvilibráltuk először 0,6 % DTT-t tartalmazó ekvilibráló pufferben (500 mM Tris-HCl (pH = 8,5), 6 M karbamid, 2 % SDS, 20 % glicerol), majd még 15 percig 1,2 % jódiacetamidot (IAA) tartalmazó ekvilibráló oldatban. A második dimenziós elválasztás során a sztripeket 12 %-os SDS-poliakrilamid gélre helyeztük, amiket agarózzal fedtünk be. Az összes gél futtatását egyszerre végeztük 100 mA áramerősség mellett 24 órán át a Protean Plus Dodeca Cell (Bio-Rad) készülékben, míg a brómfenolkék festék el nem érte a gél alját. A géleket először ProQ Diamond festékekkel festettük a gyártó leírása szerint, majd vízzel való mosást követően a PharoX FX Plus Molecular Imager készülékkel szkenneltük a géleket. A ProQ Diamond festés után a foszforproteom vált láthatóvá. A szkennelés felbontása 100 µm volt. A géleket ezt követően házilag készített RuBPS [Ruthenium(II) tris(bathophenanthroline disulfonate) tetrasodium salt] fluoreszcens festékekkel is megfestettük, amelyet 20 %-os etanolban oldottunk és egy éjszakán át inkubáltunk (Rabilloud és mtsai., 2001). Ez a festék a

teljes proteomot detektálja. A festést követően a géleket 7 % hangyasavat és 10 % metanolt tartalmazó posztfixáló oldatban mostuk és az előzőhöz hasonlóan szkenneltük.

5.2.3.3 Denzitometria

A beszkennelt gélek képét Delta2D v4.4 (*Decodon*) szoftverrel analizáltuk. Ahogy korábban említettem, 3 csoportot különítettünk el: a WT (kontroll), KO (*ppz1* deléciós mutáns) és a kevert csoportot. A minták közötti különbségek tanulmányozása három lépésben történt: Elsőként a ProQ Diamonddal festett WT és KO géleket analizáltuk, majd a RuBPS-sel festetteket, végezetül minden foltot átvetítettünk az egyesített gélképekre foltkivágás céljából. Az egyes csoportokból származó fehérje foltokat illesztettünk, a pontos illesztési mód protokoll és a „group warping strategy” stratégia szerint. Az összes gélen levő valamennyi fehérje foltot tartalmazó egyesített gélkép létrehozásához az „union” módot alkalmaztuk. Minden folthoz rendeltünk egy mennyiségi értéket úgy, hogy az összes folt mennyiségét vettük 100%-nak, azaz minden folt intenzitását normalizáltuk az összes jelen levő folt összintenzitására. Az intenzitásokat normalizált folt térfogatként (% v) adtuk meg. A szoftver automatikusan kiszámolta a minták közötti általános normalizált folttérfogat intenzitás változás értékeit, illetve Student féle t-tesztel megállapította a különbségek szignifikanciáját.

5.2.3.4 Gélben való emésztés

Azokat a foltokat, amelyek a WT és KO csoportok között szignifikáns eltérést ($p < 0,05$) mutattak a normalizált folttérfogatban, kivágtuk a kevert mintát tartalmazó gélekből és fehérje tartalmukat a kivágott gélben emésztettük. A géldarabokból eltávolítottuk a festéket 1:1 arányú 25 mM-os ammónium-bikarbonát (pH 8,5) és 50 % acetonitril segítségével, majd a diszulfid hidakat 20 mM DTT-vel redukáltuk 1 órán át 56 °C-on. Ezt követően alkilálást végeztünk úgy, hogy 55 mM-os IAA oldatban 45 percig, szobahőmérsékleten, sötétben inkubáltuk a mintákat. Végül egy éjszakán át, 37 °C-on emésztettük a fehérjét 100 ng stabilizált MS tisztaságú tripszinnel (ABSiex). A reakciót másnap tömény hangyasavval állítottuk le. A gélből kidiffundált triptikus peptideket tartalmazó oldatot leszívtuk és vákuum centrifugában (*Thermo Scientific*) beszárítottuk.

5.2.3.5 Tömegspektrometria (MS)

A fehérje azonosítást tömegspektrometriával végeztük. Ehhez a peptideket újra feloldottuk 1 %-os hangyasavban, majd Easy nLCII (Burker) nanoHPLC készülékkel választottuk el egymástól. Az elválasztáshoz 90 percig víz/acetonitriles gradienst alkalmaztunk 300 nl/perces áramlási sebességgel. A peptidelegyeket Zorbax 300SB-C18 sómentesítő oszlopra (5 mm x 0,3 mm; 5 µm részecskeméret) vittük fel, majd ezt követően Zorbax 300SB-C18 analitikai oszlopon (150 mm x 75 µm; 3,5 µm részecskeméret; 300 Å pórusméret) választottuk el. A kromatográfiában használt A mozgófázis 0,1 % hangyasavat tartalmazó MS tisztaságú víz volt, míg a B mozgófázis 0,1 % hangyasavat tartalmazó acetonitril. Az elválasztás során a B mozgófázis arányát 60 perc alatt 0 %-ról 100 %-ra emeltük és 10 percig 100 %-on tartottuk. Ezt követően 2 perc alatt 0 %-ra csökkentettük a B mozgófázis százalékos arányát és 18 percig 0 %-on tartottuk. Az analitikai oszlopról eluált peptideket 4000 QTREP (ABSciex) tömegspektrométerrel vizsgáltuk. Az MS/MS spektrumokat pozitív ion módban vettük fel és az információfüggő adatgyűjtő módszert (IDA) alkalmaztuk. Az első szkennelést 400-1700 amu tömegtartományban végeztük, majd egy nagy felbontású tömegpásztázást végeztünk a két legintenzívebb prekursor ion töltésének megállapítása céljából. A fehérjék meghatározásához ütközéssel indukált disszociációs (CID) spektrumokat vettünk fel a 100-1900 amu tartományban, felerősített termék ion módban. Az ütközési energia maximuma 85 eV volt 4000 amu/sec szkennelési sebesség mellett. A ciklusidő 5,4 sec volt, az ionforrás hőmérséklete 70 °C, a feszültség 2800 V, a segédgáz nyomása 50 psi, míg a szárítógáz nyomása 20 psi volt.

A fehérjék azonosítását a ProteinPilot 4.5 szoftver (ABSciex) segítségével végeztük a kapott MS/MS spektrumok alapján. A szoftver az UniProt/Swiss-Prot adatbázist (2015. 07. verzió, 548872 szekvencia) használta és több mint 70 biológiai fehérje módosítást vett figyelembe. Egy fehérje azonosítását akkor tekintettük megbízhatónak, ha minimum 2 peptidjét találtuk meg legalább 95%-os bizonyossággal, minimum 4 b vagy y iont tartalmazó ionsorozatban. Ahol nem jártunk sikerrel a ProteinPilot szoftverrel, ott az NCBI Inr adatbázisra épülő MASCOT keresést is elvégeztük. Az analízis során emésztőenzimként a tripszint adtuk meg. A kihagyott hasítóhely számát mindkét keresés esetében maximum 1-re állítottuk. A következő lehetséges módosításokat vettük számításba: metionin oxidációja és a cisztein karbamidometilációja. Ha egy fehérjét hipotetikus vagy nem *C. albicans*-ban található fehérjeként azonosított a szoftver, az NCBI nem redundáns protein adatbázisát a blastp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>) program segítségével szűrtük abból

a célból, hogy a *C. albicans* SC5314/ATCC MYA-2876 törzsben azonosítsuk a kérdéses peptidszekvenciát. Minden szekvencia annotálást megerősítettünk a CGD adatbázisban (www.candidagenome.org) végzett kétlépéses független adatkereséssel. Elsőként blastp kutatást végeztünk alapbeállításokkal (blastn, faj: *C. albicans* SC5314 Assembly 22, várható érték: 10). Ezt követően az első szűrésben nem annotált 13 rövid peptidszekvenciát manuálisan illesztettük az egyes fehérje szekvenciákra.

5.2.4 Transzkriptomikai módszerek

5.2.4.1 RNS izolálás

A -70°C-on tartott *C. albicans* sejteket 4 órán keresztül liofilizáltuk CHRIST Alpha 1–2 LD plus lyophilizer (*Osterode, Germany*) liofilizátor segítségével. (Meg kell említeni, hogy a DNS chip hibridizációs előkísérlethez készült RNS minták esetében ez a lépés kimaradt.) A liofilizált sejteket ezt követően egy steril fogpiszkáló segítségével elporítottuk, majd 1 ml TriReagensben felfuszpendáltuk. A sejtsuszpenzióhoz ~100 µl üveggyöngyöt adtunk és a mechanikai feltárás céljából 3 percig maximális fordulatszámmal vortexeltük szobahőmérsékleten. Ezt követően a sejtörmeléket centrifugálással távolítottuk el (12 500 rpm, 10 perc, 4°C). A tiszta felülúszót új eppendorf csőbe pipettáztuk, majd hozzáadtunk 0,2 térfogat kloroformot és óvatosan fel-alá forgattuk a csöveket. A mintákat 10 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten, majd lecentrifugáltuk (12 500 rpm, 10 perc, 4°C). A felső vizes fázist átpipettáztuk új eppendorf csőbe és 1:1 arányban izopropanolt adtunk hozzá. Keverést követően újabb 10 perces inkubálás következett, majd a kicsapott RNS-t centrifugálással gyűjtöttük össze (12 500 rpm, 10 perc, 4°C). A pelletet háromszor mostuk 70%-os hideg etanollal, majd steril fülkében beszárítottuk. Az RNS-t 30 µl NFW-ben vettük fel és 10 percig 55 °C-os vízfürdőben inkubáltuk, hogy feloldódjon.

5.2.4.2 Az RNS minőségi ellenőrzése

Az RNS koncentrációját és tisztaságát NanoDrop (*Thermo Scientific*) méréssel, valamint agaróz gélelektroforézissel (*Bio-Rad*) vagy BioAnalyser-rel (*Agilent*) ellenőriztük. Az RNS szekvenáláshoz készített minták esetében a BioAnalyser kísérleteket az Eukaryotic Total RNA Nano Kit-tel végeztük a gyártó protokollja szerint. Csak azokat a mintákat fogadtuk el RNS szekvenálásra, amelyek RNS integritás értéke (RNA integrity number, RIN) 7 felett volt. Az oxidatív stressz kezelések után RT-qPCR kísérletekkel megvizsgáltuk a kezelés

hatékonyságát is (ld.: 5.2.4.5 *fejezet*). Azon RNS mintákat, amelyek minden kritériumnak megfeleltek, -70°C-on tároltuk.

5.2.4.3 DNS chip hibridizáció

Szerettük volna megtudni, hogy az adott kezelési körülmények által kiváltott változások detektálhatóak-e a globális génexpresszió szintjén is, ezért elvégeztünk egy hibridizációs előkísérletet. Ehhez egy „Agilent 60-mer oligonucleotide high density array” –t (GE 4.44K AMADID 066939 SurePrint microarray slide), azaz DNS chipet terveztünk. A chip felszínén rögzített oligonukleotidokat az Agilent eArray szoftvere (tervező szám: CA5314L) segítségével terveztük meg a *C._albicans*_SC5314/ Assembly21 kódoló szekvencia adatbázis alapján. Számításaink szerint kb 7,4 x genomlefedettséget értünk el egy chip felhasználásával. A cianin-3 (Cy3) jelölt cRNS-eket az „Agilent One-Color Labeling” protokoll v6.7 alapján készítettük. Fragmentált cRNS mintákat (1650 ng, 20 pmol alatti Cy3 specifikus aktivitás/μg cRNS) vittünk fel az chip felületére. A lemezeket 10 rpm-es rázatással 17 órán keresztül hibridizáltattuk Agilent hibridizációs kamrában. Ezt követően GE mosó puffer I-vel, majd GE mosó puffer II-vel mostuk szobahőmérsékleten a chipet. A szárítást követően azonnal beszkeneltük az Agilent DNA Microarray Scanner segítségével a 1x44k array lemezekre használható „one color scan” módban (kiterjesztett dinamikus tartomány; 61 x 21,6 mm terület; 5 μm felbontás; zöld festéksatorna; zöld PMT (photomultiplier tube): magas XDR-100 % (eXtended Dynamic Range), alacsony XDR-10 %). A hibridizációs kísérletet a Chromoscience Ltd., Gencsapáti, Magyarország cég végezte. A prenormalizált chip adatokat az Agilent „Feature Extraction” szoftverével állítottuk elő az alapértelmezett „one-color high density” protokollal. Ez követően a háttérre korrigáltuk a cég által rendelkezésünkre bocsátott adatokat a „normexp+offset” módszerrel (Ritchie és mtsai., 2007), végül elvégeztünk egy minőségi normalizálást az ismétlődő array területek között (Bolstad és mtsai., 2003 és Smyth, 2005).

5.2.4.4 RNS szekvenálás

A DNS chip biztató eredményeit látva újgenerációs RNS szekvenálással (RNA-Seq) egy nagyszabású transzkriptomikai elemzést hajtottunk végre. Az RNA-Seq könyvtárakat totál RNS-ből állítottuk elő a „TruSeq RNA Sample preparation Kit” (*Illumina*) gyártói protokollja alapján. Röviden, az RNS-t a poli-A farkánál fogva kötöttük ki oligo(dT) konjugált mágneses

gyöngyökhöz, és izoláltuk a poli-A-ban gazdag tiszta mRNS frakciót. Ezt követően az RNS-t 94 °C-on fragmentáltuk. Az egyszálú cDNS szintézisét reverz transzkripcióval végeztük, random primert használva, amit a második szál szintézise követett. Miután megkaptuk a duplaszálú cDNS-t, következett az „end repair” lépés (azaz a tompa végek kialakítása), a 3'-végek adenilálása és az adapterek ligálása. A szekvenálás az Illumina NextSeq500 műszerrel történt. A műszer 75 bp hosszúságú szekvenciárészleteket (read) olvasott le három független biológiai párhuzamos WT, WTt, KO, és KOt mintákból, azaz összesen 12 szekvenálást végeztünk. Mintánként hozzávetőlegesen 18-20 millió szekvenciárészletet kaptunk. Ezeket a read-eket ráillesztettük a referencia genomra (*C. albicans*_SC5314/ Assembly22 genom verzió, amelyet a www.candidagenome.org oldalról töltöttünk le). A genom térképezéshez, valamint az A és B allélok RPKM (Reads Per Kilobase Million) értékeinek megadásához és a bam fájlok létrehozásához a Tophat és Cufflinks bioinformatikai szoftvereket használtuk. Az egymáshoz tartozó A és B allélra vonatkozó RPKM értékeket összevontuk és ezeket használtuk a későbbi („downstream”) analízishez, amelyet az StrandNGS szoftverrel (www.strand-ngs.com) végeztünk. Az adatokat a DESEQ1 algoritmussal normalizáltuk. Elvégeztünk egy klaszter analízist és egy főkomponens-analízist (Principal Component Analysis, PCA), hogy megbizonyosodjunk a módszer reprodukálhatóságáról. A hőtérképek (heat map) készítéséhez a Cluster v3.0 és a Java TreeView v1.1.6r4 nyílt forráskódú applikációkat használtuk. Az RNS szekvenálást az UD-GenoMed Medical Genomic Technologies Kft. végezte a Debreceni Egyetem Klinikai Központjában.

5.2.4.5 Reverz transzkripció és kvantitatív PCR (RT-qPCR)

Minden esetben a teljes RNS preparátumokból cDNS-t írtunk át a kvantitatív PCR vizsgálatokhoz. Az RNS mintákat először DNáz enzimmal (DNase I, RNase-free, *Thermo Scientific*) kezeltük. A kiindulási RNS tömege 3 µg volt, amit 1 U enzimmal kezeltünk a gyártó által ajánlott protokoll szerint. A cDNS szintézishez 2 µg DNáz-kezelt RNS-t inkubáltunk együtt 1 µl oligo(dT) primerrel (*Promega*) 5 percig 70 °C-on. Meg kell említeni, hogy a rRNS érés vizsgálatához oligo(dT) helyett random primert használtunk. Az RT reakció elegye 11 µl primerrel inkubált RNS mintát, 5 µl 5x M-MLV reakció puffert, 5 µl 2 mM dNTP-t, 1 µl rekombináns RNasin® ribonukleáz inhibitor (40 U) (*Promega*), 1,5 µl M-MLV Reverse Transcriptase-t (300 U) (*Promega*) és 2,5 µl NFW-t tartalmazott. A reakcióelegyet 1 órán át inkubáltuk 37 °C-os vízfürdőben, majd a cDNS-eket -20 °C-on tároltuk.

A kvantitatív PCR során használt primereket (ld. 5.1.2 fejezet) a Primer3 v0.4.0 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) szoftverrel terveztük, és az Oligo Analyser v1.0.2 programmal ellenőriztük. A primerek specifikálásáról blastn programmal (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#>) bizonyosodtunk meg. Minden primer párt PCR reakcióval teszteltünk cDNS, valamint gDNS templáton (ld. 5.2.2.4 fejezet). A kvantitatív valós-idejű PCR-hez a primereket 10 µM-ra hígítottuk páronként egy csőbe. A lemez (4titude Framestar® 480/384 with qPCR Adhesive Seal, Nucleotest BIO) egy-egy lyuka 8 µl reakcióelegyet tartalmazott: 5 µl Master Mixet (2x qPCRBIO SyGreen Mix Lo-ROX, Nucleotest BIO), 1 µl primer mixet (forward és reverz primer) és 2 µl NFW-t. Ehhez a 8 µl reakcióelegyhez adtunk hozzá 2 µl 10 ng/µl koncentrációjú cDNS oldatot. A méréseket a Roche LightCycler® 480 II (Roche) műszerrel végeztük. Minden minta estében három technikai párhuzamossal dolgoztunk. Az adott gének amplikonjainak T_m (olvadási hőmérséklet) és C_p értékeit (küszöb ciklus) a gép saját szoftvere határozta meg (LC480 1.5.0.39 szoftver). Az adatok normalizálását az *ACT1* génnel végeztük el. Voltak kísérletek arra nézve, hogy egynél több normalizáló gént is használjunk, de az általunk tesztelt *HPT1* és *HSP70* nem felelt meg a kritériumoknak, ugyanis az oxidatív kezelés szignifikánsan megváltoztatta a két génre vonatkozó nyers C_p értékeket (8. Függelék).

5.2.5 Bioinformatikai módszerek

5.2.5.1 Általános statisztikai számítások

A biofilm adatok, növekedési értékek, kolónia számok, vitalitás és életképesség eredményei, enzimaktivitások, valamint a glutation koncentrációk mindegyike három vagy több független kísérlet adataiból számolt átlagok $\pm$ SD értékek. A szignifikanciát Student-féle kétoldalú kétmintás t-tesztel számoltuk: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$ (R core team, 2014). A biofilm képződés vizsgálatánál a Student-féle kétoldalú kétmintás t-teszt helyett a Welch tesztet használtuk azokban az esetekben, amikor a varianciák nem voltak azonosak.

5.2.5.2 Proteomikai adatok elemzése

A fehérjék azonosításának menetét már az 5.2.3.2 és az 5.2.3.5 fejezetben ismertettem. Az intenzitásarány változásokat (KO/WT) és p értékeket a Delta2D szoftver generálta a Student-féle t-teszt segítségével. Az intenzitás változás értékeket pozitív és negatív számokban adta meg a szoftver annak függvényében, hogy az adott változás 1-nél nagyobb vagy kisebb

intenzitásarányokat jelentett. Az 1-nél kisebb értékeknek a reciprokát vette és negatív előjellel látta el, míg az egynél nagyobb számok változatlanok maradtak. A 2D gélek kiértékelésénél csak azokat a normalizált fehérje foltokat választottuk ki további analízisre, amelyek szignifikáns ($p < 0,05$) változást mutattak. Az eredmények az alábbi linken érhetők el: <https://figshare.com/account/home#/projects/23773>. Emellett potenciális foszforilációs helyeket kerestünk a gomba fehérjékben a Motif scan (http://scansite.mit.edu/motifscan_seq.phtml) programmal, magas és közepes szigorúsági fok mellett (Obenauer és mtsai., 2003). Továbbá megnéztük a *C. albicans* fehérjék *S. cerevisiae* ortológjai közötti kapcsolatokat/interakciókat a String v11.0 szoftverrel (<https://string-db.org>), alapbeállítások mellett közepes szigorúsági fokkal (Szklarczyk és mtsai., 2017).

5.2.5.3 Transzkriptomikai adatok elemzése

Az RNS szekvenálás nyers adataiból normalizálást követően $\log_2FC$ („fold change”) értékeket számoltunk. A szignifikancia megadásához az ANOVA tesztet alkalmaztuk, amelyet Tukey post hoc tesztel és Benjamini-Hochberg FDR (False Discovery Rate) tesztel kombináltunk (www.strand-ngs.com). Utóbbit a többszörös összehasonlításból eredő torzulás korrekciójára alkalmaztuk. A klaszterezést és a PCA analízist szintén a StrandNGS szoftverrel készítettük. Elemzésünk során csak azokat a szignifikáns adatokat vettük figyelembe, amelyek jelentős változást mutattak, azaz a $\log_2FC$ abszolút értéke meghaladta az 1-et. A hő térképek (heat map) készítéséhez a Cluster v3.0 és a Java TreeView v1.1.6r4 nyílt forráskódú applikációkat használtuk. Az adatokat ezt követően GO term analízisnek vetettük alá (www.candidagenome.org/cgi-bin/GO/goTermFinder). A gének ontológiai vizsgálata során külön vizsgáltuk a felül- és alulszabályozott géneket háromféle megközelítésben (funkció, folyamat, lokalizáció). Csak azokat a géndúsulásokat vettük értékelhetőnek, amelyek korrigált p értéke kisebb volt, mint 0,05.

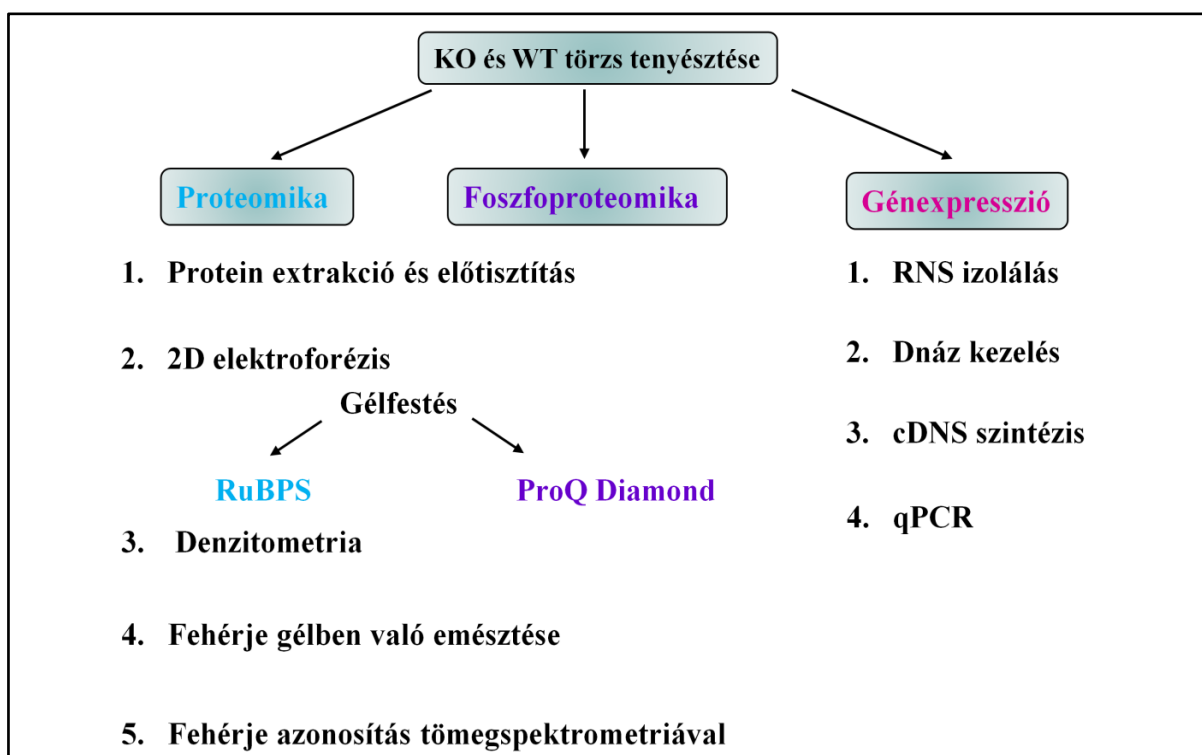
A gének relatív expresszióját a vizsgált mintákban a $\Delta\Delta CP$ módszerrel határoztuk meg. Az öt független kísérlet eredményeit átlagoltuk és kiszámítottuk a szórásukat. A 13. Függelékben található expressziós adatok p értékeit ANOVA tesztel állapítottuk meg, amit Tukey post hoc tesztel kombináltunk (www.strand-ngs.com). Erre azért volt szükség, hogy összevethetőek legyenek az adatok az RNA-Seq eredményével. A 13. Függelékben található korrelációs értékeket a Pearson-féle korrelációs koefficiens kiszámításával adtuk meg (R Core Team, 2014). Ezzel szemben a 20-24. ábra, valamint a 26. ábra adatainak esetében kétszélű Student-féle t -eloszlást alkalmazva adtuk meg a p értékeket. Néhány esetben ezek a p értékek nem

egyeztek meg a 13. *Függelék* p értékeivel, ezért akkor tekintettünk egy génexpressziós változást biztos adatnak, ha mindkét számolással szignifikáns értéket kaptunk. A különbségek abból adódhattak, hogy az ábrákon az egyszerű „fold change” értékeket ábrázoltuk lineáris skálán, és ahogy említettem, más volt a statisztikai analízis.

6. Eredmények

6.1 A CaPpz1 foszfatáz funkciójának felderítése proteomikai és foszfoproteomikai vizsgálatokkal

A proteomikai és foszfoproteomikai vizsgálatok során a *CaPPZ1* gén kiütésének funkcionális következményeit vizsgáltuk. Ehhez *cappz1* deléciós mutáns (KO) és a megfelelő genetikai háttérrel rendelkező kontroll (WT) törzsekből származó mintákat hasonlítottunk össze. Célunk azoknak az adaptációs mechanizmusoknak a feltárása volt, amelyek a foszfatáz hiányát képesek kompenzálni, ezért a sejteket akkor gyűjtöttük össze, amikor a KO minta fényszórása elérte az $OD_{640}=0,8$ értéket (2. Függelék). Ez hozzávetőlegesen 6-6,5 órás tenyésztési időt jelentett. Kutatási stratégiánkat az 10. ábra szemlélteti. A kísérletek során kétdimenziós elektroforézissel elválasztott KO és WT fehérje mintákat festettünk meg egy általános fehérje (RuBPS) és egy foszfoprotein specifikus (ProQ Diamond) festékkel (Gauci és mtsai., 2011). Ezáltal láthatóvá vált a teljes proteom, valamint a foszfofehérjék csoportja.



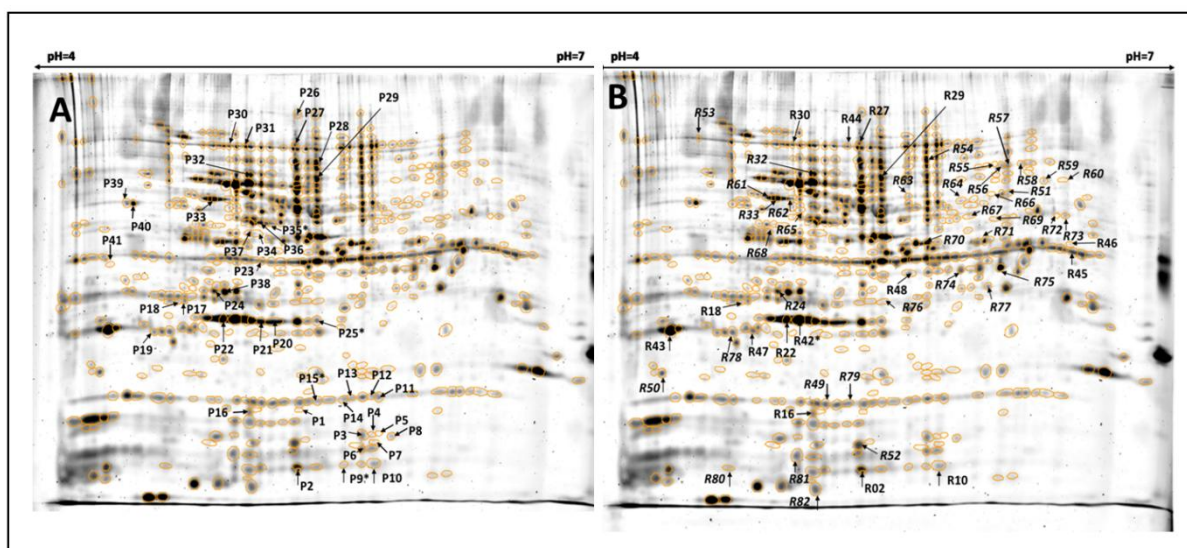
10. ábra A proteomikai és foszfoproteomikai vizsgálatok sémája

Vizsgálataink során a KO és a WT törzset hasonlítottuk össze fehérje, foszfofehérje és gén szinten. Számozással jelöltem az egymást követő lépéseket. A foszfoproteomika és proteomika lépései csak a festés típusában különböztek egymástól.

Ezt követően a kiválasztott foltokban lévő fehérjéket tömegspektrometriával azonosítottuk. Emellett megvizsgáltuk a fehérjekódoló gének relatív expresszióját is annak érdekében, hogy tisztázzuk a transzkripció szerepét a proteomikai változásokban.

6.1.1 A CaPPZ1 gén deléciójának hatása a fehérje foszforilációra

A foszfoproteineket ProQ Diamond festéssel tettük láthatóvá a 2D géleken. A gélek szkennelését követően a foltokat Delta2D szoftver segítségével analizáltuk. A WT csoportot 3 gélkép fúziójával hoztuk létre, míg a KO csoport szintén 3 gélkép egyesítéséből jött létre. A csoportokból származó 3 gél egymásra helyezése adta az egyesített ún. „fused image” képeket (11A. ábra), amelyeken összesen 473 foltot detektáltunk. A WT törzshöz képest a KO mintában lévő szignifikáns változást mutató foltokat megszámoztuk és az ábrán P betűvel jelöltük.

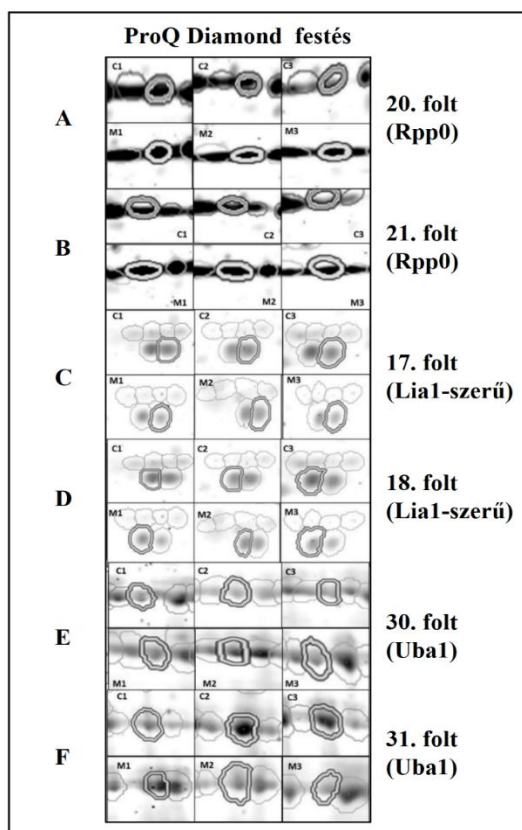


11. ábra A ProQ Diamond (A), valamint A RuBPS (B) felhasználásával festett gélek egyesített képe

A nyilak mutatják a KO törzsben a WT törzshöz képest szignifikánsan megváltozott normalizált foltterfogatú fehérjefoltokat. A folt ID előtt található R (RuBPS festés) és P (ProQ Diamond festés) betűk adják meg a festési eljárást, a * jelölés pedig azokat a foltokat mutatja, amelyekben egynél több fehérjét is azonosítottunk. A félreértés elkerülése végett az azonos fehérjét mutató foltokat azonos számmal láttuk el mindkét gélen.

Fontos megjegyezni, hogy az azonos napokon készített WT és KO mintákból egy kevert csoportot is készítettünk. A kevert csoportok gélképeit szintén egymásra helyeztük az analízis során, és a későbbiekben ezekből a gélekből vágtuk ki a szignifikáns változást mutató foltokat.

A 11A. ábrán 41 folt esetében detektáltunk szignifikáns ($p < 0,05$) változást a WT és KO minták között. Ezeket a foltokat kivágtuk a kevert gélekről és fehérje tartalmukat LC-MS/MS alapján azonosítottuk. 27 fehérje foltban találtunk egyértelműen azonosítható peptid szekvenciát/szekvenciákat. A legtöbb alkalommal egy foltban egyetlen *C. albicans* fehérjét azonosítottunk, viszont 4 fehérje foltban (P9, P15, P25 és P35) 2 vagy több fehérjéből származó polipeptid is jelen volt. Az utóbbiakat kizártuk a további analízisekből, mivel nem volt egyértelmű, melyik fehérje okozta a megfigyelt változást. A 12. ábra mutatja be azon fehérjék elemzését, amelyek két különálló foltban is előfordultak.



12. ábra A különálló foltokban található fehérjék azonosítása és mennyiségük meghatározása 3-3 párhuzamos minta denzitometráálásával

A WT minta foltjait C1-3, míg a KO mintához tartozó foltokat M1-3 jelzéssel láttuk el a festéseket követően. A jobb oldalon zárójelben tüntettük fel a foltokban azonosított fehérjék nevét.

Mindkét festést követően a géleket beszkeneltük és a 3 független mintából készült képen azonosítottuk a foltokat. Az azonos fehérjéket tartalmazó foltokat a 3 szkennelt képen egymás mellé helyeztük és denzitometráltuk, majd megadtuk a KO/WT arányokat. Kimutattuk, hogy az Rpp0 foszforilációja növekedett a 20. és 21. foltban is (12A-B. ábra), míg a Lia1-szerű fehérje foszforilációja mindkét foltban (17. és 18.) csökkent (12C-D. ábra). Végezetül az Uba1 fehérje foszforilációs szintje nőtt a 30. foltban, de csökkent a 31. foltban (12E-F. ábra).

A fenti példákban közös, hogy az azonos fehérjét tartalmazó foltok között pI eltolódás figyelhető meg, ami a fehérjék különböző poszttranszlációs módosítására utal. Ennek megfelelően az említett három fehérje foszforilációját külön-külön tanulmányoztuk az egyes foltokban. A tömegspektrometriával azonosított foszfofehérjék nevét, illetve a foszfatáz deléció hatására bekövetkezett ProQ Diamond festés intenzitás-változásait az 5. táblázat bal oldala foglalja össze.

6.1.2 CaPPZ1 gén deléciójának hatása a fehérje mennyiségre

A *CaPPZ1* gén deléciója által okozott fehérjemennyiség változásokat RuBPS festéssel vizsgáltuk. Ez a festék a poszttranszlációs változásoktól függetlenül festi meg az összes fehérjét. Ebben az esetben is egyesítettük a 3 WT és 3 KO minták gélképeit, amelyeken összesen 519 foltot azonosítottunk. Az egyes foltokat megszámoztuk, és R betűvel jelöltük (11B. ábra). Ügyeltünk arra, hogy az előző kísérletben megjelölt foszfofehérjék (P sorozat) és az ezeknek megfelelő, RuBPS festéssel kimutatott foltok (R sorozat) azonos számot kapjanak. Összesen 52 folt esetében mondhattuk el, hogy szignifikáns festési intenzitás-változás következett be a KO mintában a kontrollhoz képest (11B. ábra). Ezek közül a több mint 1,5-szeres „fold change” értéket mutató foltokat (20 db) kivágtuk a gélről és a bennük lévő fehérjéket tömegspektrometriai analízissel azonosítottuk. Összesen 15 foltot sikerült jellemezni, amiből 13-ban egy-egy különálló protein volt, míg az R27-es és R44-es folt egyaránt a Cef3 elongációs faktort tartalmazta. Tehát 14 fehérje sejten belüli mennyisége mutatott jelentős, több mint 1,5-szeres, változást a KO törzsben. Természetesen az adatok egyértelmű értelmezése érdekében megvizsgáltuk az összes 6.1.1 fejezetben leírt foszfofehérjét tartalmazó folt fehérje tartalmát is. A több foltban előforduló fehérjék közül a Lia1-szerű fehérje mennyisége csökkent, míg az Uba1 fehérje mennyisége megnőtt a foszfatáz hiányában, habár mindkét esetben csak az egyik foltban volt szignifikáns a változás. Proteomikai eredményeinket az 5. táblázat jobb oldalán mutatjuk be.

6.1.3 A foszfoproteomikai és proteomikai vizsgálatok együttes kiértékelése

A foszfoproteomikai és proteomikai vizsgálatok eredményét, vagyis a 25 azonosított fehérje foszforilációs és mennyiségi változásait az 5. táblázatban foglaltam össze.

5. táblázat A fehérjék foszforilációjának és mennyiségének változása a *CaPPZ1* gén deléciónak következtében.

Fehérje ¹	falt ID	ProQ Diamond festés		RuBPS festés	
		arány	p érték	arány	p érték
1. csoport					
Ade12	46	n.d.	-	2,60	0,045
Bmh1	47	n.d.	-	-1,97	0,006
Efb1	43	n.d.	-	-2,37	0,002
Idh1	45	n.d.	-	2,76	0,017
Ure2	48	n.d.	-	1,95	0,0004
2. csoport					
Cef3*	44	n.d.	-	-7,08	0,004
	27	-2,38	0,008	-3,63	0,020
Cpr3	02	-2,59	0,018	-2,20	0,006
Hsp70/Ssa1	32	-3,32	0,024	-1,52	0,042
Rpl20B	10	-4,81	0,019	-2,21	0,021
Tkl1	29	1,78	0,045	1,84	0,012
Tsa1	16	-2,18	0,028	-2,23	0,002
Yst1	22	-2,79	0,041	-2,35	0,042
3. csoport					
Aip2	34	-2,05	0,026	-1,25	0,506
Cyp5	07	-2,02	0,0003	-2,62	0,085
Dug1-szerű	36	1,37	0,008	-1,25	0,506
Eft2	28	2,79	0,008	-1,11	0,695
Guk1	03	-4,57	0,003	-1,84	0,130
Ham1	01	-2,79	0,034	1,34	0,463
Rad23	39	1,95	0,006	-1,24	0,372
Rpl9B	13	-3,23	0,049	-1,69	0,191
Rpp0*	20	2,56	0,046	1,74	0,149
	21	2,63	0,005	-1,08	0,824
Rps7A	04	-2,58	0,047	-4,98	0,123
Tif1	23	-2,05	0,014	1,09	0,765
4. csoport					
Lia1-szerű*	17	-3,09	0,019	-1,06	0,753
	18	-2,32	0,008	-1,59	0,019
Uba1*	30	1,90	0,006	1,59	0,029
	31	-2,31	0,037	1,21	0,558

A táblázatban a KO/WT intenzitásarány értékek olvashatóak a hozzájuk tartozó p értékekkel. A változások mértékét pozitív és negatív számok jelzik. A pozitív számok az 1-nél nagyobb intenzitásarányokat jelzik, míg az 1-nél kisebb számoknak a reciprokát vettük, és negatív előjellel láttuk el. A p értékeket Student-féle t-tesztel határoztuk meg. A szignifikáns ($p < 0,05$) változásokat félkövér betűtípussal emeltük ki. ¹A fehérjék nevét az UniProt adatbázis (www.uniprot.org/) alapján adtuk meg. A *-gal jelölt fehérjéket két különböző feltételben is azonosítottuk (12. ábra). n.d.: nem detektálható festődés.

Az általunk azonosított fehérjéket 4 csoportra osztottuk. Az első csoportba tartoznak azok, amelyeknek nincs foszforilált alakjuk, ezeknél a fehérjéknél ugyanis nem detektáltunk ProQ Diamond festést. Ezzel szemben az Ade12, Idh1 és Ure2 protein mennyisége nőtt a KO törzsben, míg a Bmh1 és az Efb1 szintje csökkent a foszfatáz hiányában. A második csoportba kerültek azok a fehérjék, amelyek foszfofehérje és fehérje mennyisége is megváltozott a foszfatáz hiányos törzsben. Itt elmondható, hogy a Tkl1 kivételével mindegyik esetben a fehérje és foszfofehérje szintje lecsökkent a *CaPPZ1* delécio következtében a WT törzshöz képest. Miután a foszfofehérje és a fehérje mennyiség változása körülbelül megegyezett, az eredmények alapján csak a fehérje szintje változik meg a mutánsban a foszforiláció mértéke gyakorlatilag változatlan marad. A harmadik csoport tartalmazza azt a 11 foszfofehérjét, amelyeknek a mennyisége nem változott szignifikánsan, de a foszforilációs szintjük igen. Összesen 4 fehérje (Dug1-szerű, Eft2, Rad23 és Rpp0) esetében növekedett meg a foszforilációs szint, míg a maradék 7 protein esetében csökkent a foszforiláció a *CaPPZ1* delécio következtében. Az Rpp0-t két foltban (20. és 21.) is azonosítottuk. A peptidil-prolil cisz-transz izomeráznak két különböző izoenzimjét is azonosítottuk (Cpr3 és Cyp5), ezek a 2. és 3. csoportba kerültek. Az utolsó, vagyis negyedik csoportban két fehérje található, amelyeket két különböző foltban is kimutattunk. A Lia1-szerű protein foszforilációja csökkent mindkét foltban. Az ubikvitin-aktiváló enzim egyes alegysége (Uba1) esetében már nem volt ilyen egyszerű a helyzet, mert a KO mintában a foszfoprotein specifikus festés intenzívebb volt az egyik foltban (P30), mint a másikban (P31). Lehetséges, hogy ezek a fehérjefoltok az enzim hiperfoszforilált és alulfoszforilált formáit reprezentálják, amit bizonyít a két folt közötti pI eltolódás is (11A. ábra). Végezetül a két fehérje közül a Lia1-szerű fehérje mennyisége csökkent, míg az Uba 1 fehérje mennyisége megnőtt a foszfatáz hiányában, habár mindkét esetben csak az egyik foltban azonosított protein esetében volt szignifikáns a változás.

Összességében elmondhatjuk, hogy a 29 fehérje foltból 25-ben egyéni fehérjét sikerült azonosítottunk, vagyis 4 fehérjét két foltban is megtaláltunk. A 25 fehérjéből 20 fehérje foszforilációja szignifikánsan megváltozott a *CaPpz1* foszfatáz hiányában. Meg kell említeni, hogy 5 fehérje (Rpp0, Dug1-szerű, Eft2, Rad23 és Tkl1) esetében erős növekedést figyeltünk meg a foszforilációs szintben, ami várható volt a KO törzsben. További 14 fehérje esetében csökkent festékvételt tapasztaltunk, amely lehetett akár a foszfatáz közvetett hatása. A fehérje mennyiségét illetően a 25 azonosított fehérjéből 5 esetben detektáltunk szignifikáns mennyiség növekedést, míg 9 fehérje esetében szignifikáns mennyiség csökkenést (5. táblázat).

Tudni szeretnénk volna, hogy ezek a változások miből adódnak, ezért megvizsgáltuk a fehérjét kódoló gének expresszióját a KO és WT törzsben egyaránt (6. táblázat).

6. táblázat A fehérjéket kódoló gének expressziójának változása *CaPPZ1* gén deléciójának hatására.

Fehérje ¹	Gén név ²	Gén ID ²	Génexpresszió	
			arány	p érték
Ade12	<i>ADE12</i>	C1_09640W	1,09	0,82
Bmh1	<i>BMH1</i>	C1_03220C	-1,07	0,44
Efb1	<i>EFB1</i>	C4_04480C	1,38	0,33
Idh1	<i>IDH1</i>	C1_09630W	-1,02	0,95
Ure2	<i>URE2</i>	C2_04710C	-1,28	0,36
Cef3*	<i>CEF3</i>	C5_01580C	1,43	0,01
Cpr3	<i>CPR3</i>	C2_02320C	1,05	0,36
Hsp70/Ssa1	<i>HSP70</i>	C1_13480W	1,17	0,59
Rpl20B	<i>RPL20B</i>	C4_01520C	1,50	0,10
Tkl1	<i>TKL1</i>	C1_08320W	-1,19	0,44
Tsa1	<i>TSA1</i>	C3_06180C	1,14	0,23
Yst1	<i>YST1</i>	C3_05370C	1,79	0,06
Aip2	<i>AIP2</i>	C3_03040W	1,67	0,18
Cyp5	<i>CYP5</i>	C3_06360C	1,61	0,15
Dug1-szerű	-	C5_04300C	1,13	0,29
Eft2	<i>EFT2</i>	C2_03100W	1,10	0,63
Guk1	<i>GUK1</i>	C5_03790W	1,87	0,05
Ham1	<i>HAM1</i>	C5_03860W	1,17	0,49
Rad23	<i>RAD23</i>	C2_01850W	-1,26	0,17
Rpl9B	<i>RPL9B</i>	C3_02470C	1,32	0,10
Rpp0	<i>RPP0</i>	C7_00990W	1,20	0,67
Rps7A	<i>RPS7A</i>	C3_01490W	1,22	0,03
Tif1	<i>TIF1</i>	C1_01350C	1,44	0,16
Lia1-szerű	-	C2_07290W	1,54	0,10
Uba1	<i>UBA1</i>	C3_06500W	1,03	0,98

A táblázatban a KO/WT intenzitás arány értékek olvashatóak a hozzájuk tartozó p értékekkel. Az eredményeket az 5. táblázatban leírtak szerint adtuk meg. A fehérjék és a gének neveit, valamint a gének azonosító kódját (ID) a ¹www.uniprot.org és a ²www.candidagenome.org adatbázisok alapján adtuk meg.

Az RT-qPCR kísérletek azt mutatták, hogy két kivételtől (*CEF3*, *RPS7A*) eltekintve nem történt szignifikáns génexpressziós változás a KO törzsben a kontrollhoz képest, ezért

elmondhatjuk, hogy a fehérje mennyiségében bekövetkező változások nem magyarázhatók a génexpresszió változásával.

6.1.4 A CaPPZ1 gén deléciójának hatása a biofilm képzésre

Elvégeztük az 5. táblázatban bemutatott 25 fehérjét kódoló gén ontológiai elemzését funkció, lokalizáció és biológiai folyamatokban való részvétel szerint. Azt találtuk, hogy az általunk vizsgált fehérjék nagy része szerepet játszik a transzlációban és a biofilm képzésben (7. táblázat).

7. táblázat Az általunk azonosított fehérjéket kódoló gének ontológiai analízise

GO ID	GO term	Gének száma	Klaszter gyakoriság (%)	p érték
TRANSLÁCIÓ				
19538	Fehérje anyagcsere	15	60	0,0003
5840	Riboszóma	8	32	1,56e-05
3735	Riboszóma szerkezeti elemek	5	20	0,0220
6414	Transzláció elongáció	4	16	0,0005
SEJTFELSZÍN				
9986	Sejtfelszín	10	40	1,46e-07
62039	Biofilm mátrix	6	24	1,33e-05

A GO term analízist a Candida Genom adatbázis GO Term Finder (<http://www.candidagenome.org/cgi-bin/GO/goTermFinder>) nevű programjával végeztük. Minden terminushoz tartozott egy azonosító szám (GO ID) és egy név (GO term).

A gének transzlációban való szerepét bizonyítja a 7. táblázatban felsorolt 4 terminus, név szerint a fehérje anyagcsere, riboszóma, riboszóma szerkezeti elemek és a transzláció elongáció. A CaPpz1 transzlációban való részvételére már van fellelhető irodalom, ezért nem erre fókuszáltunk a továbbiakban (Aksenova és mtsai., 2007). A PPZ1 biofilm képzésben betöltött szerepére a sejtfelszínhez kapcsolódó két terminus utal, vagyis a sejtfelszín és a biofilm mátrix. Mivel a CaPpz1 biofilm képzésben való közreműködése eddig ismeretlen volt, úgy döntöttünk, megvizsgáljuk, mennyiben különbözik a KO törzs biofilm képzése a WT törzsétől. Elsőként RPMI-1640 médiumot használtunk, amely lehetővé teszi az egyenletes filamentum képződést. Vizsgáltuk a biofilm által képzett száraz biomassa tömeget, valamint a biofilm tömegének arányát a teljes biomassa tömegéhez képest. Azt találtuk, hogy ebben a tápoldatban mindkét törzs erős biofilm képződést mutatott kicsi planktonikus sejtszám mellett. A totál száraz biomassa tömeg a mutáns sejteknél (KO) viszont magasabb volt, habár a WT törzs biofilm/teljes biomassa aránya csak kissé haladta meg a KO törzsét (8.

táblázat). Ez nem volt elég meggyőző, ezért kristályibolya (CV) festéssel is vizsgáltuk a törzsek biofilm képzését (8. táblázat), de a vizsgált törzsek ebben a tesztben sem mutattak lényeges változást egymáshoz képest.

8. táblázat A *CaPPZ1* gén deléciójának hatása a biofilm képzésre

Tápoldat	Biomassza tömeg (mg)				Biofilm/Totál Biomassza arány				CV festés (OD ₅₉₅)			
	RPMI-1640		Spider tápoldat		RPMI-1640		Spider tápoldat		RPMI-1640		Spider tápoldat	
Törzs	WT	KO	WT	KO	WT	KO	WT	KO	WT	KO	WT	KO
Átlag	6,30	7,60	0,30	1,20	0,97	0,94	0,12	0,24	0,25	0,23	0,06	0,14
Szórás	1,39	1,80	0,23	0,52	0,04	0,05	0,09	0,15	0,04	0,03	0,02	0,04
Szignifikancia	p <0,001		p <0,001		p =0,042		p <0,001		p =0,071		p <0,001	

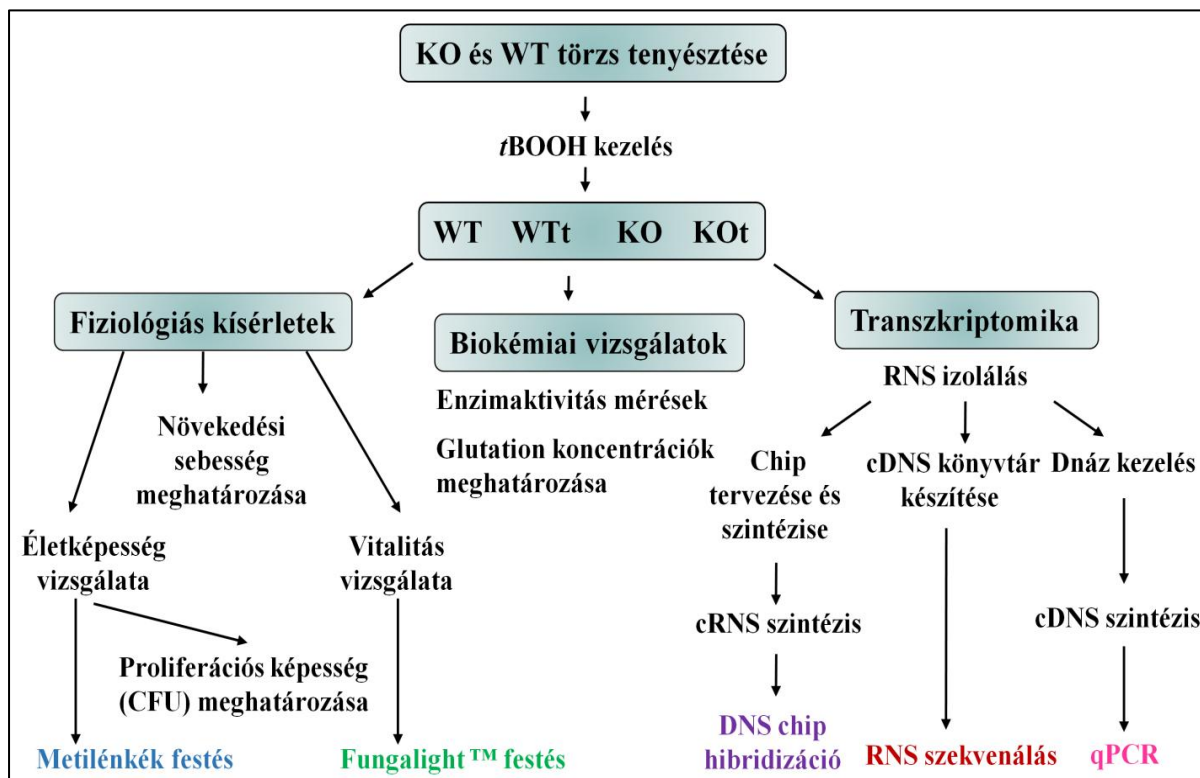
A táblázatban a WT és KO törzsek közötti különbségek láthatóak 3-féle megközelítésben. 3 biológiai párhuzamos minta adatait mutatjuk be, kísérleti összeállításonként 36 technikai párhuzamos mérést végeztünk. Student-féle 2 mintás t- próbával vagy Welch teszttel adtuk meg a p értékeket. Welch tesztet akkor alkalmaztunk, amikor a varianciák nem voltak azonosak.

Ezért kísérleteinket megismételtük a sokkal szelektívebb Spider médiumban, amely elfogadott tápoldatnak számít a biofilm kísérletekben (Nobile és mtsai., 2012). Ebben a tápoldatban mindkét törzs alacsonyabb biofilm képződést mutatott. Szemben az RPMI-1640 médiummal kapott eredményekkel, a KO törzs száraz biomassza tömege sokkal jelentősebb volt a WT száraz biofilm tömegéhez képest, ugyanis közel 4-szeres növekedést figyeltünk meg a mutáns törzsben. A KO sejtek jobb biofilmképző képességét sikerült alátámasztani a biofilm/totál biomassza arány vizsgálatával, valamint a CV festéssel is (8. táblázat), ugyanis a KO sejtek biofilm mennyisége 2-szer annyi volt a totál biomasszában, mint a WT törzsnek. Megvizsgáltuk a biofilm képződést fáziskontraszt mikroszkóp alatt is, ami igazolta mindkét törzs biofilm képzését, valamint megmutatta, hogy az RPMI-1640 médiumban a hifa képződés sokkal intenzívebb volt, mint a Spider médiumban, ahol sokkal több élesztősejtet láthattunk. Az ábrák értékeléséből levonható, hogy a KO sejtek hifázóképessége alacsonyabb, több volt az élesztősejt a Spider médiumban, amelyek jobban összetömörülnek, és ezáltal erősebb biofilmet képeznek (10. Függelék).

Eredményeinket összefoglalva elmondhatjuk, hogy a proteomikai munkánkkal sikerült alátámasztani a CaPpz1 fehérje transzlációban korábban már leírt funkcióját (Aksenova és mtsai., 2007), valamint új eredményként sikerült kimutatnunk a gomba specifikus foszfatáz szerepét a biofilm képzésben.

6.2 A CaPpz1 foszfatáz funkciójának felderítése transzkriptom analízissel

A transzkriptomikai vizsgálatok során a *CaPPZ1* géndelécio, valamint az oxidatív stressz együttes hatását vizsgáltuk KO sejtekben a WT törzshöz képest. Az előző fejezetben a KO sejtek adaptációját tanulmányoztuk, amint a foszfatáz hiányát anyagcseréjük módosításával kompenzálták. Ezzel szemben itt egy rövidtávú kezelést alkalmazva vizsgáltuk a sejtek oxidatív stresszre adott gyors válaszát. A stressz hatást 1 órás *tBOOH* kezeléssel váltottunk ki. Célunk egy viszonylag gyenge stressz alkalmazása volt. Ennek ellenőrzésére először megvizsgáltuk a *Candida* sejtek fiziológiáját normál és oxidatív stressz körülmények között. Biokémiai vizsgálatokkal ellenőriztünk több oxidatív enzimaktivitást és meghatároztuk a sejten belüli glutation koncentrációkat. Több módszerrel is alátámasztottuk, hogy az oxidatív kísérleti körülmények nem okoznak drasztikus változásokat ezért alkalmasak a mutáció és az oxidatív stressz együttes vizsgálatára. A transzkriptomikai vizsgálatok megvalósíthatóságát egy DNS chip előkísérlettel igazoltuk, majd RNS szekvenálással hasonlítottuk össze a kezelt (WTt, KOt) és kezeletlen sejteket (WT, KO). Az RNS szekvenálással kapott eredményeinket RT-qPCR segítségével erősítettük meg. A kutatási stratégiánk a 13. ábrán látható.

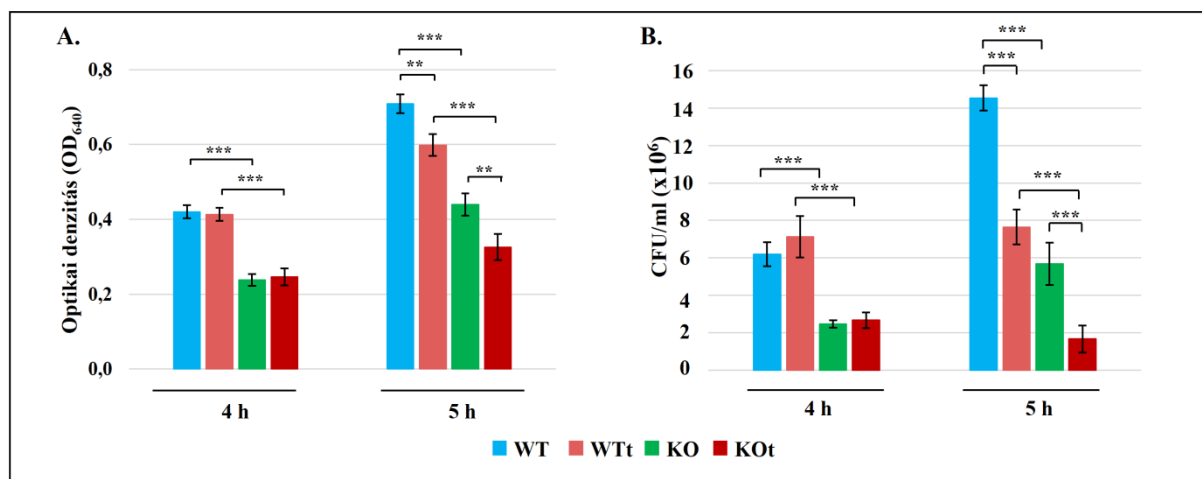


13. ábra A fiziológiai és transzkriptomikai vizsgálatok sémája

Elsőként megvizsgáltuk a foszfatáz hiánya és az oxidatív stressz okozta fiziológiai hatást a WT, WTt, KO és KOt törzsekre. Ezt követték a biokémiai vizsgálatok, végül egy DNS chip előkísérlet, majd az RNS szekvenálás és az eredmények megerősítése RT-qPCR-rel.

6.2.1 A *CaPpz1* hiánya és az oxidatív stressz fiziológiai hatásai

A *CaPPZ1* gén deléciója (Ádám és mtsai., 2012 és Nagy és mtsai., 2014) illetve a *tBOOH* kezelés (Leiter és mtsai., 2012) okozta fiziológiás változásokat korábban már publikáltuk, azonban ezekben a cikkekben a QMY23 törzset (WT) még nem vizsgáltuk. Mivel a QMY23 genetikai háttere azonos a *cappz1* knock out törzsével (KO), alkalmasabb a kutatásra, mint a korábban használt SN87 szülői törzs. Ennek az áll a háttérében, hogy a QMY23 törzs ugyanazokat a markereket (LEU2, HIS1) hordozza, mint a KO törzs, így kizárhatjuk annak a lehetőségét, hogy a változásokat a marker gének okozzák a KO törzsben. A törzsek genotípusát PCR segítségével minden kísérlet előtt ellenőriztük (5. Függelék). A korábbi vizsgálatok alapján a *tBOOH*-t 0,4 mM végkoncentrációban adtuk a sejtekhez, mivel ebben a koncentrációban a *tBOOH* csak kis mértékben csökkentette a sejtek növekedési rátáját (Leiter és mtsai., 2012). A kezelés optimális időtartamát egy előkísérlet sorozatban határoztuk meg (3. Függelék), és a 4 órás előtenyésztést követő 1 órán át végzett *tBOOH* kezelést találtuk optimálisnak. Ebben a megközelítésben célunk a stressz rövidtávú hatásának vizsgálata volt, vagyis azt szeretnénk volna kimutatni, hogy a gombasejtek milyen mechanizmusokkal próbálnak védekezni az oxidatív stressz ellen. Az oxidatív kezelés (4h vs. 5h tenyésztés) hatását a 14. ábrán láthatjuk.



14. ábra A *Candida* sejtek növekedésének és túlélésének vizsgálata normál és oxidatív stressz körülmények között

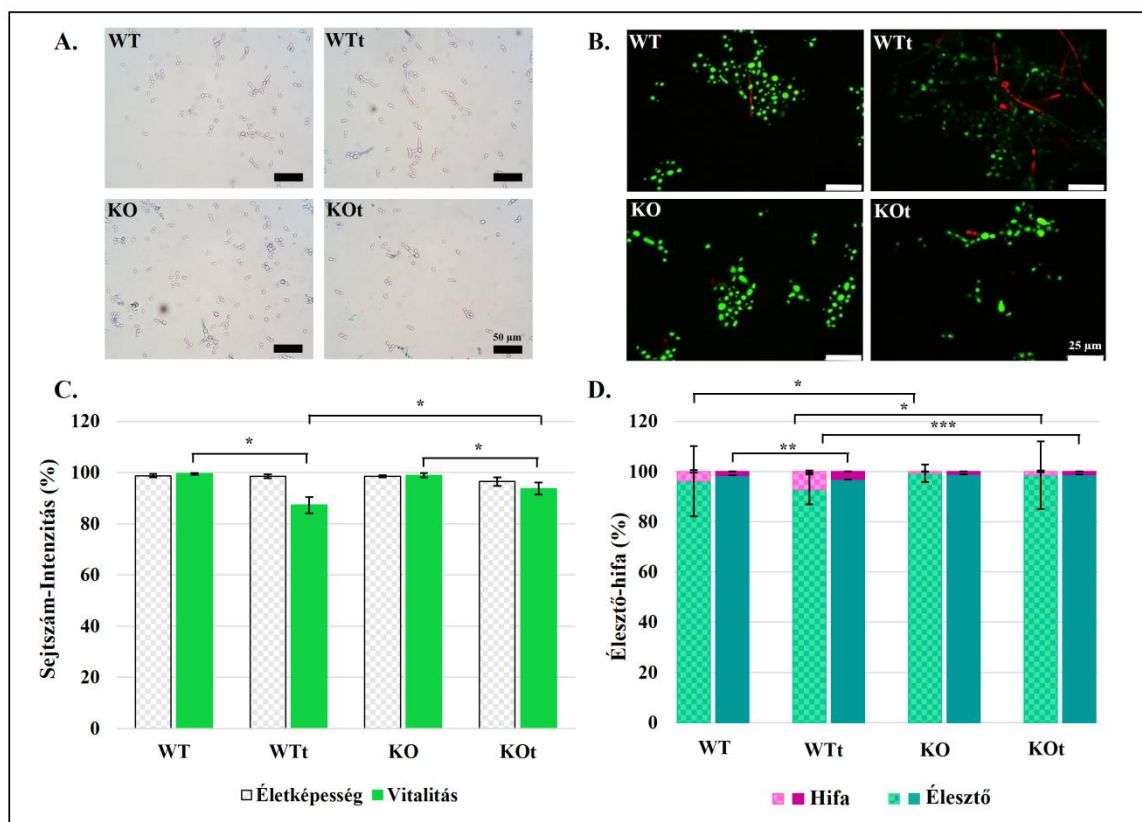
Az A. ábrarész az optikai densitás értékeket mutatja, melyet 640 nm-en mértünk (OD₆₄₀), míg a B. ábrarész kolóniaképző egység/ml (CFU/ml) egységben szemlélteti a sejtek túlélését. A minták feléhez a tenyésztés 4. órájában adtuk hozzá a *tBOOH*-t, majd az 5. órában gyűjtöttük össze a sejteket a mérésekhez. A diagramok 4 biológiai párhuzamos minta átlagát $\pm$ SD értékét mutatják. Az eltérések szignifikanciáját Student-féle t-próbával számoltuk: * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$.

A sejtek növekedését normál és oxidatív stressz körülmények között vizsgáltuk a tenyésztés 4. és az 5. órájában vett mintákban; egyrészt az optikai denzitás mérésével, ami a sejtek növekedési rátáját mutatja, másrészt a kolóniaképző egység meghatározásával, ami a sejtek túlélését reprezentálja. Az irodalmi adatokkal összhangban, normál körülmények között a KO törzs lassabban nőtt, mint a WT (Ádám és mtsai., 2012 és Nagy és mtsai., 2014), és a tBOOH kezelés mindkét törzs növekedését csökkentette (Leiter és mtsai., 2012) (14A. *ábra*). A CFU meghatározás szerint a foszfatáz hiányának és az oxidatív kezelésnek markánsabb hatása volt. A KO sejtek kolóniaformáló képessége eleve kisebb volt a WT sejtekhez képest, és a tBOOH kezelés mindkét törzs túlélését drasztikusan csökkentette (14B. *ábra*). Ki kell emelni, hogy a foszfatáz hiánya és az oxidatív stressz együttesen (KOt) nagyobb hatást gyakorolt a sejtek növekedésre, valamint osztódási képességére, mint külön-külön (KO, WTt).

A sejtek túlélésének (CFU) vizsgálata során kapott eredmények arra sarkalltak minket, hogy megvizsgáljuk annak lehetőségét, hogy a tBOOH elpusztítja-e a sejteket. Ezért a kezelést követően különböző festési eljárásokkal ellenőriztük a sejtek életképességét és vitalitását. Metilénkék festés segítségével láthatóvá tettük az élő (fehér) és holt (kék) sejteket, amelyekről fáziskontraszt mikroszkópra rögzített MicroQ-W PRO kamera segítségével felvételeket készítettünk. A 3 független kísérlet mikroszkópos képeit ImageJ szoftveres elemzés segítségével dolgoztuk fel (kísérleti mintánként legalább 200 sejtet vizsgáltunk meg), amiből végül statisztikai elemzést készítettünk. Azt találtuk, hogy a kezelés nem befolyásolta szignifikánsan az élő és holt sejtek arányát (15A és C. *ábra*). A holt sejtek aránya egyik esetben sem érte el a 4 %-ot sem (15C. *ábra*). A növekedésnél megismert tendencia itt is érvényesült, vagyis a KOt sejtek mutattak nagyobb holt sejt arányt (3,52 %). A WT (1,28 %) WTt (1,48 %) és KO (1,48 %) mintákban a holt sejtek mennyisége egymáshoz képest sem változott számottevően.

A sejtek életerejének, azaz vitalitásának meghatározásához a zöld és a piros intenzitásokat vizsgáltuk ImageJ szoftver segítségével. A zöld szín a sejtek metabolikus aktivitását mutatja, ui. az intracelluláris észterázok úgy módosítják a CFDA-AM festék molekulát, hogy az detektálható zöld fluoreszcens jelet ad. Ezzel szemben a holt sejteket a piros szín reprezentálta, amit a PI festék DNS-hez való kötődése produkál. A kiértékelést 3 független biológia párhuzamos mintasorozattal végeztük, mintánként 5-5 mikroszkópos kép zöld és piros intenzitásainak %-os eloszlásait elemezve. Kiderült, hogy a WT és a KO törzsek között kezelés nélkül nincs különösebb eltérés, a sejtek 1-1,1 %-a volt holt (15B és C. *ábra*). Ehhez képest a kezelt KO törzs már növekedett piros intenzitást mutatott, ugyanis itt 6,3 % volt az

elpusztult sejtek aránya (15B és C. ábra). Végezetül a kezelt WT törzsben még ennél is több, 13 % volt a holt sejtek aránya az összsejt mennyiséghez képest (15B és C. ábra).



15. ábra A CaPpz1 hiánya és az oxidatív stressz fiziológiás hatása a *C. albicans*-ban

A.: Az ábrán egy-egy reprezentatív fáziskontraszt mikroszkópos képet láthatunk metilénkék festést követően. A halott sejtek membránintegritásukat elvesztve felvették a kék festéket, míg az élők festetlenek maradtak. A skála mérete 50 μ m.

B.: A gombasejtek életképességét FungaLight™ festéssel vizsgáltunk, amit egy-egy konfokális mikroszkópos kép segítségével mutatunk be. A zöld fluoreszcencia az életképes populációt mutatja, míg a holt sejtek pirosan festődtek. A skála mérete 25 μ m.

C.: A szürke kockás oszlopok mutatják a metilénkék festés után kapott nem festődő sejtek számát, míg a zöld oszlopok a FungaLight™ festéssel kapott zöld intenzitás értékeket. Az eredményeket százalékosan adtuk meg az összsejtszámhoz képest. Az ábrán 3 biológiai párhuzamos átlaga $\pm$ SD értékei láthatók.

D.: A morfológiai változásokat egyrészt mikroszkóppal (kockás oszlopok), másrészt áramlási citométerrel (sima oszlopok) vizsgáltuk. A türkiz és sötétzöld színek mutatják az élesztő sejteket, míg a rózsaszín és lila színek a hifákat. A szignifikancia jelölések csak az utóbbi oszlopokra vonatkoznak.

A C és D paneleken a szignifikanciát a Student-féle t-próbával számoltuk. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$

Ha alaposan megnézzük a FungaLight™ festéssel készült mikroszkópos képeket, látható, hogy legtöbb esetben a hifa formák vették fel a propidium-jodidot, tehát részben a morfológiai változás miatt nőtt meg a piros szín intenzitása a WT és WTt mintákban (15B. ábra). Korábban már leírtuk (Ádám és mtsai., 2012 és Nagy és mtsai., 2014), hogy a foszfatáz

mutációja gátolta hifa képződést. Ezért mikroszkópos és áramlási citometriai vizsgálatokkal tanulmányoztuk a *Candida* sejtek morfológiát. A 15. ábra D. része mutatja az élesztő-hifa arányokat. A morfológiai kiértékelésnél a metilénkék festéssel készített képeket használtuk fel. Az áramlási citometriás vizsgálatához FungaLight™ festékekkel festettük meg a sejteket és Novocyte 3000 citométerrel analizáltuk azokat (4. Függelék). Mindkét megközelítésünk azt mutatta, hogy normál körülmények között a WT sejteknek csak egy kis hányada (4 %) hifázott, de az oxidatív kezelés megnövelte ezt az arányt (7 %). Az irodalmi adatokkal összhangban, a CaPpz1 hiánya gátolta a hifa növekedését, ezért nem láttunk szignifikáns morfológiai változást sem a KO, sem a KOt mintában.

Tehát elmondható, hogy a 4 órás előtenyésztés utáni egy órás tBOOH kezelés csökkenti a sejtek növekedését (14A. ábra). A kezelés nem öli meg a *Candida* sejteket (15C. ábra) annak ellenére, hogy gátolja a proliferációjukat (14B. ábra) és kis mértékben csökkenti a sejtek metabolikus aktivitását (15C. ábra), valamint kismértékű hifa képződést indukált a WT gombában. Az oxidatív stressz kezelés fungicid hatása a foszfataz hiányában (KOt) különösen hatékonynak bizonyult. Ezek alapján megállapítottuk, hogy az általunk választott körülmények és törzsek felhasználhatók a tervezett transzkriptomikai analízisre, ugyanis a *Candida* sejtek nem veszítették el az életképességüket és az anyagcsere folyamataik valamint morfológiájuk csak kis mértékben változott meg a kezelés hatására.

Ahhoz, hogy lássuk, ez a szubletális oxidatív kezelés milyen stressz választ vált ki a gombában, meghatároztuk egyes antioxidáns enzimek aktivitását, illetve a glutation oxidációs állapotát normál és oxidatív stressz körülmények között. Korábban már leírtuk (Leiter és mtsai. 2012), hogy a CaPpz1 szerepet játszik az oxidatív stressz válaszban, de ennek enzimatisz vonatkozásait még nem vizsgáltuk. Azért, hogy a mutáció és a tBOOH kezelés hatását megismerjük, megvizsgáltuk a kataláz, szuperoxid dizmutáz, glutation peroxidáz és reduktáz enzimek aktivitását, valamint a redukált és oxidált glutation koncentrációját a WT és KO törzsben normál és oxidatív stressz körülmények között (9. táblázat).

9. táblázat A *CaPPZ1* géndelécio és a *tBOOH* kezelés hatása az oxidatív enzimek aktivitására, valamint a glutation koncentrációkra

	WT	WTt	KO	KOt
Kataláz [kat (kg protein) ⁻¹]	0,5 ± 0,07	0,5 ± 0,09	1,1 ± 0,04 ***,a	2,2 ± 0,15 ***,b; ***,c
Szuperoxid dizmutáz [munit (mg protein) ⁻¹]	0,11 ± 0,02	0,11 ± 0,02	0,14 ± 0,02 ^{*,a}	0,15 ± 0,02 ^{*,c}
Glutation peroxidáz [mkat (kg protein) ⁻¹]	0,3 ± 0,04	0,7 ± 0,2 ^{**,a}	0,6 ± 0,1 ^{**,a}	0,8 ± 0,1 ^{*,b}
Glutation reduktáz [mkat (kg protein) ⁻¹]	2,5 ± 0,15	6,9 ± 1,2 ^{***,a}	5,3 ± 0,8 ^{***,a}	9,9 ± 0,8 ^{***,b;} ***,c
Redukált glutation (GSH) [nmol (OD ₆₄₀) ⁻¹]	435 ± 40	548 ± 25 ^{***,a}	430 ± 35	525 ± 44 ^{*,b}
Oxidált glutation (GSSG) [nmol (OD ₆₄₀) ⁻¹]	3,9 ± 0,4	17,9 ± 2,2 ^{***,a}	8,4 ± 1,7 ^{**,a}	20,8 ± 7,2 ^{*,b}
GSH/ GSSG	113 ± 17	31 ± 4 ^{***,a}	53 ± 13 ^{**,a}	28 ± 11 ^{*,b}

Négy biológiai párhuzamos minta átlagát ± SD értékeit mutatjuk be. A szignifikancia értékeket (* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001) Student féle t-tesztel számoltuk.

^a Szignifikáns változás a WTt és KO sejtek estében a WT sejtekhez képest.

^b Szignifikáns változás a KOt sejtekben a KO sejtekhez képest.

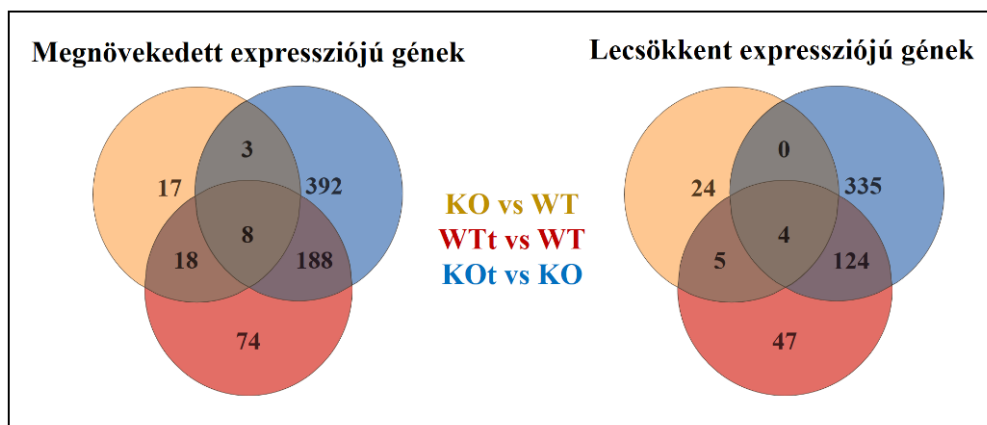
^c Szignifikáns változás a WTt sejtekben a KOt sejtekhez képest.

A kontroll (WT) sejtekhez képest a kataláz aktivitása megnövekedett a foszfataz hiányában, valamint a KO törzsben *tBOOH* kezelése után. A szuperoxid dizmutáz enzim aktivitása csak kissé emelkedett meg az oxidatív stressz, valamint a *CaPPZ1* delécio hatására. A glutation reduktáz és peroxidáz enzimek esetében mind a *tBOOH* kezelés, mind a foszfataz hiánya növelte az enzimaktivitást. Tehát a WT sejtek kezelése fokozta a glutation metabolizáló enzimek aktivitását és ebből kifolyólag megváltoztatta az intracelluláris glutation koncentrációkat. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a kezelés körülményeit jól választottuk meg, mert a gombasejtek redox rendszere érzékenyen reagált a *tBOOH* jelenlétére. A génkiütés önmagában kisebb mértékben növelte meg a glutation metabolizmusban részvevő enzimek aktivitását. Azonban az oxidatív stressz hatására a KO sejtekben tapasztaltunk jelentősebb növekedéseket. A foszfataz hiányában tapasztalt változás önmagában új eredmény, és a KOt mintával kapott adatok alátámasztják korábbi megfigyelésünket (14. ábra), miszerint a foszfataz hiánya és az oxidatív stressz együttesen markánsabb változásokat hoz létre, mint a két körülmény külön-külön, ami egy egymást erősítő kooperációra utal (9. táblázat).

A *CaPPZ1* gendeláció és az oxidatív stressz fiziológiai hatásait összefoglalva, elmondható, hogy a rövidtávú *tBOOH* kezelés következtében a sejtek egy kevésbé proliferatív állapotba kerülnek, de élve maradnak. Kis mértékben csökken metabolikus aktivitásuk és módosul a morfológiájuk, valamint oxidatív védőmechanizmusuk érzékenyen reagál a kezelésre. Ezek szerint az általunk beállított biológiai rendszerrel el lehetett kezdeni a költséges transzkriptomikai vizsgálatokat.

6.2.2 A DNS chip adatok kiértékelése

Az egyes enzimekre vonatkozó korábban leírt eredményeket szeretnénk volna alátámasztani egy globális változásokat feltérképező módszerrel. Ehhez egy DNS chip hibridizációs előkísérletet végeztünk. A DNS chip nyers adatai (text formátumban) megtalálhatóak a GEO (Gene Expression Omnibus) honlapján a GSE134060 hozzáférési szám alatt. A nyers adatok mellett található egy fájl, ami tartalmazza a minták jellemzőit, az alkalmazott protokollokat, valamint a normalizált jelintenzitásokat. A következő két Venn-diagram szemléletesen mutatja a DNS chip hibridizációs kísérlet eredményét (16. ábra).



16. ábra A *CaPPZ1* mutáció és oxidatív stressz által kiváltott génexpressziós változások a *C. albicans*-ban a DNS chip hibridizációs adatok alapján

A két diagramon látható a mutáció (KO vs. WT), a *tBOOH* kezelés (WTt vs. WT), valamint a kettő együttes hatása (KOt vs. KO) a *C. albicans* génexpressziójára. A színek az egyes összehasonlításokat reprezentálják a színskálának megfelelő módon. Csak a több mint kétszeres mRNS szintnövekedést, illetve csökkenést mutató gének számát mutatjuk be.

A Venn-diagramokon sárga szín jelzi a foszfatáz hiányát, a piros szín jelzi a *tBOOH* kezelés hatását, míg a kék a két kondíció által együttesen létrehozott változásra hívja fel a figyelmet. Összességében elmondható, hogy a foszfatáz hiánya 46 gén expresszióját növelte és 33 gén expresszióját csökkentette le. A *tBOOH* kezelés önmagában 288 gén mRNS szintjét növelte meg, míg 180 gén mRNS szintjét csökkentette le. Ezzel szemben az oxidatív stressz

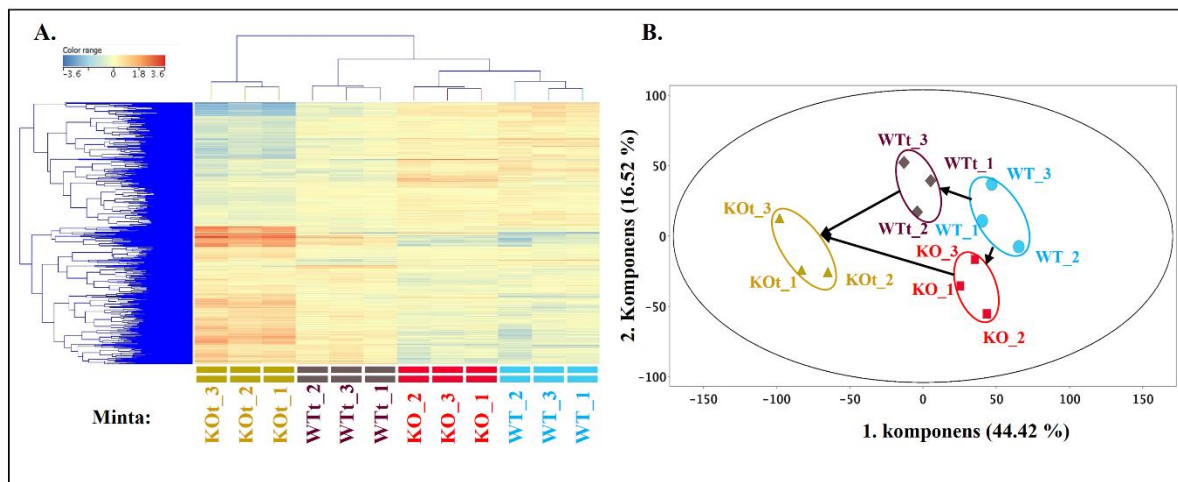
és a *CaPPZ1* deléción együttesen 591 gén expressziójának növekedését és 463 gén expressziójának csökkenését okozta. Ezek az adatok meggyőztek minket, hogy a kísérleti rendszer működőképes, hiszen a számadatokból leszűrhetjük (16. ábra), hogy a szubletális *tBOOH* koncentráció foszfátáz hiányában jelentős globális génexpresszió változásokhoz vezet a gombában. Mivel a DNS chip hibridizációnak számos hátránya van, ezért egy érzékenyebb, dinamikusabban felhasználható módszert választottunk a génexpressziós profilok feltárására. Meg kell említeni, hogy a DNS chipet régebbi genomváltozatra (*C. albicans*_SC5314/Assembly21) terveztük, ezért egyes újabban annotált gének nem mutathatók ki rajta. További hátránya a DNS chipnek, hogy pontatlan adatokat szolgáltat a nagyon kis vagy nagyon nagymértékben kifejeződő génekről.

6.2.3 RNS szekvenálási adatok kiértékelése

Döntő kísérleteinkben a génexpresszióban bekövetkező változásokat RNS szekvenálással határoztuk meg. Az RNS szekvenálás egy új generációs szekvenálási módszer, amely megadja egy adott pillanatban az összes jelenlevő RNS szekvenciáját és annak mennyiségét a biológiai mintában. Az RNS szekvenálásnak nagyobb a dinamikus tartománya, az adatok bármikor újraértékelhetőek, ezért döntöttünk az RNA-Seq módszer mellett. Segítségével normál és oxidatív stressz körülmények között vizsgáltuk a WT és KO sejtek génexpressziós mintázatait 3 független biológiai párhuzamos mintában. Az RNS szekvenálás nyers adatai (fastq formátumban) megtalálhatóak a GEO (Gene Expression Omnibus) honlapján a GSE134060 hozzáférési szám alatt. A nyers adatok kiegészültek egy Excel fájlal, ami tartalmazza a minták adatait, a protokollokat, valamint az adatfeldolgozási folyamatot („pipeline”-t) és magát a feldolgozott adatfájlt.

Az RNA-Seq eredmények reprodukálhatóságát két módszerrel ellenőriztük. Mind a PCA, mind a klaszterezés bizonyította eredményeink helyességét, ugyanis a klaszter analízisnél látható, hogy a biológiai párhuzamosok egymás mellé rendeződtek, egy klasztert alkotnak (17A. ábra). A főkomponens analízis (PCA) során szintén egymás mellé kerültek a biológiailag párhuzamos minták, és azok távolsága jól tükrözi a fiziológiai méréseink során tapasztalt tendenciákat (17B. ábra). A nyílak hossza mutatja az eltérések mértékét, amelyet önmagában az oxidatív kezelés, a foszfátáz hiánya vagy a kettő együttesen hozott létre. Az RNA-Seq módszerrel egy megfelelő globális génexpresszió analízist végezhetünk el, hiszen mintánként kb. 20 millió szekvencia részletet (readet) kaptunk. Mivel minden read kb. 75 bp

hosszúságú, és a *C. albicans* genom mérete körülbelül 15,5 Mb, 40x genom lefedettséget értünk el.

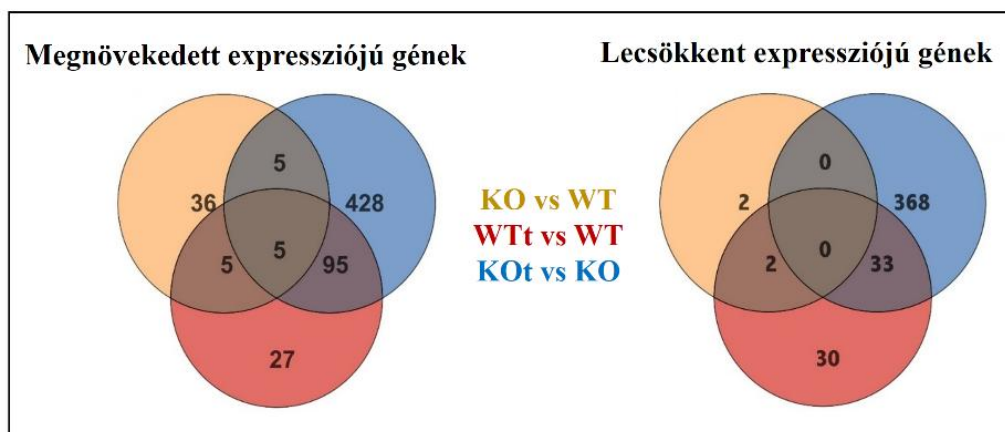


17. ábra Az RNS szekvenálási adatok minőségi ellenőrzése klaszter analízissel és főkomponens analízissel (PCA)

A.: Klaszter analízis. **B.:** Főkomponens analízis. A számok az egymástól független biológiai párhuzamosokat jelölik. A színek az egy kísérleti csoportba tartozó mintákat reprezentálják. A **B** panelen az összetartozó mintákat bekarikáztuk, és a köztük lévő különbségeket nyilakkal érzékeltettük. A nyilak iránya a kísérletek kiértékelésének logikus menetét mutatja.

A szekvenciák minősége is megfelelő, ui. 6205 gént sikerült azonosítanunk, ami a jelenleg ismert 6620 *C. albicans* gén 94 százaléka (CGD adatbázis).

A 18. ábrán láthatóak azok a gének, amelyek transzkripciós szintje szignifikáns és minimum kétszeres változást mutatott az RNA-Seq módszerével. A *PPZ1* deléció 51 gén expresszióját növelte meg, míg 4 gén expresszióját csökkentette le. Az oxidatív kezelés önmagában 132 gén mRNS szintjét növelte, míg 65 gén mRNS szintjét csökkentette szignifikánsan. A kettő együttesen viszont összesen 934 gén expresszióját befolyásolta (533 növekedett és 401 csökkent).



18. ábra A *CaPPZ1* mutáció és oxidatív stressz által kiváltott génexpressziós változások a *C. albicans*-ban az RNS szekvenálási adatok alapján

Az ábrán található jelölések és színek megegyezik a 16. ábra szövegében leírtakkal.

Látható tehát, hogy a foszfatáz hiánya önmagában (KO vs. WT), illetve az oxidatív kezelés önmagában (WTt vs. WT) kis vagy közepes változást okozott, de a kettő együtt jelentős mértékben változtatta meg a *Candida* génexpressziós mintázatát. Ezekből a számadatokból megállapítható, hogy a *CaPPZ1* deléciója és az oxidatív stressz között szinergizmus áll fenn a génexpresszió szintjén. Ezek az adatok szépen tükrözik fiziológiás és biokémiai eredményeinket (14-15. ábra, 9. táblázat).

A RNS szekvenálási adatokat összevetettük a DNS chip hibridizációs adatokkal (11. Függelék). A legtöbb korrelációs koefficiens jó egyezést mutatott a két megközelítés között (0,65-0,71), kivéve a KO vs. WT összehasonlítást, amely csak 0,04 értéket adott. Ez valószínűleg abból adódott, hogy a KO törzsben kevés gén expressziója változott, ráadásul ezek a változások viszonylag alacsonyak voltak, és ilyen körülmények között a DNS chip kevésbé megbízható. A 16. és 18. ábra összehasonlítása alapján is értékelhetjük a két transzkriptomikai módszerrel nyert adatokat. Az eredmények jól egyeznek, csak egy lényeges különbség adódott a tBOOH kezelésre reagáló gének számában.

Megállapíthatjuk, hogy RNS szekvenálással nagyobb genom lefedettséget (40x vs. 7x) értünk el, viszont közel azonos számú gént detektáltunk (6205 vs. 6217 gén), mint a DNS chippel. Az RNS szekvenálással vizsgált 3 biológiai minta adatai szignifikáns változást mutattak, míg a DNS chippel csak egy kísérletet végeztünk, ezért nem állt módunkban az eredmények statisztikai értékelése. Ráadásul a DNS chipet eggyel korábbi genomverzióra terveztük, és az RNS szekvenálás kiértékelésére használt új genom verzióban (*C. albicans*_SC5314/Assembly22) kb. 400 gén annotációja megváltozott. A fentiek értelmében a DNS chip előkísérletünk adatai csak tájékoztató jellegűek, ezért a továbbiakban csak az RNS szekvenálás adatait elemeztük. Érdeemes megjegyezni, hogy az új genom verzió elvileg

alkalmas lehet a szekvenciák allél szerinti elkülönítésére is, azonban ezt a lehetőséget munkánk során nem használtuk ki.

6.2.4 Gének ontológiai (GO) elemzése

Az RNS szekvenálási adatokon végrehajtottunk egy teljes körű ontológiai elemzést, vagyis megvizsgáltuk a több mint kétszeres változást mutató géneket molekuláris funkció, lokalizáció és biológiai folyamatban való részvétel szerint. Ezek alapján az érintett géneket 4 fő csoportba soroltuk: a membrán transzportban szerepet játszó, a sejtfelszíni fehérjéket kódoló, a metabolizmusban valamint a transzlációban résztvevő gének csoportjára (10. táblázat).

10. táblázat A jelentős transzkripció változásokat mutató gének ontológiai elemzése

GO ID	GO term	1. sor: felül/alul szabályozott gének száma 2. sor: klaszter gyakoriság (%) 3. sor: korrigált p érték			
		KO vs. WT	KOt vs. WTt	KOt vs. KO	WTt vs. WT
MEMBRÁN TRANSZPORT					
55085	Transzmembrán transzport*	12/0 23,5 0,00614	34/0 12,8 0,01683	22/3	4/1
5215	Transzporter aktivitás*	11/0 21,6 0,01162	35/0 13,2 0,00212	23/3	3/1
16021	A membrán integrális komponensei	14/0 7,7 0,00091	7/0	2/4	1/1
SEJTFELSZÍN					
9986	Sejtfelszín*	0/0	0/45 19,1 4,2e-21	0/58 14,5 2,38e-21	0/10 15,4 0,00297
5618	Sejtfal*	0/0	0/38 16,1 2,85e-18	0/50 12,5 1,45e-19	0/9 13,8 0,00320
31012	Extracelluláris mátrix	0/0	0/17 7,2 1,95e-07	0/20 5,0 4,74e-06	0/1

GO ID	GO term	1. sor: felül/alul szabályozott gének száma 2. sor: klaszter gyakoriság (%) 3. sor: korrigált p érték			
		KO vs. WT	KOt vs. WTt	KOt vs. KO	WTt vs. WT
97311	Biofilm mátrix	0/0	0/17 7,2 1,95e-07	0/20 5,0 4,74e-06	0/1
44403	Szimbionta folyamatok*	0/0	0/15	0/22 5,5 0,01879	0/2
51701	Gazdaszervezettel való kölcsönhatás	0/0	0/11 4,7 0,01453	0/16 4,0 0,00167	0/0
METABOLIZMUS					
6520	Aminosavak sejten belüli metabolikus folyamatai	0/1	1/0	0/4	0/11 16,9 0,00141
1901607	Alfa aminosav bioszintézis	0/0	13/0	21/0 3,9 0,03642	3/0
55086	Nukleinbázist tartalmazó kis molekulák metabolikus folyamatai	0/1	0/15	0/24 6,0 0,02650	0/6
6732	Koenzimek metabolikus folyamatai	0/0	0/16 6,8 0,04756	0/15	0/0
6733	Oxidoredukciós koenzimek metabolikus folyamatai	0/0	0/14 5,9 0,00026	0/15 3,7 0,04689	0/0
16491	Oxidoreduktáz aktivitás *	4/1	43/0 16,2 8,93e-06	32/8	0/19 29,2 2,42e-06
55114	Oxidációs-redukciós folyamatok *	6/0	51/0 19,2 2,04e-10	62/0 11,6 0,00131	12/2
97384	Ergoszterol bioszintézis	0/0	3/0	2/0	0/7 10,8 1,55e-06
TRANSZLÁCIÓ					
3735	Riboszóma szerkezeti elemek	0/0	0/71 30,1 8,96e-60	0/76 19,0 5,71e-48	0/2
22685	Citoszólikus riboszóma	0/0	0/63 26,7 1,33e-65	0/70 17,5 1,51e-60	0/2

GO ID	GO term	1. sor: felül/alul szabályozott gének száma 2. sor: klaszter gyakoriság (%) 3. sor: korrigált p érték			
		KO vs. WT	KOt vs. WTt	KOt vs. KO	WTt vs. WT
15934	Nagy riboszómális alegység*	0/0	0/42 17,8 7,71e-48	0/46 11,5 2,40e-25	0/2
15935	Kis riboszómális alegység*	0/0	0/22 9,3 8,13e-15	0/24 6,0 7,83e-12	0/0
30684	Preriboszóma	0/0	18/25	85/0 15,9 3,46e-45	24/0 18,2 4,31e-12
16070	RNS metabolizmus*	0/0	27/0	132/0 24,8 3,36e-13	34/0 25,8 0,00792
140098	RNS módosító katalitikus aktivitás	0/0	7/0	41/0 7,7 0,00037	8/0

Az *-gal jelölt csoportokból hőterképek készültek (19. ábra).

A foszfataz hiánya (KO vs. WT) a membrán transzportban valamint a redoxi folyamatokban résztvevő fehérjekódoló géneket befolyásolta a legnagyobb mértékben. Az oxidatív kezelés önmagában (WTt vs. WT) a sejt felszínhez asszociált gének expresszióját csökkentette, és ez a hatás nagymértékben felerősödött, ha a mutáns sejteket kezeltük *tBOOH*-val. A metabolizmusban résztvevő gének esetében szintén észrevehető a kezelés hatása a KO és WT sejtekre, és a legnagyobb változást itt is a foszfataz hiányos törzs mutatta az oxidatív kezelést követően. Végül a translációval összefüggő gének esetében két tendencia különíthető el. A riboszómális fehérjéket kódoló gének expressziója csökken, míg a RNS metabolizmusban résztvevő gének expressziója nő. A táblázatba a korábbiakban használt összehasonlítások mellé bevezettünk egy új szempontot (KOt vs. WTt), amely a mutáció és az oxidatív stressz közötti interakciót/kooperativitást mutatja. Ha ezt is megvizsgáljuk az látható, hogy számos géncsoport mutat jelentős csökkenést vagy emelkedést, tehát jelentős pozitív interakció mutatható ki a két kondíció között.

6.2.5 Génexpressziós változások kvantitatív elemzése hőterképek segítségével

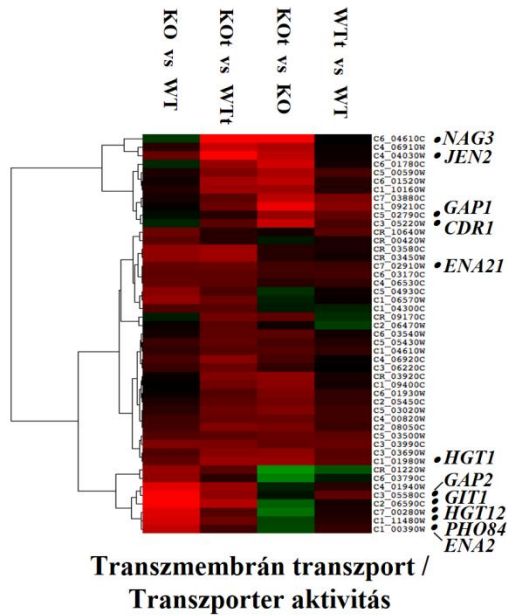
A 10. táblázat alapját szolgáló GO term listákat egymással összehasonlítottuk, az adatokat egyesével felülvizsgáltuk és szükség esetén újraértékeltek oly módon, hogy kihagytuk a

csoportba nem illő eredményeket és egyesítettük az egymást átfedő csoportokat. A transzlációban résztvevő géneket (a korábban leírt okok miatt) szétválasztottuk, a riboszómális folyamatban résztvevő, valamint az RNS érésben szerepet játszó génekre. Így a 10. táblázatban bemutatott 4 fő csoportból 5 csoportot hoztunk létre. A manuálisan korrigált adatokat használtuk fel a hőtérképek elkészítéséhez (19. *ábra*), amelyeken már nem csak az látható, hogy hány gén expressziója változott meg szignifikánsan, hanem az is, hogy ez a változás milyen mértékű.

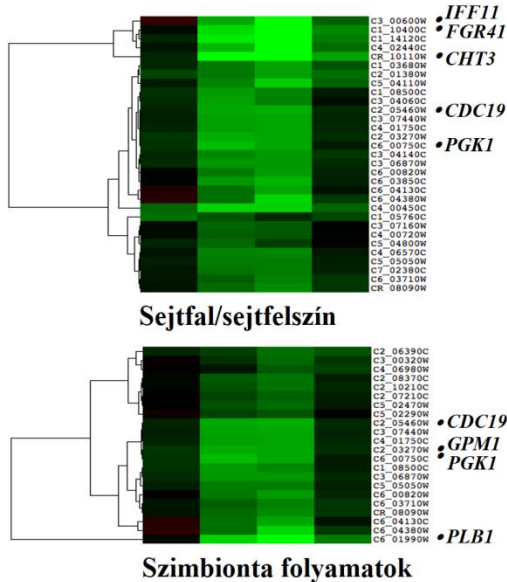
A membrán transzport csoportba tartozó génekből készült hőtérkép is bizonyítja, hogy a gének legnagyobb részének expressziója megnövekedett kezeletlen és *tBOOH* kezelt KO sejtekben (19A. *ábra*), vagyis a foszfatáz hiánya volt a legnagyobb hatással a transzport folyamatokra. A sejt fal, sejt felszín és szimbionta folyamatok génjeinek expressziója egyöntetűen lecsökkent oxidatív stressz hatására a WT és KO sejtekben egyaránt (19B. *ábra*), tehát ebben az esetben a *tBOOH* hatása volt kiemelkedő. Az oxidációs-redukációs folyamatokban résztvevő gének szerteágazó változást mutattak (19C. *ábra*), de összességében elmondható, hogy a foszfatáz hiánya önmagában csak kissé változtatott a génexpressziós szinten, ezzel szemben a kezelés már szignifikáns változásokhoz vezetett. A legnagyobb változás a *tBOOH* kezelt foszfatáz hiányos (KO) sejtek esetében történt. A transzláció kategóriájába eső csoportokat az áttekinthetőség kedvéért külön-külön ábrázoltuk. A citoszolikus riboszóma alegységek, valamint a riboszóma asszociált fehérjéket kódoló gének expressziója egyértelmű csökkenést mutatott a két kondíció együttes jelenlétékor (KO vs. KO). Ezzel ellentétesen a mitokondriális riboszóma fehérjéket kódoló gének expressziója megnövekedett oxidatív stressz alatt (19D. *ábra*). Ehhez hasonlóan az RNS metabolizmus és az rRNS érés folyamataiban szereplő gének expressziója is megnövekedett *tBOOH* jelenlétében, főleg a KO törzsben (19E. *ábra*).

Összességében tehát elmondható, hogy önmagában a foszfatáz hiánya kevésbé befolyásolta a *C. albicans* génjeinek expresszióját, de az oxidatív stresszel együttesen robusztus változásokat idézett elő a génexpresszióban.

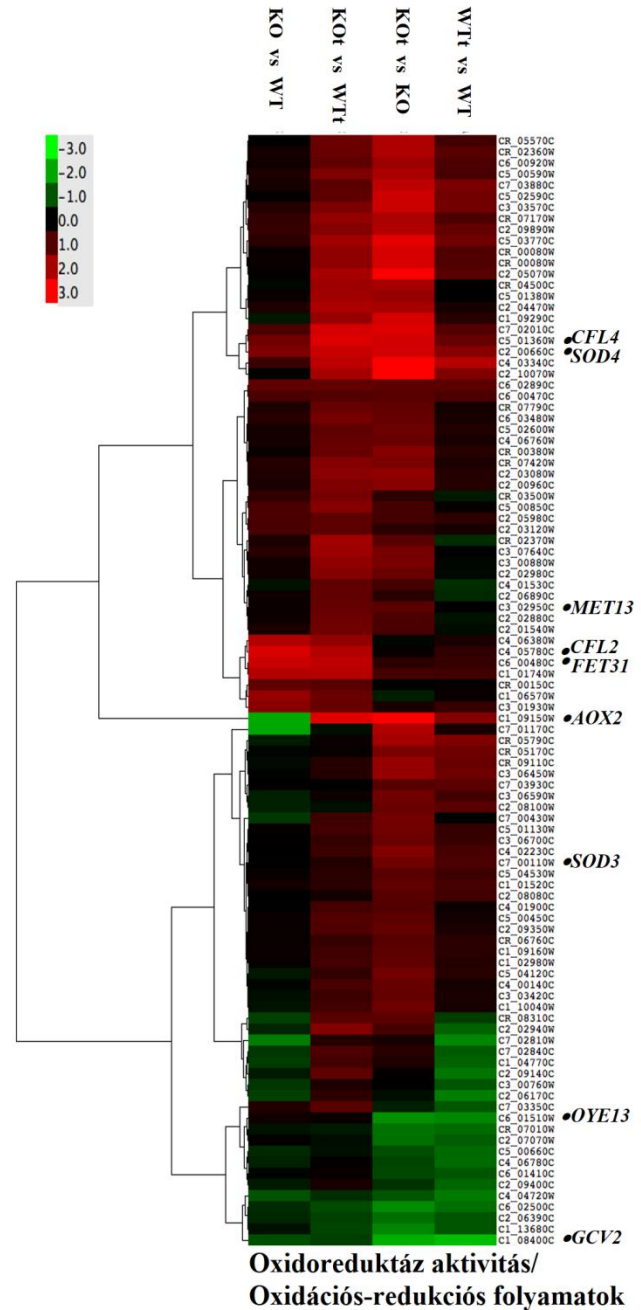
A. Membrán transzport

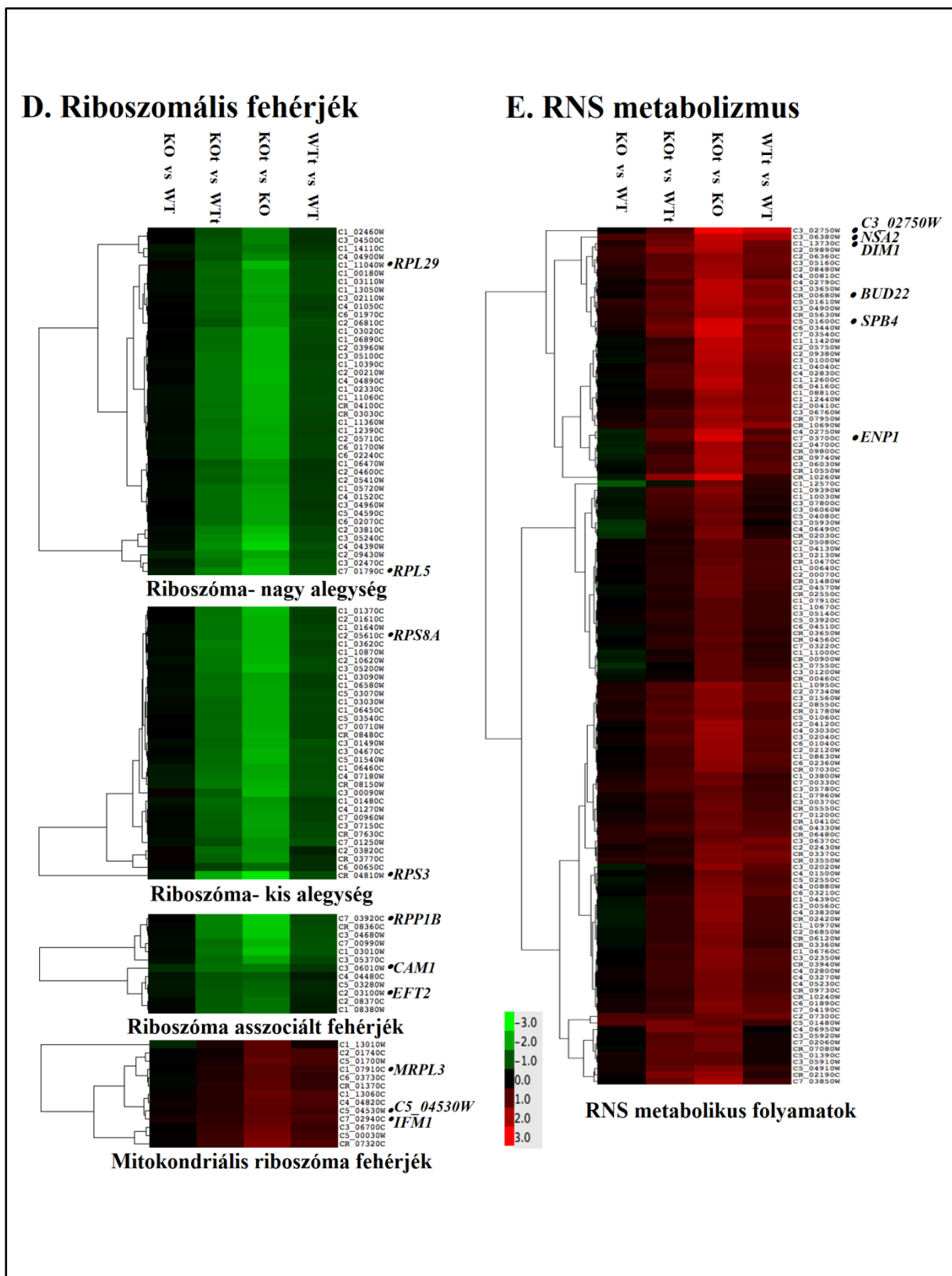


B. Sejtfelszín



C. Oxidáció-redukció





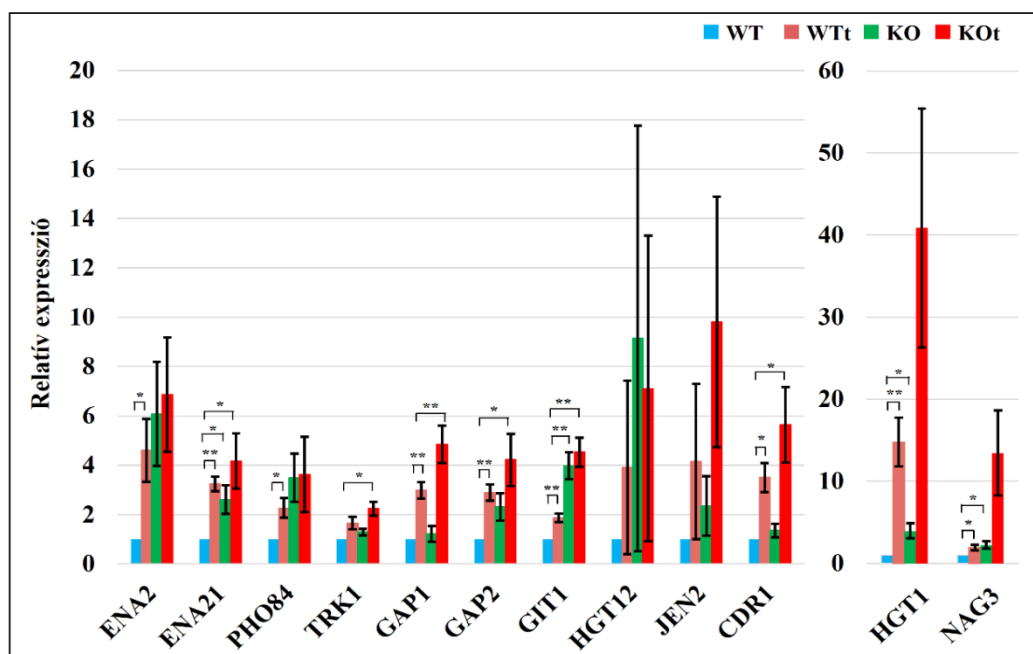
19. ábra A *CaPPZ1* deléció és a *tBOOH* indukálta stressz által kiváltott génexpressziós változások

A génexpressziós változások 4-féle összehasonlításban láthatóak. A hő térképeket 3 biológiai párhuzamos mintából származó RNS szekvenálási adatok alapján szerkesztettük. A változások irányát és mértékét a középen található skála szemlélteti. A megerősítésre kiválasztott gének nevét a hő térképek mellett külön jelöltük.

6.2.6 RNS szekvenálási adatok megerősítése RT-qPCR segítségével

Miután a géneket a hőterképek szerint és az elérhető irodalom alapján analizáltuk és csoportosítottuk, összeállítottuk a további analízisre kiválasztott gének listáját. Elsődlegesen a jelentős változást mutató géneket választottuk ki további megerősítésre, de fontos szempont volt az általunk kimutatott enzimaktivitás változás (9. táblázat) és a rendelkezésünkre álló irodalmi adatok relevanciája is. Több esetben kerestünk változatlan expressziót mutató, negatív kontroll gént is a mérések validálására. A gének kódoló szakaszaira specifikus primereket terveztünk (3. táblázat) és RT-qPCR segítségével meghatároztuk a kiválasztott gének expresszióját. Azt, hogy az önkényes szelekció milyen mértékben befolyásolta az RNS szekvenálással kimutatott tendenciákat, úgy ellenőriztük, hogy az RT-qPCR eredményeket is PCA analízisnek vetettük alá (12. Függelék). Hiába csökkent le a vizsgált génszám és változott meg a főkomponensek viszonya, a fő tendenciák változatlanul megmaradtak. Ezen kívül az analízis igazolta az öt párhuzamos biológiai mintából származó adatok összetartozását is. Az *ACT1* génre normalizált relatív génexpressziós értékeket a WT törzshöz viszonyítva a szokásos módon, oszlopdiagramokon ábrázoltam (20-24. ábra).

A membrán transzporttal kapcsolatban összesen 12 gén expresszióját vizsgáltuk (20. ábra).



20. ábra A membrán transzportban szerepet játszó fehérjéket kódoló gének relatív expressziója

Az ábra az *ACT1* génre normalizált génexpressziós értékeket mutatja normál és oxidatív stressz körülmények között. Minden egyes gén esetében a WT expressziót tekintettük vonatkozási alapként, és a változásokat ehhez viszonyítottuk. Az adatok 5 biológiai párhuzamos minta átlagai $\pm$ SEM. A p értékeket Student-féle t-próbával határoztuk meg. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$.

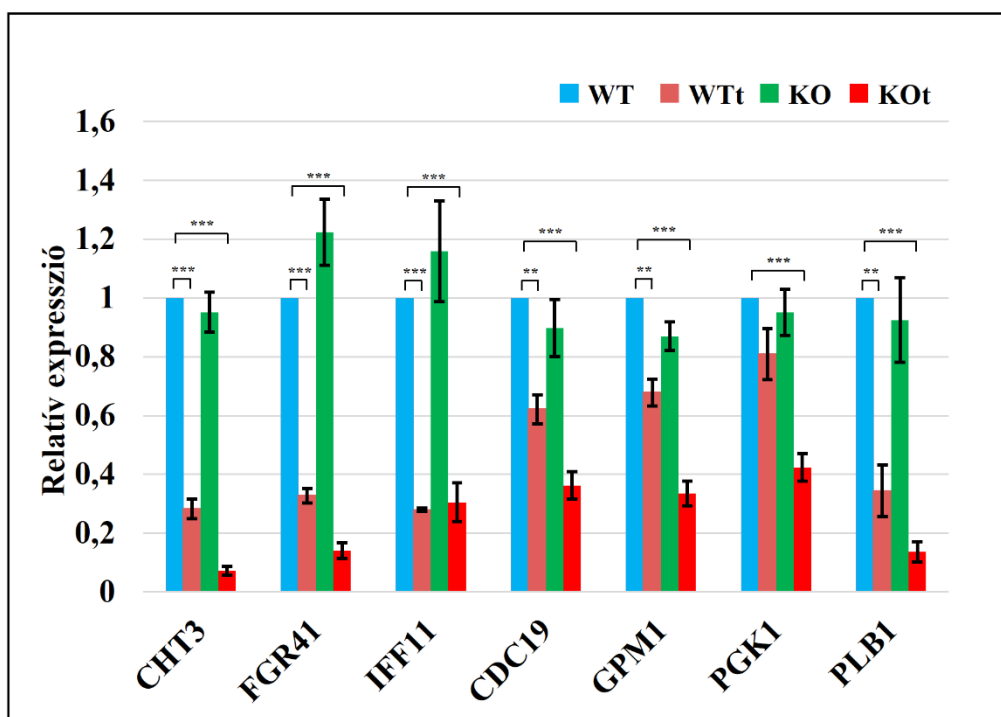
Az irodalmi adatok alapján tudjuk, hogy a CaPpz1 szerepet játszik az ozmotikus szabályozásban. Ezt a funkciót két transzporter működésével hozták összefüggésbe. Tudjuk, hogy a *cappz1* deléciós mutáns törzs toleráns a Na⁺ és Li⁺ ionokkal szemben (Ádám és mtsai., 2012). Ezt a toleranciát részben a mutánsban megnövekedett Na⁺ transzporttal magyarázzák, amiért a *C. albicans* *ENA2* és *ENA21* gének lehetnek felelősek. RNS szekvenálás szerint az *ENA2* és *ENA21* expresszió megemelkedett a KO törzsben (20. ábra), amit szerettünk volna RT-qPCR-rel megerősíteni. Emellett *S. cerevisiae*-ben ismerünk egy alternatív útvonalat, ami a K⁺ transzportért felelős *TRK1* és a *TRK2* génnel függ össze (Yenush és mtsai., 2002). A *C. albicans*-ban egyetlen kálium transzporter található, amit a *TRK1* gén kódol. Mivel a RNA-Seq adatok nem mutattak változást az expressziójában, ezt negatív kontrollként vizsgáltuk RT-qPCR segítségével.

Ezen kívül megvizsgáltuk az *ENA2*-höz hasonló génexpressziós mintázatot mutató géneket (megnövekedett mRNS szint a KO törzsben), vagyis egy aminosav transzportert (*GAP1*), a glicerofoszfoinozított (*GIT1*), egy hexóz (*HGT12*) és egy foszfát transzportert (*PHO84*) kódoló gént. A hőtérkép (19A. ábra) szerint egy másik klasztert alkotott a két multidrog ABC transzporter, a *CDR1* és *NAG3* gén; a Jen2 dikarbonsav transzporter valamint egy másik aminosav transzporter, a *Gap1*. Ebben a klaszterben a *NAG3* és a *JEN2* esetében egy erős, míg a *GAP1* és a *CDR1* esetében egy gyenge kooperáció látszik a gendeláció és *tBOOH* kezelés között. A *HGT1* gén által kódolt glükóz transzporter kiesett ebből a két klaszterből, expressziója főleg az *ENA21* génre emlékeztetett a hőtérkép (19A. ábra) alapján.

Az RT-qPCR adatok azt mutatták, hogy foszfatáz hiányában (KO) a két nátrium transzportert kódoló gén közül csak az *ENA21* relatív expressziós értéke növekedett meg úgy, mint a glicerofoszfoinozitol (*GIT1*), glükóz (*HGT1*) transzporter és a *NAG3* ABC transzporter gének expressziója. Az oxidatív stressz növelte az expresszióját az *ENA2* és *ENA21* transzporternek; a *HGT1*-nek; a két aminosav transzporternek (*GAP1* és *GAP2*), a multidrog ABC transzporter *CDR1* és *NAG3* géneknek és végezetül a *PHO84* foszfát transzporter kódoló génnek. Végezetül a KO mintákban is emelkedett expressziót tapasztaltunk az *ENA21*, *GAP1*, *GAP2*, *GIT1*, *CDR1* transzportert kódoló gének esetében. A *TRK1* esetében nem tapasztaltunk szignifikáns változást sem a KO, sem a WT törzsben, csak egy kisebb emelkedés történt a KO törzsben oxidatív kezelés hatására. A *HGT12* és a *JEN2* gének expressziója nagyon szórt a párhuzamos mintákban, ezért nem tudtunk biztos következtetéseket levonni.

A sejtfelszíni fehérjék csoportjából 7 gént választottunk ki, melyek expressziója oxidatív kezelés hatására lecsökkent a hőtérképek alapján (19B. ábra). Ezeket két csoportra oszthatjuk:

vannak, amelyek felszíni fehérjét kódolnak, mint a fő kitináz (*CHT3*), az *FGR41* adhezin szerű fehérjét kódoló és egy szekretált fehérjét kódoló gén, az *IFF11*; valamint vannak, amelyek csak a szimbiota folyamatokban vesznek részt, mint a foszfoglicerát-mutáz, *GPM1* és a foszfolipáz B (*PLB1*) gén terméke. A *CHT3*, *IFF11* és *PLB1* gének által kódolt fehérjék szekretálódnak és kiemelkedő szerepük van a gazdaszervezettel való kapcsolat létrehozásában. A *GPM1* a citoszólban jelenlevő metabolikus enzim, amely megtalálható a sejtfelszínen is. A *PGK1* által kódolt foszfoglicerát-kináz és a *CDC19* által kódolt piruvát kináz viszont mindkét csoportba egyaránt beletartozik. A Gpm1, Pgc1 és Cdc19 enzimet *moonlighting*, vagyis „feketemunkás” proteineknek is hívhatjuk, hiszen metabolikus enzimek lévén, szimbiotikus folyamatokban is szerepet vállalnak a sejtek felszínén.



21. ábra Sejtfelszíni fehérjét kódoló gének relatív expressziója

Az ábrán található jelölések és a kiértékelés/ábrázolás módja megegyezik a 20. ábra szövegében leírtakkal.

Látható, hogy a foszfataáz hiánya nem befolyásolta szignifikánsan a sejtfelszíni fehérjét kódoló gének relatív expresszióját. Továbbá a *tBOOH* kezelés egységesen lecsökkentette az mRNS szinteket mind a WT, mind a KO törzsben. Ez az eredmény jól mutatja, hogy a foszfataáz hiánya növelte az oxidatív stressz iránti érzékenységet a gombában.

Számos metabolikus folyamatot érintett a foszfataáz hiánya és/vagy az oxidatív stressz kezelés, mint például az aminosav metabolizmus vagy ergoszterol metabolizmus (ld.: 10. táblázat). Mi

főleg az oxidációs-redukciós folyamatokra fókuszáltunk, amely 2 GO alcsoportból tevődött össze. Ezek név szerint az oxidoreduktáz aktivitás és oxidációs-redukciós folyamatok. Ebben a kategóriában végül $7+2=9$ gén expresszióját vizsgáltuk meg. A gének kiválasztásánál szerettünk volna minél több folyamatot lefedni (19C. ábra). Minden fő kategóriából a jelentős változást mutató géneket választottuk, mint a *CFL4* Fe^{3+} -redutáz, amely csökkenést mutatott KOt mintában; *CFL2* oxidoreduktáz és multiréz-oxidáz *FET31* gének, melyek erős csökkenést mutattak a KO törzsben; az *Aox2* alternatív oxidáz génje, amely különálló klaszterként jelentős változást mutatott minden kategóriában; az *Oye23* NADPH dehidrogenáz, valamint a *Gcv2* glicin dekarboxiláz génje, amelyek expressziós szintje erősen csökkent a hőtérkép alapján (19C. ábra). A SOD izoenzim formák közül egyedül a *SOD2*-t nem válogattuk be, mert ennek az expressziója nem változott az RNA-Seq adatok alapján. A *SOD1* izoforma szintén nem változott, mégis megvizsgáltuk, mert ez a legnagyobb mértékben expresszálandó izoforma irodalmi adatok alapján. Az RNA-Seq adatok alapján a *SOD4* expressziója jelentősen megnövekedett tBOOH kezelés hatására, míg a *SOD3*-é kisebb mértékben, de változott a *SOD2*-höz képest. Mivel a szuperoxid dizmutáz aktivitását - ami megemelkedett a foszfataz hiányában, valamint a kezelt KO törzsben is (9. táblázat) - a 4 SOD izoforma hozza létre, szerettük volna tudni, hogy ezek az izoformák egyenlő mértékben expresszálnak-e.

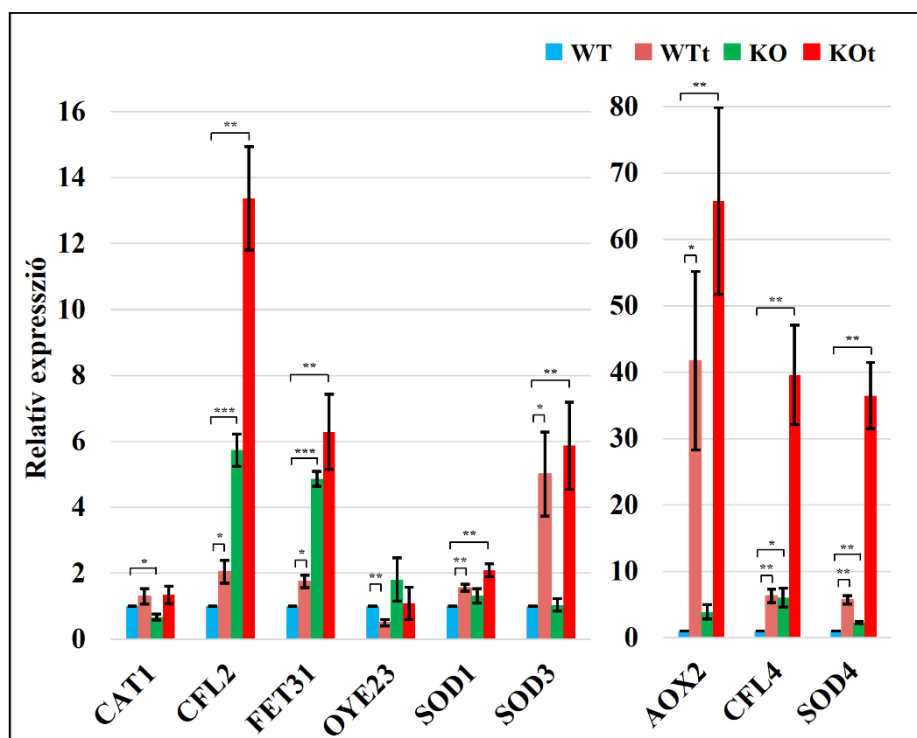
A biokémiai tesztek (9. táblázat) alapján a listához hozzáadtuk még a *CAT1* gént, mivel a kataláz enzimaktivitása megnőtt a foszfataz hiányában, valamint a kezelt KO törzsben. A *CAT1* az RNA-Seq adatok alapján nem mutatott szignifikáns változást, tehát negatív kontrollként vettük figyelembe. Mivel a GPX (glutathion peroxidáz) és GPR (glutathion reduktáz) gén által kódolt enzimek sem mutattak szignifikáns eltérést, ezért ezek expresszióját nem vizsgáltuk meg, növelve a negatív kontrollok számát. Így összesen 11 gént vizsgáltunk RT-qPCR segítségével (22. ábra).

Azt találtuk, hogy a katalázt kódoló *CAT1* gén expressziója foszfataz hiányában kissé csökkent. Ebből levonható az a következtetés, hogy a kataláz enzimaktivitásának változása (9. táblázat) nem génexpressziós szinten szabályozódik. A szuperoxid-dizmutáz egyik izoenzime, a *SOD1* mRNS szintje oxidatív stressz következtében megemelkedett, de kisebb mértékben, mint a másik két SOD izoforma, vagyis a *SOD3* és *SOD4*. Ebből arra lehet következtetni, hogy az aktivitás létrehozásában inkább ezek az izoformák vesznek részt.

A KO mutáció következtében szignifikáns növekedést láttunk az oxidoreduktáz *CFL2*, Fe^{3+} -redutáz *CFL4*, multiréz-oxidáz *FET31* és a szuperoxid-dizmutáz *SOD4* fehérjét kódoló gének expressziójában. Ez azt támasztja alá, hogy a CaPpz1-nek szerepe van az oxidatív stressz

szabályozásában. Az alternatív oxidáz, *AOX2*; a *CFL2*, *CFL4* és a két SOD izoforma (*SOD3* és *SOD4*), valamint a *FET31* expressziója szintén emelkedett oxidatív kezelés hatására, főleg a KO törzsben (22. ábra).

Összességében elmondható, hogy a foszfatáz delécíója és az oxidatív kezelés együttesen jelentős mértékben megnövelte az oxidációs-redukciós folyamatokban részt vevő fehérjekódoló gének expresszióját.

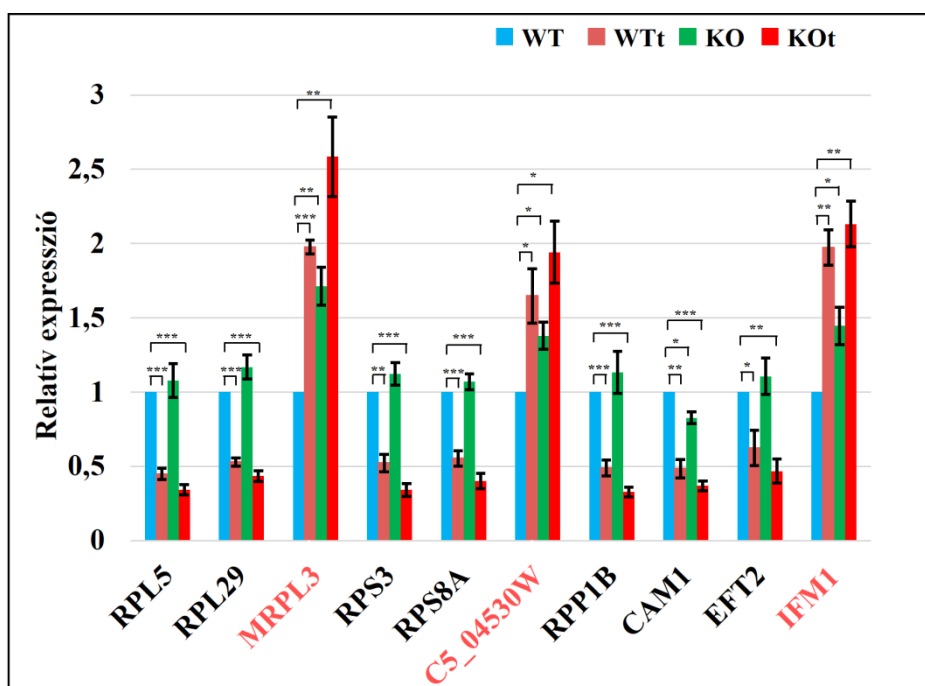


22. ábra Oxidációs-redukciós folyamatokban részt vevő fehérjéket kódoló gének relatív expressziója

Az ábrán található jelölések és a kiértékelés/ábrázolás módja megegyezik a 20. ábra szövegében leírtakkal.

A transzláció kategóriáját – mint már említettem – két alcsoportra osztottuk, a riboszómális fehérjék és az RNS metabolizmus csoportjára (19D-E. ábra). Először a riboszómális fehérjék csoportjára térnék ki. Ebben a csoportban a hőterkép alapján 2 tendencia különíthető el: míg a citoszolikus riboszóma asszociált gének expressziója csökken, addig a mitokondriális riboszóma asszociált géneké nő oxidatív stressz kezelés hatására mindkét törzsben (19D. ábra). Validálásra több gént is kiválasztottunk, hogy minden oldalról megvizsgáljuk a transzláció folyamatát. A 19D. ábrán látható alcsoportokból 2-2 képviselőt választottunk a riboszóma kis (*RPS3*, *RPS8A*) és nagy alegységgel (*RPL5*, *RPL29*) kapcsolatos génekből, valamint 3-3 gént a riboszóma asszociált fehérje kódoló és mitokondriális riboszóma asszociált fehérje kódoló génekből. A riboszóma kötő fehérjékből kiválasztottuk az *RPP1B*

savi riboszómális fehérje kódoló gént és két transzlációs elongációs faktort kódoló gént (*CAM1*, *EFT2*). Az *Eft2* elongációs faktort már egy korábbi publikációban a CaPpz1 fehérje potenciális szubsztrátjaként azonosítottuk, ezért szeretnénk volna megvizsgálni szerepét az oxidatív stresszre adott válaszban (Márkus és mtsai., 2017). A mitokondriális gének esetén az *Mrpl3* a mitokondriális nagy alegységet, a *C5_04530W* a mitokondriális kis alegységet, míg az *Ifm1* a mitokondriális iniciációs faktort jelenti. A transzlációban részvevő gének közül így összesen 11 gén mRNS szintjét vizsgáltuk a sejtekben, amik egy egységes génexpressziós mintázatot mutattak (23. ábra).

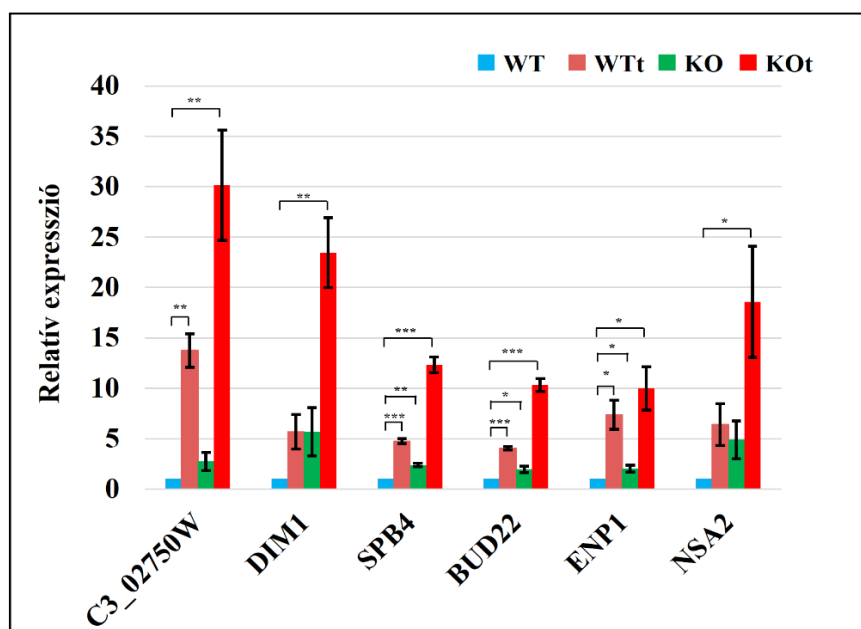


23. ábra Transzlációban szerepet játszó fehérjéket kódoló gének expressziója

Az ábrán található jelölések és a kiértékelés/ábrázolás módja megegyezik a 20. ábra szövegében leírtakkal. Narancssárgával jeleztem a mitokondriális riboszóma génjeit.

Oxidatív stressz kezelés hatására a citoszólikus riboszómális nagy alegység (*RPL5*, *RPL29*), valamint kis alegység (*RPS3*, *RPS8A*) fehérjéi, az *RPP1* savi riboszómális fehérje és két transzlációs elongációs faktor (*CAM1*, *EFT2*) génjeinek expressziós szintje lecsökkent a WT törzsben. Ez a hatás felerősödött a foszfataz hiányos (KO) törzsben. Ezzel szemben a mitokondriális riboszómális fehérjéket (*MRPL3*, *C5_04530W* és *IFM1*) kódoló sejtmagi gének expressziója pedig fokozódott kezelés hatására. A foszfataz kiütése nem befolyásolta a transzlációban részvevő gének expresszióját, kivéve a mitokondriális géneket, amelyeknek kissé megemelkedett a relatív expressziója a KO törzsben. Eredményeinkből az a következtetés vonható le, hogy a foszfataz hiánya érzékenyebbé tette a sejteket az oxidatív stresszel szemben.

Végezetül megvizsgáltuk az RNS metabolizmus folyamatát, amelyben a hőtérkép alapján szintén egy egységes tendencia látható (19E. ábra). Validálásra olyan géneket válogattunk össze, amelyek jelentős változást mutattak valamint más és más funkcióval rendelkeznek. Ezért ebből a csoportból kiválasztottunk két általános RNS módosító enzimet, a C3_02750W ribonukleázt és Spb4 RNS helikázt, az rRNS szintézissel kapcsolatos *RRN3* gént, aminek a terméke transzkripció faktoraként vesz részt a folyamatban, valamint az RNS érés szabályozásában részt vevő Bud22-t és az Nsa2 pre-rRNS komplex komponenst. Továbbá vizsgáltuk a rRNS processzálasban részt vevő *DIM1* rRNS dimetilázt és a pre-rRNS érés-szabályozásban részt vevő *ENP1* fehérjekódoló gént.



24. ábra RNS metabolizmusban szerepet játszó gének relatív expressziója

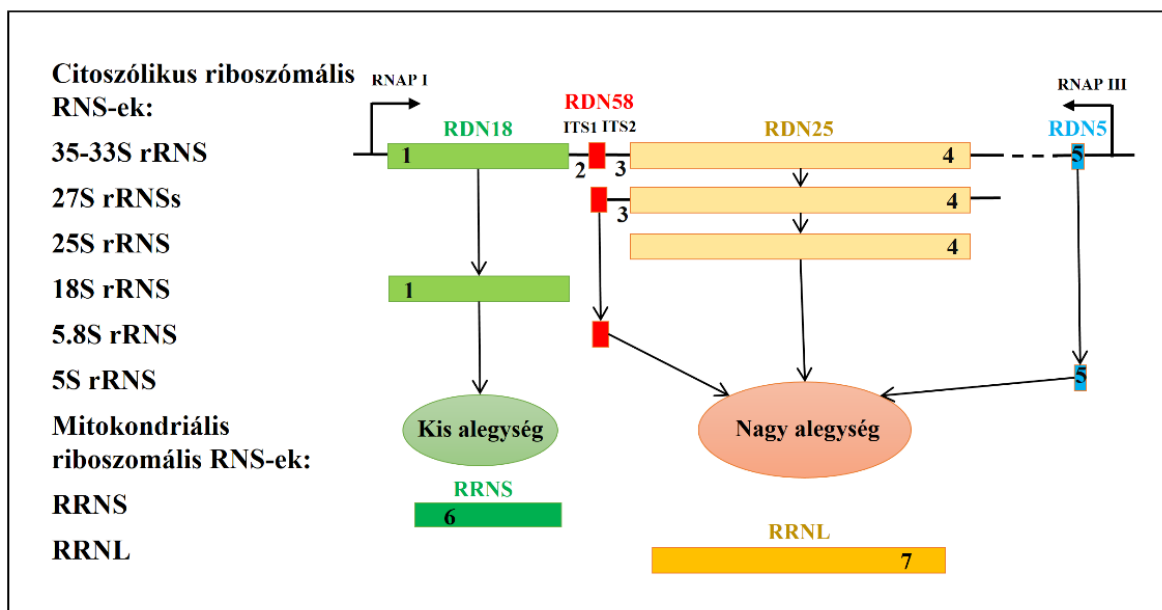
Az ábrán található jelölések és a kiértékelés/ábrázolás módja megegyezik a 20. ábra szövegében leírtakkal.

Általánosan elmondható, hogy a foszfátáz hiánya nem okozott szignifikáns változást, de tBOOH-val kezelt WT, valamint KO törzsben megnövekedett az RNS processzálasban résztvevő fehérjekódoló gének mRNS szintje (24. ábra). Azonban az *SPB4*, *BUD22* és *ENP1* gének esetében kissé megemelkedett a relatív expresszió a *CaPPZ1* mutáció hatására is. Ezek a gének a pre-rRNS érésben vesznek főleg részt. Tehát a már előre legyártott preriboszómák így össze tudnak szerelődni a rövidtávú stressz alatt, segítve ezáltal a gomba védekezését az oxidatív stressz ellen.

Annak érdekében, hogy az RT-qPCR adatait korrekt módon összehasonlíthassuk a DNS chip és RNS szekvenálás eredményeit, az adatokat egy másfajta statisztikai módszerrel is elemeztük. Az összevethetőség kedvéért a változásokat különböző relációkban logaritmikus skála szerint számítottuk ki ($\log_2FC$). A változások szignifikanciáját Anova teszttel határoztuk meg, amit Tukey post hoc teszttel kombináltunk. Megjegyzem, hogy a DNS chip előkísérlet és az RNA-Seq kísérletsorozat eredményeit korábban ugyanígy kezeltük, és pl. a hőtésképeken feltüntetett összehasonlításokat (19. *ábra*) ennek megfelelően végeztük. Így tehát készítettünk egy összefoglaló táblázatot, amely a 3 transzkriptomikai módszerrel kapott adatokat összehasonlítható formában tartalmazza (13. *Függelék*). A 20-24. *ábrák* és a 13. *Függelék* azonos tendenciákat mutatnak be, de ezek miatt néhány esetben eltérés adódott a szignifikancia mértékében az oszlopdiagramokon feltüntetett és a táblázatban megadott adatok között. Az általunk felállított szigorú feltételek szerint csak a mindkét statisztika szerint szignifikáns változásokat tekintettük jelentősnek.

6.2.7 RNS érés folyamatának ellenőrzése RT-qPCR-rel

A 23. és 24. *ábra* ellentétes tendenciát tükröző eredményei arra sarkalltak minket, hogy meg vizsgáljuk az rRNS érés folyamatát, ui. a transzlációban szerepet játszó fehérjekódoló gének expressziója lecsökken oxidatív stressz alatt, míg az RNS metabolizmus géneinek expressziója nagymértékben nő. Hogy ez a két tendencia milyen módon áll összefüggésben a riboszómális RNS komponensek mennyiségével, azt egy, a korábbiaktól eltérő RT-qPCR stratégiaival döntöttük el. A 25. *ábra* mutatja az rRNS érés folyamatát *C. albicans*-ban, amelyet egy korábbi közlemény alapján készítettünk (Pendrak és mtsai., 2011). Ezt használtuk fel a specifikus primerek tervezéséhez.

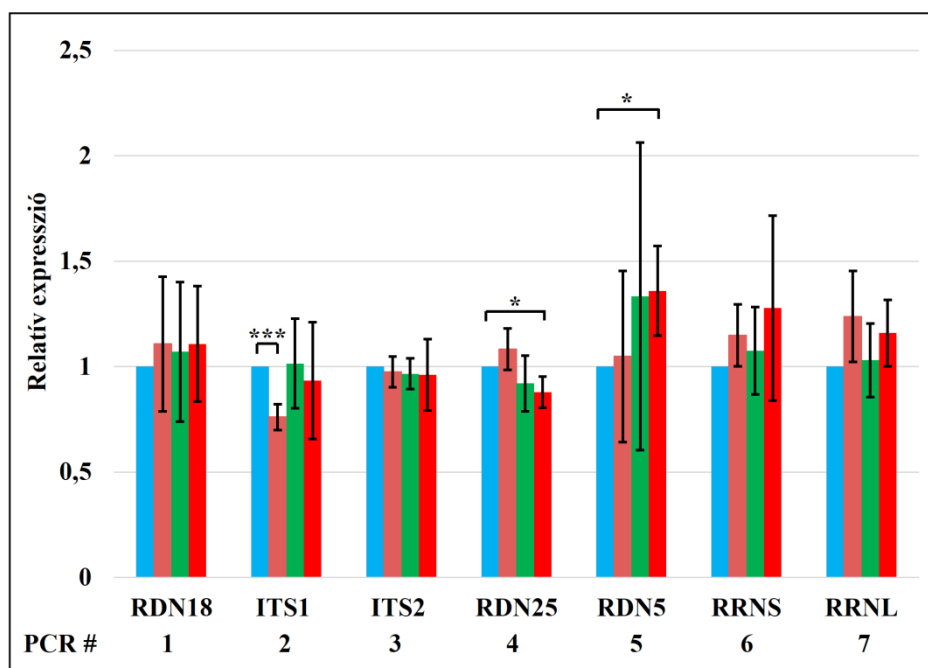


25. ábra Az rRNS érés sematikus ábrázolása *C. albicans*-ban

Az rRNS érés folyamatának ellenőrzése során vizsgáltuk az rDNS elsődleges átíratát, valamint a már érett rRNS kis és nagy alegységek expressziós szintjeit. A számok jelölik a régiókat, amelyekre specifikus primereket terveztünk.

A sematikus ábra mutatja a riboszómális RNS érésének egyes lépéseit. Érdekesség, hogy az 5S RNS (*RDN5*) átírását az RNS polimeráz III végzi, míg minden más riboszómális RNS átírásáért az RNS polimeráz I felelős. Az érés során kivágódnak az ITS régiók (internal transcribed spacer), majd végül létre jönnek az rRNS-ek, melyek a kis és a nagy alegység felépüléséért felelősek. Ezek kimutatására 7 specifikus primerpárt terveztünk (4. táblázat, 7. Függelék).

Kísérleteink során RT-qPCR segítségével megvizsgáltuk az rRNS-ek különböző érési szakaszaiban levő formáit (26. ábra) annyi különbséggel, hogy ebben az esetben random primerrel írtuk át az RNS mintákat cDNS-é és 10 000-szeres hígítást alkalmaztunk a qPCR-nél.



26. ábra Az rRNS érés funkcionális vizsgálata RT-qPCR segítségével

Az ábra az *ACT1* génre normalizált génexpressziós értékeket mutatja normál és oxidatív stressz körülmények között, a WT mintához viszonyítva. A számok a 25. ábrán feltüntetett régiókat erősítő primer párokat jelölik, a primerek tulajdonságait a 4. táblázat tartalmazza. Az adatok 5 biológiai párhuzamos minta átlagai $\pm$ SEM. A p értékeket Student-féle t-próbával határoztuk meg. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$.

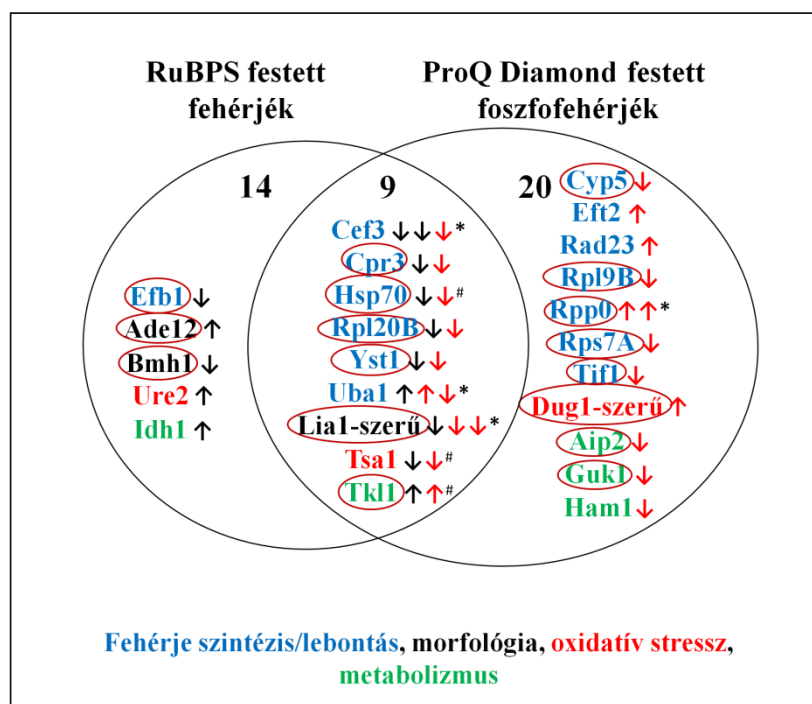
Megállapítottuk, hogy számottevő változás nem történik a riboszómális RNS kódoló gének expressziós szintjében sem *CaPPZ1* mutáció, sem oxidatív stressz hatására. Ez alól kivételt jelentenek az ITS1, RDN25 és RDN5 régiók az rDNS-ben. Az ITS1 régió esetében a WTt mintában csökkent le az expresszió jelentős mértékben, ami valószínűleg a gyors metabolizmus miatt adódhatott. Az RDN25 mennyisége kismértékű csökkenést, míg az RDN5 mennyisége kismértékű növekedést mutatott a KOt törzsben, de ez nem volt jelenős. Ez az eredmény azt sugallja, hogy a felerősödött rRNS szintézis és processzálas, valamint a riboszómák magasabb stabilitása együttesen biztosítanak a sejtek számára egy konstans riboszóma számot, legalábbis egy rövidtávú stressz alatt (1 órás oxidatív stressz kezelés).

7. Megbeszélés

A CaPpz1 egy gomba specifikus protein foszfatáz a *C. albicans*-ban. Korábbi kutatások rámutattak arra, hogy számos fontos funkciót lát el az opportunistá gomba életében. Ilyen a kation homeosztázis és membránpotenciál fenntartásában, továbbá a sejtfal bioszintézisben, az oxidatív stresszben, a hifanövekedésben, a sejtadhézióban valamint a fertőzőképességben betöltött szerep. A disszertációmban ismertetett globális vizsgálatokkal sikerült a foszfatáz új funkcióit feltárni, valamint a már ismert funkciókat más aspektusba helyezni, ezáltal jobban megérteni. Munkámat a felvetett probléma és az alkalmazott módszertan szempontjából két egymástól lényegesen elkülönülő, de eredményeiben egymást kiegészítő részben értékelem.

7.1 A CaPpz1 szerepe a proteom és a foszfoproteom vizsgálata alapján

A foszfoproteomika/proteomika metodikáját arra használtuk fel, hogy feltérképezzük a CaPpz1 hiányának következményeit a *C. albicans*-ban. Ezek a vizsgálatok lehetővé tették, hogy olyan adaptációs mechanizmusokat tárjunk fel, amelyekkel az opportunistá patogén képes a foszfatáz hiányát kompenzálni. Itt a sejteket majdnem a log fázis eléréséig tenyésztettük. A sejtekből nyert fehérje mintákat 2D elektroforézissel választottuk el és a WT, valamint a KO törzsek közötti különbségeket foszfoprotein (ProQ Diamond) és protein (RuBPS) specifikus festéssel detektáltuk. Végül a kiválasztott foltokban található fehérjéket tömegspektrometriával azonosítottuk. Összesen 25 fehérjét találtunk, aminek mennyisége és/vagy foszforiláltsági szintje megváltozott CaPpz1 hiányában (5. táblázat). Ezeket a fehérjéket a változás szempontjából négy nagy csoportra osztottuk (ld. 6.1.3 fejezet), majd elvégeztünk egy GO term analízist, amely során azt találtuk, hogy a vizsgált fehérjék kitüntetett módon a transzláció folyamatában és a biofilm képzésben vesznek részt valamilyen formában. Végül az egyes fehérjék funkciójának meghatározásához a CGD adatbázist használtuk (14. Függelék). Ez alapján a következő négy funkcionális csoportot hoztuk létre: protein szintézis/degradáció, morfológiai változások, oxidatív stressz válasz valamint metabolizmus, majd a változásokat Venn-diagramon ábrázoltuk (27. ábra).



27. ábra A CaPpz1 hiányában megváltozott mennyiségű és/vagy foszforiláltságú fehérjék csoportosítása

Az ábra KO törzsben megváltozott mennyiségű, valamint foszforiláltsági szintű fehérjéket foglalja össze. A számok mutatják azon fehérjék számát, amelyek megfestődtek egyik, másik, vagy mindkét festékkel. A funkciókat színekkel jeleztem. A fekete (RuBPS) és piros (ProQ Diamond) nyilak mutatják a különböző festéssel kimutatott változások irányát. A *-gal jelzett fehérjéket két foltban is megtaláltuk, ezek esetében a két azonos színű nyíl az első és a második folt intenzitás változásának irányát mutatják. A # jel arra utal, hogy *moonlighting* „feketemunkás” proteinekről van szó, vagyis a fehérje fő funkcióján kívül másodlagos funkciót is betölthet. A bekarikázott fehérjék kapcsolatba hozhatók a biofilm képződéssel.

A 25 azonosított fehérjéből 14 vesz részt a fehérje szintézis/degradáció folyamataiban. Ebből 9 közvetlenül részt vesz a transzlációban; ezek között van 1 transzlációs iniciációs faktor (Tif1), 3 transzlációs elongációs faktor (Efb1, Eft1 és Cef3) és 5 riboszómális fehérje komponens (Rpp0, Rps7A, Rpl9B, Rpl20B és Rps0A). További 3 chaperon fehérje (Ssa4, Tsa1 és Crp3) a szintetizálódó fehérjék feltekeredését biztosítja és 2 fehérje (Uba1 és Rad23) a protein degradációban vesz részt. Az Uba1 enzim az ubikvitinálás első lépését katalizálja, és kijelöli a fehérjét proteoszóma általi degradációra (McGrath és mtsai., 1991). A Rad23 az UV által károsodott DNS nukleotid kivágásos javítási (NER) folyamatában vesz részt (Prakash és Prakash, 2000), de az ubikvitinhez és a proteoszóma-hoz kötődve a proteolízist is befolyásolhatja (14. Függelék). A transzlációt érintő proteinek közül összesen 7 fehérje szintje csökkent, míg a proteolízist elősegítő Uba1 (ubikvitin aktiváló enzim) szintje növekedett CaPpz1 foszfatáz hiányában. Ez azt sugallja, hogy a foszfatáz nélkül a fehérje szintézis lelassul. Ezt a megfigyelést támasztja alá az a tény, hogy *S. cerevisiae*-ben az ScPpz1 szintén

negatívan befolyásolja a transzlációt (Aksenova és mtsai., 2007). Szeretném felhívni a figyelmet arra, hogy *ppz1* deléziós mutánsban az Efb1 transzlációs faktor mennyisége lecsökkent, és foszforilációját nem tudtuk kimutatni (5. táblázat). Az Efb1 ortológjáról, a *S. cerevisiae*-ben található EF1Ba/Efb1 transzlációs elongációs faktorról leírták, hogy *in vitro* szubsztrátja a ScPpz1-nek (de Nadal és mtsai., 2001). Ezekből arra következtethetünk, hogy ez a faktor jelentős lehet a transzláció során, de úgy tűnik, hogy foszforilációs regulációja nem örökölt meg a *C. albicans*-ban.

A fehérjék foszforiláltsági szintje ezzel szemben sokkal változatosabb mintázatot mutatott a *CaPPZ1* gén deléciója nyomán. Az Eft2 (elongációs faktor), Rad23 (DNS repair protein) és az Rpp0 (riboszómális fehérje) foszforilációs szintje megnövekedett, míg a Rpl26 (riboszómális fehérje) és az Rps7A (riboszómális fehérje), a Tif1 (elongációs faktor) és az Uba1 (ubikvitin aktiváló enzim) fehérje foszforilációja lecsökkent. A foszforilációs szint csökkenése azzal magyarázható, hogy a CaPpz1 összefüggésben van más regulátorokkal, mint pl. a Sit4 foszfatázzal, amellyel ellentétesen hat (Clotet és mtsai., 1999), illetve a MAP kinázzal, amivel összhangban működik (Lee és mtsai., 1993). Vagyis, ha a Ppz1 aktivitása csökken, az növeli a Sit4 foszfatáz aktivitását és/vagy csökkenti a MAP kináz aktivitását. Belátható, hogy mindkét eset a foszforilációs szint csökkenéséhez vezet. A Cef3 (elongációs faktor) fehérjét két foltban is azonosítottuk és miközben mindkét foltban csökkent mennyiséget detektáltunk, az egyik foltban csökkent a fehérje foszforilációja is. A második folt a foszfofehérjét tartalmazott. Tehát mindkét esetben jelentős fehérje mennyiség csökkenés történt, és a reguláció nem defoszforilációval történik, csak azért látunk gyengébb foszfoprotein festődést, mert a foszfofehérje mennyisége is csökkent.

Eredményeink alapján feltételezhetjük, hogy az Eft2, Rpp0 és a Rad23 szubsztrátjai lehetnek a CaPpz1-nek, mivel foszforiláltsági szintjük megemelkedett a KO mutánsban. A transzlációs elongációs faktor 2-nek a riboszóma transzlokációjában van szerepe a fehérje szintézis során. Korábban az Eft2-ről kimutatták, hogy a szordarin típusú antifugális szerek célpontja (Dominínguez és mtsai., 1998). Ezek az antifungális szerek a fehérje szintézis gátlásán keresztül fejtik ki a hatásukat (Dominínguez és mtsai., 1998). Továbbá kimutatták, hogy az Eft2 funkcionálisan megfelel a *S. cerevisiae* Efb1/Efb2 transzlációs faktoroknak, ugyanis az CaEft2 termeltetése az *S. cerevisiae efb1/efb2* dupla mutánsban helyreállította a sejtek növekedését, tehát a CaEft2 expressziójára szükség van a gombasejtek megfelelő növekedéséhez (Mendoza és mtsai., 1999). Korábban említettem, hogy az Efb1 *in vitro* szubsztrátja a ScPpz1-nek (de Nadal és mtsai., 2001), tehát elképzelhető, hogy *C. albicans*-ban funkcionális homológja, az Eft2 hasonló reguláció alatt áll.

Az Rpp0 fehérjében számos kazein kináz 2 foszforilációs konszenzus szekvencia motívumot találtunk. Élesztő ortológjáról kimutatták, hogy kazein kinázzal szabályozható, azonban ez a szabályozás nem esszenciális a transzlációs során, inkább az ozmoregulációban van szerepe (Rodriguez és mtsai., 1998). Ezek alapján valószínűsíthető, hogy a Rpp0 riboszómális fehérje a CaPpz1 szubsztátja lehet. Mivel a *C. albicans* Rad23-szerű fehérjét eddig még nem jellemezték, ennek foszforilálással és defoszforilálással történő regulációját nem tudjuk alátámasztani irodalmi adatokkal.

Érdekességgé szeretném megjegyezni, hogy egy friss közleményben leírtak egy újabb elongációs faktort, amelyről bizonyították, hogy indirekt módon a ScPpz1 célpontja lehet (Calafi és mtsai., 2020). Az ScPpz1 overexpressziója *S. cerevisiae*-ban toxikus a sejtek számára, ugyanis a sejtek növekedést gátolja. Ilyenkor az eIF2 α elongációs iniciációs faktor Ser51 oldalláncának foszforilációs szintje megnövekedik. A foszforilációt minden bizonnyal a Gcn2 kináz végzi, ugyanis a *GCN2* gén delécioja megszüntette az eIF2 α foszforiláltságát a Ppz1-t overexpresszáló sejtekben. Ebből arra következtettek, hogy a Ppz1 defoszforilálja és aktiválja a Gcn2 kinázt, ami a sejtek normális transzlációs mechanizmusát meggátolva csökkenti a sejtek növekedését (Calafi és mtsai., 2020). A KO törzzsel végzett kísérleteinkben mi nem találtunk a *C. albicans* eIF2 α vagy Gcn2 ortológok foszforilációjában bekövetkező változásra utaló jelet.

Tehát összességében elmondható, hogy a Ppz1 protein foszfátáz a *C. albicans*-ban és az *S. cerevisiae*-ben is közrejátszik a transzláció szabályozásában, és feltételezhető, hogy mindkét organizmusban transzlációs faktorokon keresztül hatnak, azonban úgy tűnik, hogy ezek foszforilációs regulációja nem konzerválódott az evolúció során.

Az 27. ábra és a 14. Függelék szerint a CaPpz1 hiánya 5 metabolikus enzimet is befolyásolt. Az Idh1 (izocitrát dehidrogenáz) és a Tkl1 (transzketoláz) fehérje mennyisége megnövekedett a KO sejtekben. Az Aip1 (dehidrogenáz), Guk1 (guanilát kináz) és a Ham1 (inozin-trifoszfát pirofoszfátáz) fehérjék foszforilációja lecsökkent a mutáns sejtekben. Mint már korábban leírtam, ezeket a fehérje defoszforilációs hatásokat a foszfátáz hiányos törzsben a CaPpz1 és MAP-kináz útvonal közötti (Lee és mtsai., 1993), valamint a Ppz és a Sit4 foszfátázok közötti (Clotet és mtsai., 1999) kölcsönhatásokkal értelmezhetjük. A metabolikus enzimek szerepével kapcsolatban meg kell említeni egy új hipotézist, ami szerint számos anyagcsere enzim „feketemunkás”-ként funkcionál. Erre jó példa a patogén gombában található *bona fide* citoszolikus enzimek, riboszómális fehérjék és chaperonok, amelyek új funkciókat tölthetnek be a sejtfelszínre való kihelyeződés után (Karkowska-Kuleta és Kozik, 2014). Vizsgálataink

során mi is találtunk ilyen „feketemunkás” proteineket. Ezek közül a Hsp70/Ssa1, Tkl1 és a Tsa1 fehérjéket már kimutatták a *Candida* sejtek felszínén (Hernáez és mtsai., 2010; Vialás és mtsai., 2012). Ebből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a sejt felszíni fehérjék összetétele jelentősen megváltozik a foszfátáz hiányában az adaptációs mechanizmusok során, tehát a foszfátáz szerepet játszik a sejt felszíni fehérjék összetételének meghatározásában.

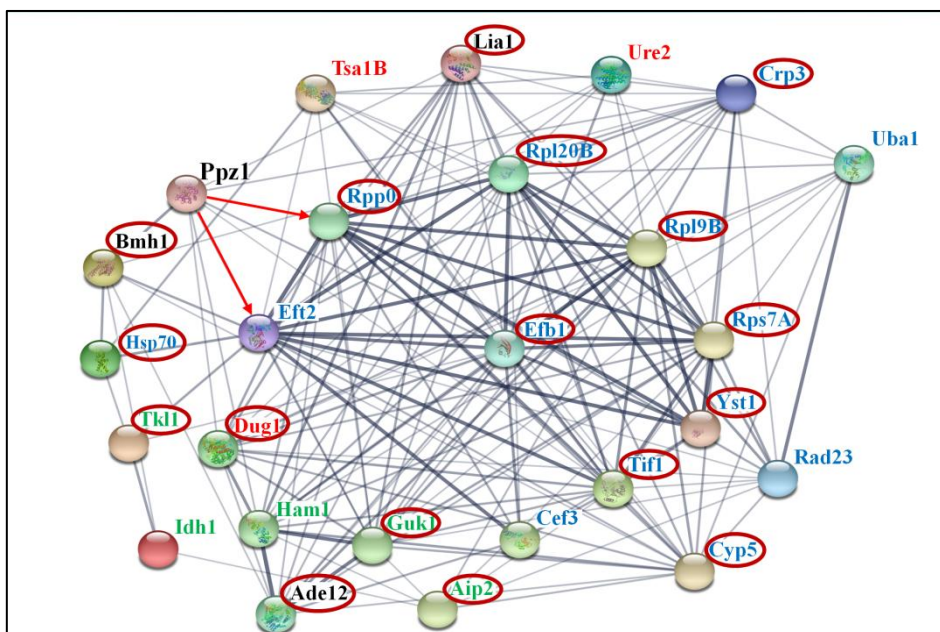
A CaPpz1 oxidatív stresszben való szerepét már korábban publikálták (Leiter és mtsai., 2012). Ezt alátámasztva sikerült 3 olyan oxidatív stresszel kapcsolatos fehérjét is kimutatnunk a *ppz1* mutáns törzsben, amelyeknek a mennyisége vagy a foszforilációja változott (27. ábra, 5. táblázat). Az Ure2 glutation peroxidáz aktivitással rendelkezik, és a Dug1-szerű Cys-Gly metallopeptidáz is a glutation metabolizmusban játszik szerepet, úgy, hogy a redukált glutationt bontja (Ganguli és mtsai., 2007). Tehát eredményeink arra utalnak, hogy a foszfátáz hiánya befolyásolhatja a redukált és oxidált glutation koncentrációját. Ezt a hipotézist munkánk második felében kísérletesen ellenőriztük. A Tsa1-nek tioreodoxin peroxidáz aktivitása van, a H₂O₂ valamint a szerves hidroperoxidok redukálását végzi, vagyis szerepet játszik az oxidatív stressz elleni védelemben. Beszámoltak arról is, hogy a Tsa1 segít a hifa sejt falának megfelelő felépítésében, ezért „feketemunkás” proteinként tartják számon (Urban és mtsai., 2005). A Tsa1-ről kimutatták ugyanis, hogy a hifa sejteknek a felszínén, míg az élesztősejteknek a citoplazmájában és sejt magjában található meg. A Tsa1 transzlokációja a hifa sejt falába valószínűleg az Efb1-től függ, ami azt sugallja, hogy a cAMP/PKA útvonal szerepet játszik a fehérje lokalizációjában (Urban és mtsai., 2005). A Tsa1 szintjének csökkenése valószínűleg összefüggésbe hozható az Efb1 szintjének csökkenésével (amit korábban már leírtam). Ebből az következik, hogy a foszfátáz hiánya befolyásolja a sejt felszíni fehérje eloszlást és szerepe lehet a gomba morfológiában is.

A fentiekkel összhangban azonosítottunk 3 proteint, az Ade12 (adenilszuccinát szintáz), a Bmh1 (14-3-3scaffold fehérje) és a Lia1-szerű (deoxihipuzin hidroxiláz) fehérjét, amelyek a morfológiai átalakulásban vesznek részt (27. ábra). Az Ade12 szintje megemelkedett CaPpz1 hiányában, míg a Bmh1 és Lia1-szerű fehérje szintje lecsökkent (5. táblázat). Ezek az adatok jól korrelálnak egy korábban közölt biofilm vizsgálat során kapott eredményekkel, ui. az Ade12 felülszabályozott, míg az Bmh1 és a Lia1-szerű fehérje alulszabályozott a biofilm képzés során (Nobile és mtsai., 2012). Továbbá az általunk azonosított fehérjék közül korábban 13-ról bizonyították, hogy az expressziós szintjük változik biofilm képzés alatt (Nobile és mtsai., 2012).

Ez a felismerés összecseng a GO term analízisünkkel (7. táblázat), ami arra utal, hogy a CaPpz1-nek szerepe lehet a biofilm képzésben. Feltevésünk alátámasztására elvégeztünk egy széleskörű adatbázis kutatást (14. Függelék), és azt találtuk, hogy az általunk kimutatott 25 fehérjéből 17 biofilm mátrix komponens vagy az adott fehérjét kódoló gén transzkripciója megváltozik a biofilm képzés alatt. A Cpr3, Cyp5, Guk1 és Tkl1 a biofilm mátrix felszínén helyezkednek el (14. Függelék). Az eredményeink szerint a Tkl1 mennyisége megnövekszik, míg a Cpr3 szintje csökken foszfataz hiányában, a KO sejtekben. A Cyp5 és a Guk1 szintje változatlan, viszont foszforiláltsági szintjük csökken ugyanebben a mutánsban (5. táblázat). Mindezen adatok arra sarkaltak bennünket, hogy kísérletesen megvizsgáljuk a *CaPPZ1* deléciónak hatását a biofilm képzésben (8. táblázat). Ennek érdekében összehasonlítottuk a kontroll és a *PPZ1* deléciós törzs biofilm képzését több kondícióban. Azt tapasztaltuk, hogy a gazdag RPMI-1640 tápoldatban nem történt különösebb változás a biofilm képzésben. Ezzel szemben a szelektív Spider médiumban végzett vizsgálatok azt mutatták, hogy a *ppz1* mutáns törzs erősebb biofilmet képez. Ez abból adódott, hogy a KO sejtek hifázó képessége alacsonyabb, nagyobb az élesztő sejtek aránya, ami kompaktabb struktúrát hozott létre (10. Függelék). Tehát bizonyítottuk, hogy a CaPpz1 foszfataznak szerepe van a biofilm képzésben. Ez egy olyan új funkció, amit eddig még nem írtak le.

Meg kell jegyezni, hogy a kísérletek során használt táplevesek közül egyik sem reprezentálja a szervezetben található fiziológiás körülményeket, tehát nem lehet egyértelmű fiziológiás következtetéseket levonni eredményünk fiziológiás jelentőségét illetően. Annak eldöntésére, hogy a CaPpz1 az élő szervezetben is szerepet játszik-e a biofilm képzésben, további vizsgálatokra van szükség.

Proteomikai vizsgálatunk összefoglalásaként létrehoztuk az általunk kimutatott 25 fehérje interakciós hálózatát. Az eredeti cikk (Márkus és mtsai., 2017) megírása idején a *C. albicans* proteinek kölcsönhatásait még nem ismerték eléggé, ezért *S. cerevisiae*-ben található ortológ fehérjék (14. Függelék) segítségével építettük fel az interaktómot String szoftver segítségével. A String szoftver (functional protein association networks) a fehérje interakciók alapján hoz létre fehérje hálózatot és jelzi az egyes fehérjék közötti lehetséges/biztos kapcsolatokat. A tudomány jelenlegi állapota lehetővé tette, hogy felépítsük a *C. albicans* fehérjék közötti kölcsönhatások hálózatát (28. ábra). Az új ábra nem csak abban különbözik a korábbitól, hogy ebben közvetlenül a *Candida* fehérjék szerepelnek, hanem abban is, hogy a vizsgálat során nem vettük figyelembe a gén alapú (kapcsolt öröklődés, géncsaládok, génfúzió) kölcsönhatásokat, ui. a *C. albicans* genetikai adatbázisa továbbra is meglehetősen hiányos.



28. ábra Az általunk azonosított *C. albicans* fehérjék interakciós hálózata

Az adott fehérjék részletes leírása a 14. Függelékben található meg. Az interaktómot a String 11.0 verziójú szoftverrel készítettük. A színes gömbök mutatják az interakciós hálózat egyes fehérjeit. A vonalak ismert/prediktált kölcsönhatásokat reprezentálnak a fehérjék között, az ellenőrzött adatbázisok és kísérletesen bizonyított adatok, valamint a szövegben való együttemlés és együttes expresszió alapján. A vonalvastagság a kapcsolat konfidencia erősségét jelzi. Két piros nyíl mutatja a CaPpz1 lehetséges szubsztrátjait. A téglavörös színnel bekarikázott fehérjék szerepet játszanak a biofilm képzésben (14. Függelék).

A hálózat központi magja a transzlációban szerepet játszó fehérjéket köti össze egymással több ponton is. A hálózat egyik legfontosabb csomópontja az Efb1 transzlációs faktor. Ezen kívül a Ppz1 két lehetséges szubsztrátja, az Eft2 és az Rpp0 is központi szerepet játszik. Az ábra jól mutatja, hogy a riboszómális fehérjék kapcsolatban állnak a transzlációs faktorokkal, és közösen a hálózat központját képezik. A chaperon és a scaffold fehérjék vagy a transzlációs faktorokhoz, vagy a riboszómális fehérjékhez csatlakoznak, ami arra utal, hogy ezeknek is a transzlációban van szerepük. A Guk1, Ham1 és az Ade12 nukleotid metabolizáló enzimfehérjék együtt egy alhálózatot hoznak létre. Általánosságban elmondható, hogy a metabolikus enzimek, a morfológiát befolyásoló fehérjék, valamint az oxidatív stressz válaszában szerepet játszó fehérjék alacsony konfidenciájú kapcsolatokkal rendelkeznek. Ezek a gyengébb kapcsolatok a másodlagos „feketemunkás” funkciókat mutathatják, amik például a sejtfelszíni mintázat megváltozása vagy a biofilm kialakítása révén kötik össze a látszólag egymástól független proteineket. A CaPpz1 morfológiában betöltött szerepét tükrözi a Bmh1-el való közepes erősségű kapcsolata. Az ábra mutatja azon feltételezésünket is, miszerint az Eft2 és a Rpp0 közvetlen célpontjai lehetnek a Ppz1 foszfatáznak. Mivel az Eft2 egy elongációs faktor, míg az Rpp0 egy riboszómális fehérje, fontos csomópontjai a hálózatnak,

kézenfekvő, hogy a Ppz1 ezen két fehérjén keresztül szabályozhatja a fehérje szintézist. A Rad23 és Uba1, a protein degradációban részt vevő két fehérje egymással kapcsolódik, de meglehetősen távol áll a Ppz1-től, ami alapján kétséges, hogy a Rad23 a foszfatáz szubsztrátja lenne.

7.2 A CaPpz1 szerepe a transzkriptom analízis szerint

Ebben a kísérletsorozatban egy rövid *t*BOOH kezelést alkalmazva vizsgáltuk a gomba gyors válaszát az oxidatív stressz hatásra. Több módszerrel (növekedés, CFU számlálás, mikroszkópia) is alátámasztottuk, hogy a kísérleti körülményeket megfelelően állítottuk be egy globális transzkriptomikai vizsgálathoz. Kimutattuk, hogy a szubletális koncentrációjú *t*BOOH-val végzett 1 órás kezelés kis mértékben indukálja a gomba hifa képződését, csökkent a sejtek növekedését, de nem öli meg azokat, annak ellenére, hogy gátolja a proliferációjukat (14. és 15. *ábra*). A KO sejtek esetében a *t*BOOH kezelés fungicid hatása igen jelentős (15. *ábra*), ami alátámasztja a foszfatáz és az oxidatív kezelés közötti kölcsönhatásra vonatkozó elképzelésünket. Ezt a kölcsönhatást megerősítette az antioxidáns enzimek aktivitásának emelkedése, valamint a redukált és oxidált glutation koncentrációk eltolódása is. Biokémiai vizsgálataink arra utaltak, hogy a sejtek redox státuszát a foszfatáz hiánya és az oxidatív kezelés külön-külön is befolyásolja, de a két hatás egymást felerősíti, vagyis szinergizmus lép fel köztük. Fontos megjegyezni azt, hogy a KO törzzsel kapott enzimaktivitás változások önmagukban is új eredménynek számítanak, mert rámutatnak arra, hogy a CaPpz1 hogyan befolyásolhatja a *C. albicans* oxidáló szerekekkel szembeni érzékenységét. A fiziológiai és biokémiai vizsgálatok eredménye alapján magabiztosan kezdhettük el a nagy költség és idő igényű transzkriptomikai vizsgálatokat.

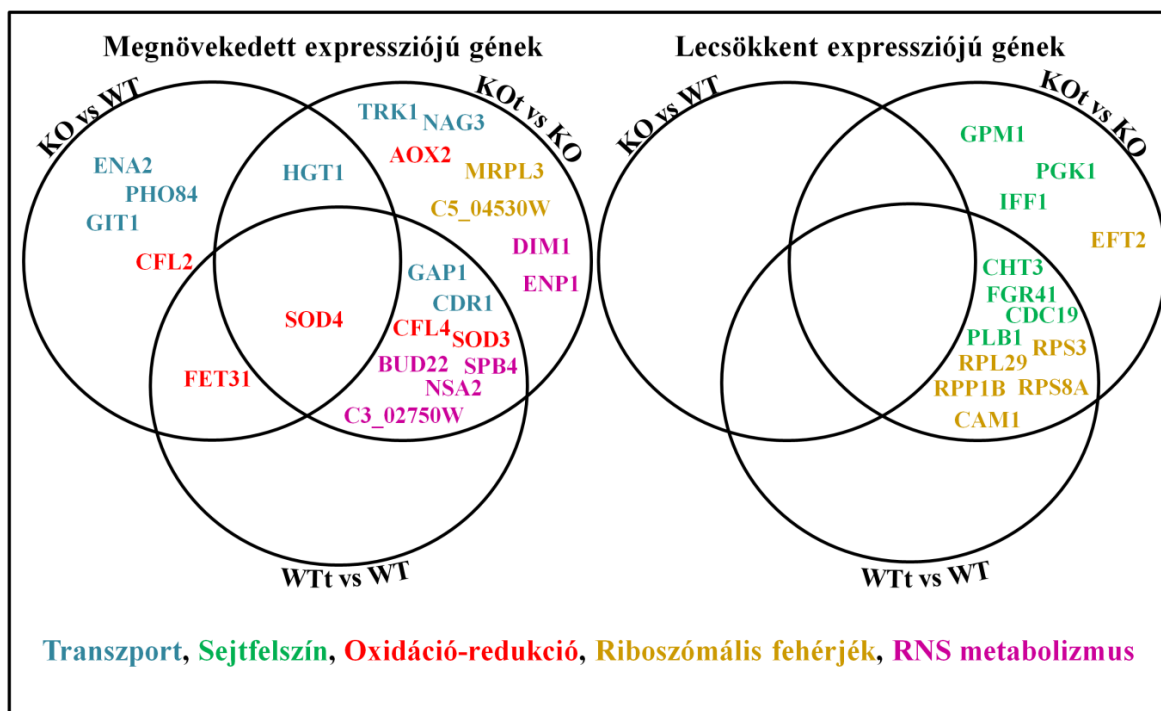
Összesen 3 módszert alkalmaztunk a kezelt és kezeletlen sejtek génexpressziójának meghatározására (13. *Függelék*). A DNS chippel végzett előkísérlet során azt tapasztaltuk, hogy a foszfatáz hiánya (KO vs. WT) és a kezelés (WTt vs. WT) önmagában csak kis vagy közepes változásokat okozott, viszont a kettő együttesen (KOt vs. KO) jelentősen megváltoztatta a *C. albicans* génexpresszióját (16. *ábra*). Erre a megfigyelésre építettük a nagyszámú mintával reprodukálható módon megvalósított RNS szekvenálás sorozatot. Ennek eredményei szintén azt mutatták, hogy a foszfatáz hiánya és az oxidatív stressz kezelés önmagában csak kismértékű transzkriptom változást okoz, ezzel szemben a kettő együttesen markánsan megváltoztatja a *Candida* génexpressziós profilját (18. *ábra*). Fontos megjegyezni azt is, hogy közel azonos számú gén megváltozását detektáltuk a két módszerrel. A két

különböző elven alapuló módszer összehangja jelezte, hogy reális adatokat kaptunk, amelyek feldolgozása reális eredményekre vezet. Az RNA-Seq adatok DNS chip adatokkal való összevetése után megállapítottuk, hogy azok jól korrelálnak egymással, kivéve KO vs. WT összehasonlítást (11. *Függelék*). Ennek háttérében valószínűleg az áll, hogy a KO törzsben kevés expressziós változást mutató gént találtunk, amelyek változása ráadásul nem volt nagymértékű. A kisszámú adat jelentős szórása tehát nem tette lehetővé azt, hogy a foszfatáz hiány hatásának megállapításakor a DNS chip adatokra támaszkodhassunk. A többi összehasonlításban azonban a DNS chip adatokat tájékoztató információként fel tudtuk használni. Természetesen az RNA-Seq eredmények sokkal meggyőzőbbek, ui. a három párhuzamos kísérlet lehetővé tette az adatok szigorú statisztikai elemzését. Továbbá a genom lefedettsége jóval szélesebb volt, ui. RNS szekvenálással több mint 40x lefedettséget értünk el, míg DNS chippel csak 7x-t. Ezért következtetéseinket az RNS szekvenálás adataira alapoztuk. Ezeket az adatokat számos általunk fontosnak ítélt gén esetében RT-qPCR segítségével támasztottuk alá.

Ha technikai szempontból összevetjük a 3 transzkriptomikai módszert, elmondhatjuk, hogy a DNS chip hibridizáció volt a leggyengébb, hiszen ezt csak 1-szer végeztük el, ezt követte az RNA-Seq, ami 3 biológiai párhuzamos mintával készült, végül az RT-qPCR, amit 5-ször ismételtünk meg. Az RNA-Seq reprodukálhatóságát két módszerrel is ellenőriztük (klaszter analízis és PCA), amellyel bizonyítottuk az adatok megbízhatóságát (17. *ábra*). Az RT-qPCR adatokat is ellenőriztük PCA-val. Annak ellenére, hogy a vizsgált géneket a jelentős génexpressziós változások alapján és nem véletlenszerűen választottuk ki, az analízis szerint a változások tendenciája megmaradt a szelektált és szűkített adatkészletben is (12. *Függelék*). A statisztikai számítások (ANOVA és t-teszt) szerint az eredmények többsége jól reprodukálható volt, de adódott néhány olyan gén is, melynek expresszió-változása túl variábilis maradt, még akkor is, ha a mérések számát tovább növeltük. Szigorú feltételünk szerint csak azokat a változásokat tekintettük mérvadónak, amelyek mind az RNA-Seq, mind az RT-qPCR módszerrel szignifikánsnak bizonyultak (13. *Függelék*).

Az adatokat egy teljes körű gén ontológiai elemzésnek vetettük alá, hogy megtudjuk, melyek azok a funkció, lokalizáció vagy folyamat szempontjából összetartozó gének, amelyek érintettek a foszfatáz hiányában és az oxidatív stressz alatt. A GO term analízis után láthatóvá vált, hogy a foszfatáz hiánya csak néhány folyamatot érint, míg a tBOOH kezelés számos folyamatot megzavar és a kettő együttesen egy markáns génexpressziós változást hoz létre (10. *táblázat*). Az adatokat elemzése alapján végül öt fő géncsoportot különítettünk el, amelyek a membrán transzport, sejtfelszín, oxidáció-redukció, riboszómális fehérjék és RNS

metabolizmus kategóriákkal álltak kapcsolatban. Az egyes csoportok szigorú ellenőrzése után hőtérképeket készítettünk, hogy kvantitatív képet alkossunk a génexpressziós változásokról (19. *ábra*). Miután a hőtérképeket átnéztük és összevetettük az elérhető irodalmi adatokkal, kiválasztottuk azt a 44 db gént (13. *Függelék*), amelyeknek expresszióját RT-qPCR módszerrel kívántuk megerősíteni. A kiválasztás szempontjait a 6.2.6 *fejezetben* ismertettem. Az egyes géncsoportok relatív expresszióját a 20-24. *ábrák* mutatják. A végső konklúziók levonása érdekében összevetettük az RNA-Seq és az RT-qPCR módszerekkel kapott eredményeket. A kiértékelés során a 13. *Függelék* adatait vettük figyelembe, ui. ebben a táblázatban a transzkriptomikai adatok mindegyikét azonos formátumban ($\log_2FC$) és azonos statisztikai elemzés alapján egymással közvetlenül összevethető módon adtuk meg. A szigorú statisztikai elemzés szerint mérvadónak tekintett változásokat Venn-diagramon mutatjuk be (29. *ábra*).



29. ábra A *CaPPZ1* mutáció és oxidatív stressz által kiváltott génexpressziós változások összefoglalása

Az ábra azokat a kiválasztott géneket tartalmazza, amelyek szignifikáns expressziós változását RNS szekvenálással és RT-qPCR-el is alátámasztottuk. A megnövekedett és lecsökkent génexpressziót külön diagramon mutatjuk be és az egyes géncsoportok tagjait színekkel különböztettük meg. Az összehasonlítások mutatják a mutáció (KO vs. WT), a *tBOOH* kezelés (WTt vs. WT), valamint a kettő együttes hatását (KOt vs. KO). A színek az adott funkciókat jelzik.

Az általunk kiválasztott gének közül összesen 7 gén expressziójának változását bizonyítottuk a foszfátáz hiányában. Ezek közül 4 a transzport folyamatokban vesz részt, míg 3 az oxidáció-redukció folyamatában. A választás egyoldalú volt abból a szempontból, hogy egyetlen gén expressziója sem csökkent a mutáció hatására. Az oxidatív kezelés önmagában 19 gén expresszióját változtatta meg, ebből 9 emelkedett, 10 pedig csökkent expressziót mutatott. Egyöntetűen nőtt a transzport és az RNS metabolizmus gének kifejeződése; míg csökkent a sejtfelszíni és a riboszómális fehérjéket kódoló gének expressziója. Végezetül a legnagyobb változásokat az oxidatív stressznek kitett KO törzsben tapasztaltuk. Sikert 30 génről egyértelműen bizonyítani az mRNS szintük változását. Ezek magukba foglalják az összes szelektált funkcionális kategóriát. Az eredményekből levonható következtetéseket az alábbiakban részletezem.

7.2.1 A *CaPpz1* új funkciói

Arra kerestük a választ, hogy milyen folyamatokban vesz részt a *CaPpz1* foszfátáz. Ehhez összehasonlítottuk a foszfátáz hiányos törzs génexpresszióját a kontroll törzsével (KO vs.

WT). Az RNA-Seq adatai alapján azt találtuk, hogy csak kevés gén expressziója változott meg a foszfatáz delécio következtében. Összesen 55 gén mRNS szintje változott meg több mint kétszeresen, amiből 51 felül-, míg 4 gén alul-szabályozódott (18. ábra). A GO term analízis alapján az érintett gének főleg a membrántranszport vagy az oxidációs-redukációs folyamatok csoportjába sorolhatók.

A transzpor folyamatokat illetően összesen 12 gén expresszióját vizgáltuk RT-qPCR-rel (20. ábra). Irodalmi adatok alapján azt vártuk, hogy a Na^+ transzportért felelős gének expressziója megváltozhat a foszfatáz hiányos törzsben, ui. ismert, hogy a *C. albicans* KO törzs jól tolerálja a sókezelést (Ádám és. mtsai., 2012) és tudjuk, hogy *S. cerevisiae*-ben a Ppz1 az Ena1 nátrium transzporter aktiválásán keresztül szabályozza a Na^+ kipumpálását (Posas és mtsai., 1995). Az Ena1 fehérje hasonló a *C. albicans*-ban található Ena2 valamint az Ena21 P-típusú ATPázok-hoz. Ezzel összhangban egy korábbi microarray kísérlet során azt találták, hogy *C. albicans* SC5314 sejtekben 0,3 M NaCl-dal való 1 órás inkubációt követően mind az *ENA2*, mind az *ENA21* gén expressziója indukálódott (Enjalbert és mtsai., 2003). Munkánk során egyértelműen sikerült bizonyítanunk az *ENA2* gén megnövekedett expresszióját KO törzsben (13. Függelék). Ezzel a kísérlettel sikerült igazolnunk a foszfatáz sóháztartásban kifejtett egyik hatásmechanizmusát. Azt is leírták, hogy *S. cerevisiae*-ban a foszfatáz a Trk1 kálium transzporterén keresztül befolyásolja az ozmotikus stabilitást (Yenush és mtsai., 2005). Eredményeink szerint a foszfatáz hiánya önmagában nem változtatta meg a *TRK1* gén expresszióját, tehát a CaPpz1 nem a transláció, hanem valószínűleg a posztranszlációs módosítás szintjén szabályozza a Trk1 fehérjét úgy, ahogy azt a *S. cerevisiae* ortológja is teszi (Yenush és mtsai., 2005).

Ezen kívül több olyan transzport folyamatban is kimutattunk a CaPpz1 szerepét, amit eddig még nem írtak le. A *PHO84* foszfát, a *GIT1* glicerofoszfo-inozitol és a *HGT1* glükóz transzporter kódoló gének expressziója egyaránt növekedett a KO *Candida* sejtekben (13. függelék). A *PHO84* transzkripció szabályozása azért érdekes, mert a Pho84-ről kimutatták, hogy a *TORC1* (Target of Rapamycin complex 1) potenciális regulátora, ami a sejtnövekedést szabályozza (Liu és mtsai., 2017). A Git1 által felvett glicerofoszfoinozitol a sejtekben inozitol és foszfát forrásként szolgál (Bishop és mtsai., 2011). A Hgt1-ről kimutatták, hogy egy nagy affinitású glükóz transzporter, amelynek expressziója megnövekedett különböző gyógyszerek jelenlétében, mint a cycloheximide, klóramfenikol (Varma és mtsai., 2000). Ebből arra lehet következtetni, hogy szerepet játszhat a gyógyszerrezisztencia kialakításában.

Eredményeink megerősítették a CaPpz1 szerepét a nátrium transzportban és felhívták a figyelmet arra, hogy ez a foszfataz az eddigi ismereteinken felül még három fontos transzmembrán transzport folyamatot is szabályozhat.

A CaPpz1 oxidatív stressz válaszban betöltött szerepét korábban már leírták, de ennek háttere ismeretlen maradt (Leiter és mtsai., 2012). A biokémiai vizsgálatok rávilágítottak arra, hogy a CaPpz1 képes a patogén gomba oxidatív állapotát befolyásolni az oxidoreduktáz enzimek aktivitásának megváltoztatásával (9. táblázat). Ezt az új megfigyelést figyelembe vettük a további vizsgálatok során. Összesen 9 gén expresszióját ellenőriztük RT-qPCR-rel. Az RNA-Seq alapján 3 gén (*CFL2*, *FET31*, *SOD4*) expressziója növekedett meg szignifikánsan a KO törzsben (19. ábra), amit RT-qPCR-rel is bizonyítottunk, tehát ezeknek a géneknek a szabályozásában szerepe lehet a CaPpz1-nek (13. Függelék). A *CFL2* (oxidoreduktáz) és a *FET31* (multiréz oxidáz) oxidázokat kódoló gének expressziójának változása arra enged következtetni, hogy a CaPpz1-nek szerepe lehet a vas transzportban, mivel ezeknek a géneknek a terméke vas reduktáz aktivitással rendelkezik (Murad és mtsai., 2011; Eck és mtsai., 1999). Az adataink összhangban vannak egy korábbi közleménnyel, miszerint a *fet31* deléciós mutáns nem volt képes növekedni alacsony vaskoncentráció mellett (Eck és mtsai., 1999). Azt is leírták, hogy alacsony vaskoncentráció mellett a *CFL2* gén expressziója megnövekedett (Lan és mtsai., 2004). A *SOD4* által kódolt szuperoxid dizmutáz esetében láttuk a legmarkánsabb változásokat. Valószínűsíthető, hogy a *SOD4* megemelkedett szintje segíti a mutáns sejtek túlélését oxidatív stressz körülmények között. Ez összhangban van az enzimaktivitás mérésekkel, ui. a SOD enzim aktivitása megemelkedett a KO sejtekben (19. táblázat), tehát elképzelhető, hogy a SOD enzim aktivitását a CaPpz1 már a transzláció szintjén befolyásolhatja. A *CAT1* gén expresszióját vizsgálva nem tapasztaltunk emelkedést, habár a kataláz enzimaktivitása szignifikánsan megnőtt a KO sejtekben (19. táblázat). A glutation metabolizmusban részt vevő 2 enzim (glutation peroxidáz és reduktáz) expressziója szintén nem változott a KO sejtekben (nem közölt adat). Ebből valószínűsíthető, hogy a CaPpz1 poszttranszlációsán módosíthatja ezen enzimeket, ezáltal befolyásolva aktivitásukat.

7.2.1 Az oxidatív stressz válasz

Az enyhe oxidatív stressz transzkriptomikai hatása mérsékelt volt. 196 gén expressziós szintje változott meg szignifikánsan. Ebből 132 gén expressziója megnövekedett, míg 64 expressziója lecsökkent (18. ábra). A GO term analízisünk számos funkciót mutatott ki, ezek

közül a sejtfelszín, oxidoreduktáz aktivitás és a transzláció volt a kiemelkedő (10. táblázat). Ezen kívül néhány gén érintett a transzport folyamatokban és az RNS metabolizmusban is.

Az oxidatív stressz önmagában négy gén expresszióját növelte meg. Ezek közül a *FET31* és a *SOD4* mRNS szintje a kezeletlen KO sejtekben is megemelkedett, ami arra utal, hogy az oxidatív stressz és a foszfatáz hiánya azonos célpontokra irányul. Ezzel összhangban áll, hogy a *CFL4* és a *SOD3* expressziója szintén megemelkedett az oxidatív kezelés hatására (29. ábra). Ismeretes, hogy a *CFL4* és *FET31*, valamint foszfatáz hiányában megnövekedett expressziójú *CFL2* is a vas metabolizmusban játszik szerepet. Korábban leírták, hogy *CFL4* és a *CFL2* gén expressziója is indukálódott alacsony vas koncentráció mellett (Lan és mtsai., 2004). Tehát a vas transzport szabályozása közös pont lehet a foszfatáz hiány és az oxidatív stressz jelátviteli útvonalaiban. A *SOD3* azonos funkciót lát el, mint a *SOD4*. Eszerint a SOD enzimek expressziójának emelkedése egy újabb mechanizmus, ami összeköti a foszfatáz hiányát az oxidatív stressz elleni védelemmel.

A transzport folyamatok közül csak a *GAP1* aminosav transzporter és a *CDR1* ABC transzporter gének expressziója emelkedett *tBOOH* kezelés hatására (WTt vs. WT) (29. ábra). A *GAP1* által kódolt fehérje szerepet játszik a külső nitrogénforrás biztosításában és a morfogenezisben (Kraidlova és mtsai., 2011). A *Cdr1* ABC transzporter számos kémiai anyag (pl.: fluconazol) kipumpálását végzi, ezáltal a gomba kémiai vegyületekkel szembeni rezisztenciájában van fontos szerepe (Sanglard és mtsai., 1996). Ez azt mutatja, hogy az oxidatív stressz megváltoztathatja azon transzport folyamatokat, amelyeknek a gomba védelmi mechanizmusaiban van szerepe.

Összesen 4 sejtfelszínnel kapcsolatos gént sikerült azonosítanunk, amelyek expressziója lecsökkent oxidatív kezelés hatására (29. ábra). A *Cht3* kitináz szerepet játszik a sejtfalban található kitin átrendezésében (Dünkler és mtsai., 2005). Az *Fgr41*-nek szerepe lehet a gomba virulenciájában és a sejtadhézióban (Chaudhuri és mtsai., 2011). A foszfolipáz B (*PLB1*) egy lipolitikus enzim, amely virulencia faktorként is funkcionálhat (Leidich és mtsai., 1998), míg a *Cdc19* (piruvát kináz), amellel hogy a glikolízisben játszik szerepet (Swoboda és mtsai., 1994), antigén sajátosságokkal bír (Swoboda és mtsai., 1993). Korábban már leírták a sejtfelszínnel asszociált gének expressziójának csökkenését H_2O_2 hatására (Dantas és mtsai., 2015). Eredményeink összhangban állnak ezzel a közleménnyel.

Általánosságban elmondható, hogy az oxidatív kezelés önmagában, kis mértékben csökkentette 5 citoszólikus riboszómális fehérjét kódoló gén expresszióját (29. ábra). A fehérjék között található 3 citoszólikus riboszómális alegység (*RPL29*, *RPS3* és *RPS8A*) valamint a riboszómához kötődő Rpp1B savi riboszómális fehérje és a Cam1 transzlációs elongációs faktor. Ebből arra következtethetünk, hogy az oxidatív stressz hatására lecsökkent fehérje szintézis lehet az oka a sejtek alacsony kolóniaformáló képességének (14B. ábra). Korábban vizsgálták a *Candida* sejtek makrofág általi bekebelezése utáni korai transzkripciós választ, és számos transzlációt érintő gén csökkent expressziójáról számoltak be (Lorenz és mtsai., 2004). A publikált adatok jól egyeznek eredményeinkkel, ui. a fent említett öt génből négyről Lorenz és mtsai. is azonos eredményt kaptak. Az *RPL29* gén expressziójának csökkenését csak nekünk sikerült kimutatni, ami azzal is összefüggésbe hozható, hogy mi több riboszómális alegységet vizsgáltunk. Ebből az egyezésből arra következtethetünk, hogy a *Candida* sejtek transzlációjának szuppressziója fagocitózis során a makrofágok belsejében bekövetkező oxidatív állapot robbanásának tudható be.

Egyik új megfigyelésünk az, hogy az RNS metabolizmusban szerepet játszó gének expressziója megnövekedett oxidatív stressz hatására. A hőtérképen feltüntetett 132 gén közül 30 gén indukálódott *tBOOH* kezelés után (19E. ábra). RT-qPCR-rel 4 gén estében bizonyítottuk az eredeti megfigyelést (29. ábra). A Bud22 a 18S rRNS érésében játszik szerepet, míg az Nsa2-t a 66S preriboszóma komponenseként tartják számon. Az Spb4 RNS helikáz a 60S riboszóma alegységek szintézisében vesz részt és a C3_02750W ribonukleáz III doménnel rendelkezik. Korábbi publikációk arról számoltak be, hogy az rRNS érésben résztvevő gének expressziója csökken a sejtfalat (Boorsma és mtsai., 2004) vagy a sejtmembránt érintő stressz hatásokra (Bruno és mtsai., 2006). Mivel eredményeinket három egymástól független adatsor (DNS chip, RNS-Seq, RT-qPCR) is alátámasztotta (13. Függelék) úgy gondoljuk, hogy az általunk kimutatott újszerű stressz válasz reprodukálható, vagyis a sejt integritást érintő stresszel szemben az oxidatív stressz alatt az RNS metabolizmus felgyorsul.

7.2.3 A *CaPpz1* szerepe az oxidatív stressz válaszbán

A foszfatáz hiánya és a *tBOOH* kezelés együttesen okozta a legmarkánsabb változásokat. A KO_t sejtekben ui. 934 gén mRNS szintje változott meg a kezeletlen KO sejtekhez képest, amelyből 533 felregulálódott, míg 401 alulszabályozódott (18. ábra). Azok a gének,

amelyekre önmagában is hatott a *tBOOH* kezelés, még nagyobb mértékben reagáltak és ezen kívül feljöttek olyan gének is, amelyek eddig nem mutattak jelentőst változást (29. *ábra*). Tehát a foszfatáz hiánya felerősítette az oxidatív stressz hatását.

A KOt sejtekben 5 transzport folyamatokban érintett gén (*HGT1*, *GAP1*, *CDR1*, *TRK1* és *NAG3*) expressziója növekedett meg. Ezek között van a *HGT1* gént, amelyre önmagában hatott a foszfatáz hiánya, de a kezeléssel kombinálva ez a hatás felerősödött, valamint a *GAP1* és *CDR1* gének, melyek expressziója *tBOOH* hatására már a WT törzsben is megnövekedett, de a mutáns genetikai hátterében ez a változás még jelentősebbé vált (29. *ábra*). Ahogy korábban már említettem, a Gap1-nek szerepe van a külső nitrogénforrás biztosításában és a morfogenezisben (Kraidlova és mtsai., 2011), míg a Cdr1 kémiai anyagok kipumpálását végzi, ezáltal a különböző kémiai vegyületekkel szembeni rezisztencia kialakításában van szerepe (Sanglard és mtsai., 1996). A *TRK1* (K^+ transzporter) és a *NAG3* (MFS transzporter) gének expressziója csak KOt törzsben emelkedett meg jelentős mértékben (29. *ábra*). A Trk1 és Ppz1 közötti kölcsönhatást már leírták (Yenush és mtsai., 2005), de hogy ez a transzkripció szintjén is megvalósulhat, azt csak az oxidatív stressz körülményei között lehetett kimutatni. A Nag3 MSF transzporternek (Major facilitator superfamily) szerepe van az N-acetilglükózamin felvételben (Wendland és mtsai., 2009) és egyes kémiai anyagokkal szembeni rezisztencia kialakításában (Yamada-Okabe és Yamada-Okabe, 2002). Az utóbbi funkcióban hasonlít a Hgt1 glükóz transzporterhez. Tehát a KO törzsben két pumpa is biztosíthatja az oxidáló szer eltávolítását és a túlélést. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a CaPpz1-nek az ABC transzporterek módosítása révén szerepe lehet a gyógyszer rezisztencia kialakításában.

Az oxidáció-redukció folyamatában szerepet játszó gének közül a KO sejtekben a *SOD3*, *SOD4*, *CFL4* és az *AOX2* érzékenyen reagált a *tBOOH* kezelésre (29. *ábra*). Ezek közül a *SOD3*, *SOD4* és *CFL4* a WT törzsben is növekedett a *tBOOH* kezelés hatására, azonban ez a sejtválasz jelentősen felerősödött a *PPZ1* hiányos törzsben. Emellett erős indukciót tapasztaltunk az indukálható alternatív oxidáz (*AOX2*) génexpressziójában (13. *Függelék*). Az Aox2 oxidáz a NADH oxidációját végzi az alternatív légzési útvonalon (Huh és Kang, 1991 és 2001), és megemelkedett génexpresszióját H_2O_2 -vel és menadianonnal kiváltott oxidatív stressz hatására már korábban publikálták (Huh és Kang, 2001). A különösen nagymértékű változás (22. *ábra*) aláhúzza az alternatív oxidáz szerepét a mutánsban kiváltott stressz során. A biokémiai mérésekkel minden esetben emelkedett oxidatív enzimaktivitásokat kaptunk KOt

sejtekben, ami részben a protektív oxidázok expressziójának megnövekedésével magyarázható.

A sejtfelszíni fehérjék alulszabályozását oxidatív stressz alatt már korábban leírtuk. Azt tapasztaltuk, hogy ezt a hatást a *CaPPZ1* gén deléciója felerősítette, ui. az általunk vizsgált 7 gén mindegyikének lecsökkent az expressziója. Ezeket két nagy csoportra oszthatjuk: a felszíni fehérjéket kódoló (*CHT3*, *FGR41*, *IFF11*) és a szimbionta folyamatokban résztvevő (*PLB1*, *GPM1*) gének csoportjára. A GO term analízis szerint a *CDC19* és a *PGK1* gén mindkét csoportba beilleszthető (19B. ábra). A foszfataz mutációja felerősítette a *CHT3* (kitináz), *FGR41* (adhezín-szerű fehérje), *PLB1* (foszfolipáz B) és a *CDC19* (piruvát kináz) gének expressziójának *tBOOH* kezelés során megfigyelt csökkenését. Az *IFF1* (szekretált fehérje), a *PGK1* (foszfoglicerát-kináz) és a *GPM1* (foszfoglicerát-mutáz) gének mRNA szintje viszont csak a kezelt KO sejtekben csökkent jelentős mértékben. A *PGK1*, *GPM1* és a *CDC19* gének termékét „feketemunkás” fehérjeként tartjuk számon, ugyanis egyrészt metabolikus enzimeként működnek a citoszólban, másrészt a sejtek felszínén szimbionta folyamatokban vesznek részt. A virulenciát felelős gének (*PGK1*, *GPM1*, *CDC19*) oxidatív stressz általi szupresszállása, főleg a foszfataz hiányos törzsben, fontos lehet később az antifungális terápiák kifejlesztése szempontjából is.

A hőtérkép alapján nagymértékű génexpressziós változást tapasztaltunk a kezelt KO törzsben a riboszómális gének expressziójában. Mivel kétféle mintázatot kaptunk, ui. a citoszólikus riboszómális fehérjéket kódoló gének expressziója lecsökkent, míg a mitokondriális riboszómális fehérjéket kódoló gének expressziója megnövekedett, kettéválasztottuk és külön ábráztuk a citoszólikus és a mitokondriális riboszómális fehérjéket (19D. ábra). A citoszólikus riboszómális fehérjéket kódoló gének közül 7 gént vizsgáltunk meg RT-qPCR-el (29. ábra). Ezek közül 1 riboszómális nagy alegység (*RPL29*), 2 riboszómális kis alegység (*RPS3*, *RPS8A*), az *RPP1B* savi riboszómális fehérje és a *CAM1* elongációs faktor génje esetében a foszfataz hiánya felerősítette a *tBOOH* kezelés hatását; az *RPL5* (riboszómális nagy alegység) esetében nem tapasztaltunk szignifikáns változást és a KO törzsben az *EFT2* (transzlációs elongációs faktor) expressziója szignifikánsan lecsökkent (13. Függelék). Az Eft2 szerepet játszik a gombasejtek növekedésében (Mendoza és mtsai., 1999). A proteomikai vizsgálataink során azt találtuk, hogy az Eft2 szubsztátja lehet a CaPpz1-nek, mivel foszforiláltsági szintje megemelkedett a KO törzsben (27. ábra), de a foszfataz hiányában génexpressziós szinten nem detektáltunk szignifikáns változást sem a hosszú távú (6.

táblázat), sem a rövid távú tenyésztés során (13. *Függelék*). Tehát valószínűsíthető, hogy a CaPpz1 elsősorban poszttranszlációs szinten szabályozza az Eft2 fehérjét, de mivel az oxidatív kezelés lecsökkentette az *EFT2* gén expresszióját KO törzsben, lehetséges, hogy az oxidatív stressz alatt az Eft2-t mRNS szinten is szabályozza a CaPpz1.

Azt tapasztaltuk, hogy a mitokondriális riboszóma kapcsolatos gének szintje egységesen megemelkedik a KOt törzsben. Ennek alátámasztására 3 mitokondriális riboszóma fehérje kódoló gén expresszióját vizsgáltuk meg (23. *ábra*). Ebből az *MRPL3* (riboszómális nagy alegység) és C5_0453W (riboszómális kis alegység) esetében bizonyítottuk az mRNS szint növekedését tBOOH kezelt KO törzsben (29. *ábra*). Az *IFM1* (transzlációs iniciációs faktor) nem mutatott szignifikáns változást. A mitokondriális riboszóma abban különbözik a citoszolikus riboszómától, hogy a mitokondriumban található és a mitokondriális genom által kódolt fehérjék szintézisét végzi. Emellett a mitokondriális riboszóma prokarióta eredetű, összetétele más, mint a citoszolikus riboszómáé (rRNS és fehérje szinten is). Az összetételben, lokalizációban és eredetben való különbségek miatt gondolhatjuk, hogy a szabályozásuk is különbözhet. A citoszolikus és mitokondriális riboszóma ellentétes szabályozását már korábban publikálták (Lorenz és mtsai., 2004) azzal a magyarázattal, hogy a mitokondriális riboszóma esszenciális funkciókat lát el a fagocitózis által kiváltott stressz során. Mivel a fagocitózis során a makrofágok belsejében oxidatív állapot alakulhat ki, valószínű, hogy ezért növekedik meg a mitokondriális riboszómális génexpresszió oxidatív kezelés hatására a KO törzsben.

Végül az RNS metabolizmus génjei egységes módon kisebb vagy nagyobb mértékben indukálódtak. Összesen 6 gén expresszióját vizsgáltuk meg RT-qPCR-el és bizonyítottuk mind a 6 gén expressziójának szignifikáns növekedését KOt törzsben (29. *ábra*). 4 gén (*BUD22*, *NSA2*, C3_02750W és *SPB4*) expressziója megnövekedett tBOOH kezelés hatására a WT törzsben, és ez a növekedés felerősödött a foszfatáz hiányában (29. *ábra*). Emellett a *DIM1* rRNS dimetiláz és a pre-RNS érés szabályozásában szerepet játszó *ENP1* gének expressziója növekedett meg a KOt sejtekben (29. *ábra*). A Bud22 a 18S rRNS érésében vesz részt; míg az Nsa2 a 66S preriboszóma komponense. A Dim1 18S rRNS dimetilázként szerepet játszhat az rRNS módosításban és érésében, míg az *ENP1* gén terméke szükséges a pre-RNS érésben és a 40S riboszómális alegység szintézisében. Az Spb4 RNS helikáz a 60S riboszóma alegységek szintézisében vesz részt, míg a C3_02750W ribonukleáz III doménnel rendelkezik. Mivel a *BUD22*, *NSA2*, *DIM1* és *ENP1* gének a pre-rRNS érésben vesznek részt,

lehetséges, hogy a már előre legyártott preriboszómák így össze tudnak szerelődni a rövidtávú stressz alatt, segítve ezáltal a gomba védekezését az oxidatív stressz ellen.

Mivel a transzlációban szerepet játszó citoszólikus riboszómális fehérjekódoló gének expressziója lecsökkent oxidatív stressz alatt, míg az RNS metabolizmus kapcsolt gének expressziója megnövekedett, úgy gondoltuk, hogy az 1 órás oxidatív stressz kezelés alatt megváltozhat a különböző rRNS fajták szintje. Másrészt a transzláció hiánya miatt bekövetkező csökkent fehérjeszint a riboszómák degradációjához vezet. Viszont a mitokondriális riboszómákról úgy véltük, hogy nem változik a mennyiségük, az emelkedett riboszómális fehérje szintek miatt. Mindezen okok miatt megvizsgáltuk az RNS érés folyamatát. Az RNS érés során több lépésen keresztül jönnek létre az rRNS-ek, amelyek felépítik a riboszóma kis és nagy alegységeit (25. *ábra*). A folyamat ellenőrzése során vizsgáltuk az rDNS elsődleges átiratait, továbbá az átmeneti és az érett citoszólikus és mitokondriális rRNS kis és nagy alegységek szintjeit. Azt találtuk, hogy nem történt számottevő változás az rRNS mennyiségekben sem a foszfatáz hiányában, sem oxidatív stressz hatására. Ez alól kivételt jelentettek az ITS1, RDN25 és RDN5 régiók az rDNS-ben (26. *ábra*), mivel ezek mennyisége megváltozott. Az ITS1 régió (internal transcribed spacer) az érés során kivágódik, tehát mennyiségi változása valószínűleg a gyors processzálnak tudható be. Az RDN25 a 25S riboszómális RNS-t, míg az RDN5 az 5S riboszómális RNS-t kódolja, amelyek a nagy (60S) riboszómális alegység komponensei. Ezek változása azonban kismértékű volt (26. *ábra*). Ismeretes, hogy az rRNS-el szorosan kapcsolatban álló riboszómális fehérjék stabilak, míg az rRNS-hez átmenetileg kapcsolódó, érési folyamatokban részt vevő fehérjék hamar lebomlanak (Warner és mtsai., 1972). Az átmenetileg kapcsolódó fehérjék azonban folyamatosan újratermelődnek, ezáltal állandó tagjai a sejtagnak, míg a permanensen kötődő fehérjék csak átmeneti tagjai a sejtági környezetnek. Az általunk kapott eredmények azt sugallják, hogy a felerősödött rRNS szintézis és processzáln, valamint a riboszómák stabilitása együttesen biztosíthatják a sejtek számára az állandó riboszóma számot, legalábbis egy rövidtávú oxidatív stressz alatt, annak ellenére, hogy a riboszómális proteinek mRNS szintje lecsökken oxidatív stressz alatt. Lehetséges, hogy a riboszómális RNS azért marad intakt a stressz kezdeti szakaszában, hogy 1-2 óra elteltével a stressz megszűnése után a sejtek minél gyorsabban helyre tudják állítani a fiziológiás körülményeket.

Összefoglalva transzkriptomikai eredményeinket, kimutattuk, hogy a szubletális *tBOOH* koncentrációval kiváltott rövid oxidatív stressz csökkentette a sejtek proliferációs képességét, de nem ölte meg azokat. A *tBOOH* fungisztatikus hatása a foszfatáz hiányos törzs esetében

sokkal markánsabb volt. Transzkriptomikai vizsgálatainkkal feltártuk, hogy a foszfatáz hiánya befolyásolja a membrán transzportot és az oxidációs-redukciós folyamatokat, ami megmagyarázza a deléciós mutáns törzsre jellemző fenotípusokat. Ezen kívül a CaPpz1 foszfatáz új funkcióit is azonosítottuk a fehérje szintézisben, hiszen a foszfatáz hiányos törzsben kezelés hatására számos transzlációban szerepet játszó gén expressziója lecsökkent, míg az RNS metabolizmus kapcsolt gének mRNS szintje megemelkedett. Az oxidatív kezelés csökkentette a sejtfelszíni fehérjéket és a citoszólikus riboszóma fehérjéket kódoló gének expresszióját. Ugyanez a kezelés ellentétesen hatott az általunk kiválasztott oxidoreduktázokra és az RNS metabolizmusra. Ezek a változások együttesen hoznak létre egy oxidatív stressz ellenes védelmi választ. Az oxidatív védelem alatt tehát aktiválódnak az oxidoreduktázok, a RNS érés és feldolgozás felgyorsul, a transzláció szupresszálódik, és csökken a virulencia. Megfigyeltük, hogy a foszfatáz hiánya és az oxidatív kezelés együttesen markánsabb változásokat hoz létre, mint külön-külön. Ez azt sugallja, hogy szinergizmus lép fel a CaPpz1 és az oxidatív ágens között a patogén gombában. Ennek hátterében valószínűleg az állhat, hogy a CaPpz1 és az oxidatív stressz válasz jelátviteli útjai több ponton keresztezik egymást, ezért befolyásolják egymás hatását. Az általunk kapott adatokból azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a CaPpz1 védelmi szerepet tölt be az oxidatív stressz során a gombában, mivel a foszfatáz hiánya érzékenyíti a sejteket az oxidatív stresszre.

7.3 Konklúziók

A hipotézismentes megközelítéseket abban a reményben választottuk, hogy segítségükkel a CaPpz1 foszfatáz új funkcióit tudjuk felderíteni. A proteomikai és foszfoproteomikai megközelítéssel a fehérjék viszonylag kis körét, a jelentős koncentrációban előforduló és jól festődő proteinek és foszfoproteinek képviselőit tudtuk feltérképezni. Nem csoda, hogy elsősorban a riboszómális fehérjék és a metabolikus enzimek kerültek a látókörünkbe. Az utóbbiakról feltételezhetjük, hogy nem csak a jól ismert anyacsere folyamatokban vesznek részt, hanem a gomba felszíni fehérjemintázatának a kialakításában is szerepet játszanak. Ebben a kísérletsorozatban a növekedés lineáris szakaszának vége felé közelítő WT és KO sejteket hasonlítottuk össze. A szokásos tenyésztési körülmények között a két törzs közötti egyetlen lényeges különbség az, hogy a KO valamivel lassabban növekszik. Mivel az általunk vizsgált 25 fehérje közül 9 közvetlenül kapcsolatba hozható a transzláció folyamatával, kézenfekvő volt feltételezni azt, hogy a foszfatáz hiányos mutáns lassú növekedéséért a fehérje szintézis kedvezőtlen megváltozása felelős. Ez a hipotézis összhangban áll két korábbi

publikációval és egy új cikkel (Calafi és mtsai., 2020). Proteomikai munkánk a CaPpz1 eddig még nem vizsgált új szerepére is felhívta a figyelmet. GO term analízisünk és adatbázis kutatásunk azt mutatta, hogy a vizsgált 25 fehérje közül 17 valamilyen módon kapcsolatba hozható a biofilm képződéssel. Ezt a hipotézist kísérletes úton ellenőriztük, és így igazoltuk a foszfatáz új funkcióját. Kísérleteink jellegéből adódóan nem ismerjük a megfigyelések mögött álló mechanizmusokat, mint ahogy jelenleg nem tudjuk megmondani az eredmények fiziológiai vagy orvosi jelentőségét sem. Ezeknek a fontos kérdéseknek a felderítésére további kísérletes munkára van szükség.

A proteomikai munkák kiegészítésére elvégeztünk egy kisebb transzkriptomikai analízist is, ami azonban negatív eredménnyel zárult abból a szempontból, hogy a fehérje mennyiségben észlelt változásokat nem tudtuk alátámasztani az mRNS szintek hasonló változásával. Ezek szerint a CaPpz1 foszfatáz feltehetően a transláció, a fehérje stabilitás, és minden bizonnyal a fehérjék poszttranszlációs módosítása révén fejti ki hatását. Azonban az is elképzelhető, hogy a transzkriptom módosulása megelőzte a fehérje szintek módosulását, de ezt azért nem láttuk, mert nem a megfelelő időben vettünk mintát. Ráadásul azt tapasztaltuk, hogy a foszfatáz delécioja csak szerény fenotípus változásokat eredményez, viszont stressz körülmények között a CaPpz1 hiánya jól detektálható és nagyon komoly élettani szereppel bír (lásd: Irodalmi áttekintés). Ezek alapján egy új kísérleti tervet készítettünk.

A transzkriptomikai vizsgálatokat a tenyésztés exponenciális szakasza végén végeztük el kezeletlen, illetve rövid szubletális oxidatív stressznek kitett WT és KO *C. albicans* mintákkal. Mivel a gomba PPZ foszfatázok globális transzkripciós szerepét még nem vizsgálták, óvatosan haladtunk előre, és számos előkísérlettel ellenőriztük feltételezésünk helyességét. Gondos és nagyon időigényes előkészületünk akkor hozta meg a gyümölcsét, amikor sikerült létrehoznunk egy jó minőségű RNS szekvenáláson alapuló adatbázist. Ez az adathalmaz magába foglalja gyakorlatilag az összes *C. albicans* génről átíródott mRNS szintjére vonatkozó információt négy egymással jól összevethető kísérleti körülmény között. Az eredmények elsődleges elemzése jelezte, hogy kiindulási feltételezésünk helyes volt, ui. a foszfatáz delécioja csak viszonylag kevés gén expresszióját módosította jelentős mértékben, és ez a szám ugrásszerűen megemelkedett az oxidálószerrel történő kezelés hatására. Technikai okokból nem tudtuk az adathalmazban rejlő összes információt kiaknázni, végül csak 44 kiválasztott gén alaposabb elemzését mutattam be disszertációmban. A nemzetközi tudományos közösség számára hozzáférhető adatbázisunk nagy előnye, hogy bármikor újra analizálható, és így még további felfedezések alapját biztosíthatja. Korlátozott és önkényes választásunk ellenére több érdekes eredményt kaptunk a CaPpz1 funkciót illetően. Először is

sikerült igazolnunk, hogy a foszfatáz az *ENA2* transzporter gén expresszióján keresztül szabályozza a Na-ion effluxot, de ezen kívül részt vehet a foszfát, a glükóz és a glicerofoszfoinozitol plazma membránon keresztüli transzportjában is. Az, hogy a foszfatáz szabályozhatja a gomba fontos tápanyagainak felvételét, egy új kutatási téma alapja lehet. Eredményeink arra is rávilágítanak, hogy a CaPpz1 az oxidatív enzimek expressziójának növelésével módosíthatja a *Candida* oxidatív állapotát és befolyásolhatja a patogén oxidatív stressz iránti érzékenységet. Az is egy érdekes adalék, hogy a foszfatáz a vas redoxi állapotát és felszívódását szabályozó oxidázok transzkripcióján keresztül befolyásolhatja egy újabb alapvető tápanyag felvételét. A CaPpz1 transzkripciós alapfunkcióinak megismerésén kívül munkánk mellékterméke a *C. albicans* oxidatív stressz válaszának feltérképezése. De ennél sokkal fontosabb, hogy egyértelmű bizonyítékot találtunk arra, hogy ezek a válaszmechanismusok nagyon felerősödnek a foszfatáz hiányában. Tehát normális körülmények között a CaPpz1 egyik feladata a stressz elleni védelem lehet. A stressz körülmények között szembetűnővé vált a citoszólikus riboszóma komponenseket és a sejtfelszíni proteineket kódoló gének alulregulálása mellett az rRNS processzáls és metabolizmus, valamint egyes oxidázok génjeinek aktívabb átírása. Ez arra utal, hogy a felerősödött stressz során a *Candida* leállítja a transzlációt, csökkenti a gomba virulenciáját, elősegíti a riboszómális pre-RNS formák feldolgozását, és aktiválja az oxidatív védelmi mechanizmusait. A megfigyelések hozzájárulhatnak egy új gombaellenes terápiás eljárás kidolgozásához. Fiziológias kísérleteink szerint a foszfatáz hiányos gombasejtek oxidatív kezelése nagymértékben visszavetette azok növekedését és proliferációját. Továbbá a foszfatáz delécióna meggátolta az oxidatív stressz által indukált hifanövekedést, ami a virulencia faktorok szintjének csökkenésével együtt csökkentheti a patogén gomba fertőzőképességét. Eközben a gombasejtek életképesek maradtak. Ez egy fontos szempont, hiszen a *C. albicans* a normál mikrobiom tagja, ezért teljes eltávolítása a szervezetből nem kívánatos, mert utat nyithat az esetleg sokkal veszélyesebb baktérium- vagy gombafajok elszaporodása előtt. Tehát alapkutatási eredményeink felvetik annak a lehetőségét, hogy a CaPpz1 foszfatáz specifikus gátlása megfelelő oxidatív kezeléssel kombinálva felhasználható egy új *Candida*-ellenes terápia kidolgozására.

8. Összefoglalás

A *C. albicans* egy opportunistá humán patogén gomba, amely tartalmaz egy gomba specifikus Ser/Thr protein foszfatázt, a CaPpz1-t. A foszfatáznak szerepe van a kation homeosztázis fenntartásában, a sejtfal bioszintézisben, morfológiai változásokban, oxidatív stressz válaszbán és a gomba virulenciájában. Munkám során omikai eszközökkel kutattam a CaPpz1 újabb funkcióit, normál és oxidatív stressz körülmények között.

Elsőként a *ppz1* deléciós mutáns (KO) törzs adaptációs mechanizmusait vizsgáltuk proteomikai módszerekkel. 2D elektroforézis után a fehérje foltokat RuBPS festékkel azonosítottuk és a foszfofehérjéket specifikus ProQ Diamond festékkel tettük láthatóvá. A foltokban lévő fehérjéket tömegspektrometriával azonosítottuk. Összesen 25 fehérjét sikerült azonosítanunk, amelyek mennyisége és/vagy foszforilációs szintje jelentősen megváltozott a KO sejtekben. A fehérjék funkcionális analízisét követően megerősítettük a CaPpz1 szerepét a fehérje szintézisben, a morfológiai átalakulásban és az oxidatív stressz válaszbán. Emellett felismertük és független kísérletekkel igazoltuk a CaPpz1 új funkcióját a biofilm képzésben.

Ezt követően transzkriptomikai módszerekkel vizsgáltuk a KO és WT törzsek *tert*-butil-hidroperoxid (*tBOOH*) által kiváltott rövid oxidatív stresszre adott válaszát. Kimutattuk, hogy a *tBOOH* kezelés csökkentette a sejtek növekedését és gátolta a proliferációt, de nem befolyásolta lényegesen a sejtek életképességét és vitalitását. A biokémiai vizsgálatok rámutattak arra, hogy az oxidatív stressz és a foszfatáz deléció is érzékenyen érinti az antioxidáns enzimek aktivitását és a glutation oxidációs állapotát. Az optimalizált kezelési protokoll beállítása után a génexpressziós változások detektálására előkísérletként DNS chip hibridizációt, majd fő kísérletként RNS szekvenálást alkalmaztunk. Azt találtuk, hogy a CaPpz1 hiánya és az oxidatív stressz önmagában csak kis vagy közepes hatással rendelkezik, de a kettő együttesen markáns transzkripciós változásokat okoz, ami erős pozitív interakcióra utal. A gének ontológiai analízisét követően 44 gént választottunk ki további RT-qPCR vizsgálatra. Bizonyítottuk a CaPpz1 szerepét a membrán transzportban és az oxidációs-redukciós folyamatban. Igazoltuk, hogy oxidatív stressz alatt csökken a sejt felszíni fehérjéket és a citoszolikus riboszómális fehérjéket kódoló gének expressziója, míg a transzportban, oxidáció-redukcióban és az RNS metabolizmusban részt vevő gének expressziója megemelkedik. Ezek a változások a KO sejtekben felerősödtek, tehát a CaPpz1 megvédi a gomba sejteket az oxidatív stresszel szemben. Alaputatási eredményeink felvetik annak a lehetőségét, hogy a CaPpz1 foszfatáz specifikus gátlása megfelelő oxidatív kezeléssel kombinálva, egy új *Candida*-ellenes terápia alapjául szolgálhat.

9. Summary

C. albicans is an opportunistic human pathogen that contains a novel fungus specific Ser/Thr protein phosphatase, called CaPpz1. It has several important physiological roles such as the regulation of cation homeostasis, cell wall biosynthesis, morphological changes, oxidative stress response, and virulence of the pathogen. In the present study we used modern omics technologies to investigate its further functions and the consequences of phosphatase deletion under oxidative stress.

First we analyzed the adaptation mechanisms of deletion mutant by proteomics. After 2D gel electrophoresis protein spots were stained with RuBPS as well as with Pro-Q Diamond to visualize the total proteome and the phosphoproteome, respectively. With mass spectrometry we identified 25 protein whose phosphorylation levels and/or protein levels altered in the *ppz1* deletion mutant strain. The functional analysis of the affected proteins confirmed the involvement of CaPpz1 in protein synthesis, morphology as well as in oxidative stress response. In addition we revealed and proved a novel role for CaPpz1 in biofilm formation.

Second, we applied transcriptomics to investigate how the *ppz1* KO and WT strains responded to a short oxidative stress induced by *tert*-butyl hydroperoxide (*t*BOOH). We demonstrated that *t*BOOH treatment reduced the growth rate and blocked the division of the fungal cells without affecting their viability or vitality significantly. Biochemical analysis showed that upon oxidative stress and/or phosphatase deletion the cells responded by elevated antioxidant enzyme activities and oxidized glutathione concentration. After establishing the optimal treatment regime, we carried out a preliminary DNA chip hybridization and a detailed RNA sequencing study. We found that the lack of CaPpz1 or the oxidative treatment alone have only a small or moderate effect, but together they exhibit robust change in the transcriptome, that indicates a strong positive interaction. Based on gene ontology enrichment we selected 44 genes for further RT-qPCR validations. We confirmed the functions of CaPpz1 in transmembrane transport and oxidation-reduction processes. We revealed that the expression of genes coding for cell surface proteins and cytosolic ribosomal proteins were downregulated by *t*BOOH, while the amounts of mRNAs associated with transport processes, oxidoreductase activity, and RNA processing were upregulated. All of these changes were enhanced in the KO strain. From these results, we conclude that in *C. albicans* CaPpz1 plays a protective role against oxidative damage. Our data suggest that the specific inhibition of this phosphatase combined with a proper oxidative treatment may be applied as a possible approach to a topical antifungal therapy.

10. Irodalomjegyzék

- Abrie, J. A.**, Molero, C., Ariño, J., & Strauss, E. (2015). Complex stability and dynamic subunit interchange modulates the disparate activities of the yeast moonlighting proteins Hal3 and Vhs3. *Scientific reports*, 5, 15774. <https://doi.org/10.1038/srep15774>
- Ádám, C.**, Erdei, É., Casado, C., Kovács, L., González, A., Majoros, L., Petrényi, K., Bagossi, P., Farkas, I., Molnar, M., Pócsi, I., Ariño, J., & Dombrádi, V. (2012). Protein phosphatase CaPpz1 is involved in cation homeostasis, cell wall integrity and virulence of *Candida albicans*. *Microbiology (Reading, England)*, 158(Pt 5), 1258–1267. <https://doi.org/10.1099/mic.0.057075-0>
- Aksenova, A.**, Muñoz, I., Volkov, K., Ariño, J., & Mironova, L. (2007). The HAL3-PPZ1 dependent regulation of nonsense suppression efficiency in yeast and its influence on manifestation of the yeast prion-like determinant [ISP(+)]. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*, 12(4), 435–445. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2007.01064.x>
- Albataineh, M. T.**, Lazzell, A., Lopez-Ribot, J. L., & Kadosh, D. (2014). Ppg1, a PP2A-type protein phosphatase, controls filament extension and virulence in *Candida albicans*. *Eukaryotic cell*, 13(12), 1538–1547. <https://doi.org/10.1128/EC.00199-14>
- Al-Fattani, M. A.**, & Douglas, L. J. (2006). Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. *Journal of medical microbiology*, 55(Pt 8), 999–1008. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.46569-0>
- Alonso, A.**, Sasin, J., Bottini, N., Friedberg, I., Friedberg, I., Osterman, A., Godzik, A., Hunter, T., Dixon, J., & Mustelin, T. (2004). Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell*, 117(6), 699–711. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.05.018>
- Anderson M. E.** (1985). Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods in enzymology*, 113, 548–555. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(85\)13073-9](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(85)13073-9)
- Ariño J.** (2002). Novel protein phosphatases in yeast. *European journal of biochemistry*, 269(4), 1072–1077. <https://doi.org/10.1046/j.0014-2956.2002.02753.x>
- Ariño, J.**, Velázquez, D., & Casamayor, A. (2019). Ser/Thr protein phosphatases in fungi: structure, regulation and function. *Microbial cell (Graz, Austria)*, 6(5), 217–256. <https://doi.org/10.15698/mic2019.05.677>
- Attwood, P. V.**, Ludwig, K., Bergander, K., Besant, P. G., Adina-Zada, A., Krieglstein, J., & Klumpp, S. (2010). Chemical phosphorylation of histidine-containing peptides based on the

- sequence of histone H4 and their dephosphorylation by protein histidine phosphatase. *Biochimica et biophysica acta*, 1804(1), 199–205. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.10.007>
- Baginski, M.**, & Czub, J. (2009). Amphotericin B and its new derivatives - mode of action. *Current drug metabolism*, 10(5), 459–469. <https://doi.org/10.2174/138920009788898019>
- Balcells, L.**, Gómez, N., Casamayor, A., Clotet, J., & Ariño, J. (1997). Regulation of salt tolerance in fission yeast by a protein-phosphatase-Z-like Ser/Thr protein phosphatase. *European journal of biochemistry*, 250(2), 476–483. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1997.0476a.x>
- Balcells, L.**, Martín, R., Ruiz, M. C., Gómez, N., Ramos, J., & Ariño, J. (1998). The Pzh1 protein phosphatase and the Spm1 protein kinase are involved in the regulation of the plasma membrane H⁺-ATPase in fission yeast. *FEBS letters*, 435(2-3), 241–244. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(98\)01082-5](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(98)01082-5)
- Balcells, L.**, Calero, F., Gómez, N., Ramos, J., & Ariño, J. (1999). The Schizosaccharomyces pombe Pzh1 protein phosphatase regulates Na⁺ ion influx in a Trk1-independent fashion. *European journal of biochemistry*, 260(1), 31–37. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00129.x>
- Barcella, L.**, Rogolino, S. B., & Barbaro, A. P. (2017). The intestinal mycobiota: a year of observation about the incidence of yeast's isolation in fecal samples. *Minerva gastroenterologica e dietologica*, 63(2), 85–91. <https://doi.org/10.23736/S1121-421X.17.02330-3>
- Beck, T.**, & Hall, M. N. (1999). The TOR signalling pathway controls nuclear localization of nutrient-regulated transcription factors. *Nature*, 402(6762), 689–692. <https://doi.org/10.1038/45287>
- Benedict, K.**, Roy, M., Kabbani, S., Anderson, E. J., Farley, M. M., Harb, S., Harrison, L. H., Bonner, L., Wadu, V. L., Marceaux, K., Hollick, R., Beldavs, Z. G., Zhang, A. Y., Schaffner, W., Graber, C. R., Derado, G., Chiller, T. M., Lockhart, S. R., & Vallabhaneni, S. (2018). Neonatal and Pediatric Candidemia: Results From Population-Based Active Laboratory Surveillance in Four US Locations, 2009-2015. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society*, 7(3), e78–e85. <https://doi.org/10.1093/jpids/piy009>
- Bishop, A. C.**, Sun, T., Johnson, M. E., Bruno, V. M., & Patton-Vogt, J. (2011). Robust utilization of phospholipase-generated metabolites, glycerophosphodiester, by *Candida albicans*: role of the CaGit1 permease. *Eukaryotic cell*, 10(12), 1618–1627. <https://doi.org/10.1128/EC.05160-11>

- Blot, S. I.,** Vandewoude, K. H., Hoste, E. A., & Colardyn, F. A. (2002). Effects of nosocomial candidemia on outcomes of critically ill patients. *The American journal of medicine*, 113(6), 480–485. [https://doi.org/10.1016/s0002-9343\(02\)01248-2](https://doi.org/10.1016/s0002-9343(02)01248-2)
- Bolstad, B. M.,** Irizarry, R. A., Astrand, M., & Speed, T. P. (2003). A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics* (Oxford, England), 19(2), 185–193. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/19.2.185>
- Boorsma, A.,** de Nobel, H., ter Riet, B., Bargmann, B., Brul, S., Hellingwerf, K. J., & Klis, F. M. (2004). Characterization of the transcriptional response to cell wall stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* (Chichester, England), 21(5), 413–427. <https://doi.org/10.1002/yea.1109>
- Böhmer, R. M.,** Bandala-Sanchez, E., & Harrison, L. C. (2011). Forward light scatter is a simple measure of T-cell activation and proliferation but is not universally suited for doublet discrimination. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*, 79(8), 646–652. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.21096>
- Bradford M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72, 248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- Braun, B. R.,** & Johnson, A. D. (1997). Control of filament formation in *Candida albicans* by the transcriptional repressor TUP1. *Science* (New York, N.Y.), 277(5322), 105–109. <https://doi.org/10.1126/science.277.5322.105>
- Brautigan D.L.** (2012) Protein Ser/Thr phosphatases-The ugly ducklings of cell signalling. *FEBS Journal* 280, 324-345
- Brown, G. D.,** Denning, D. W., Gow, N. A., Levitz, S. M., Netea, M. G., & White, T. C. (2012). Hidden killers: human fungal infections. *Science translational medicine*, 4(165), 165rv13. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3004404>
- Bruno, V. M.,** Kalachikov, S., Subaran, R., Nobile, C. J., Kyratsous, C., & Mitchell, A. P. (2006). Control of the *C. albicans* cell wall damage response by transcriptional regulator Cas5. *PLoS pathogens*, 2(3), e21. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0020021>
- Butler, G.,** Rasmussen, M. D., Lin, M. F., Santos, M. A., Sakthikumar, S., Munro, C. A., Rheinbay, E., Grabherr, M., Forche, A., Reedy, J. L., Agraftioti, I., Arnaud, M. B., Bates, S., Brown, A. J., Brunke, S., Costanzo, M. C., Fitzpatrick, D. A., de Groot, P. W., Harris, D., Hoyer, L. L., Hube, B., Klis, F. M., Kodira, C., Lennard, N., Logue, M. E., Martin, R., Neiman, A. M., Nikolaou, E., Quail, M.A., Quinn, J., Santos, M. C., Schmitzberger, F. F.,

Sherlock, G., Shah, P., Silverstein, K. A., Skrzypek, M. S., Soll, D., Staggs, R., Stansfield, I., Stumpf, M. P., Sudbery, P. E., Srikantha, T., Zeng, Q., Berman, J., Berriman, M., Heitman, J., Gow, N. A., Lorenz, M. C., Birren, B. W., Kellis, M., Cuomo, C. A. (2009). Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. *Nature*, 459(7247), 657–662. <https://doi.org/10.1038/nature08064>

Calafi, C., López-Malo, M., Velázquez, D., Zhang, C., Fernández-Fernández, J., Rodríguez-Galán, O., de la Cruz, J., Ariño, J., & Casamayor, A. (2020). Overexpression of budding yeast protein phosphatase Ppz1 impairs translation. *Biochimica et biophysica acta. Molecular cell research*, 118727. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2020.118727>

Chaudhuri, R., Ansari, F. A., Raghunandanan, M. V., & Ramachandran, S. (2011). FungalRV: adhesin prediction and immunoinformatics portal for human fungal pathogens. *BMC genomics*, 12, 192. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-192>

Chen, E., Choy, M. S., Petrényi, K., Kónya, Z., Erdődi, F., Dombrádi, V., Peti, W., & Page, R. (2016). Molecular Insights into the Fungus-Specific Serine/Threonine Protein Phosphatase Z1 in *Candida albicans*. *mBio*, 7(4), e00872-16. <https://doi.org/10.1128/mBio.00872-16>

Chen, M. J., Dixon, J. E., & Manning, G. (2017). Genomics and evolution of protein phosphatases. *Science signaling*, 10(474), eaag1796. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aag1796>

Chen, X., Magee, B. B., Dawson, D., Magee, P. T., & Kumamoto, C. A. (2004). Chromosome 1 trisomy compromises the virulence of *Candida albicans*. *Molecular microbiology*, 51(2), 551–565. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03852.x>

Chen, X., Ren, B., Chen, M., Liu, M. X., Ren, W., Wang, Q. X., Zhang, L. X., & Yan, G. Y. (2014). ASDCD: antifungal synergistic drug combination database. *PloS one*, 9(1), e86499. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086499>

Chong, P. P., Chin, V. K., Wong, W. F., Madhavan, P., Yong, V. C., & Looi, C. Y. (2018). Transcriptomic and Genomic Approaches for Unravelling *Candida albicans* Biofilm Formation and Drug Resistance-An Update. *Genes*, 9(11), 540. <https://doi.org/10.3390/genes9110540>

Clotet, J., Posas, F., de Nadal, E., & Ariño, J. (1996). The NH2-terminal extension of protein phosphatase PPZ1 has an essential functional role. *The Journal of biological chemistry*, 271(42), 26349–26355. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.42.26349>

Cohen P. T. (1997). Novel protein serine/threonine phosphatases: variety is the spice of life. *Trends in biochemical sciences*, 22(7), 245–251. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(97\)01060-8](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(97)01060-8)

- Clotet, J.**, Garí, E., Aldea, M., & Ariño, J. (1999). The yeast ser/thr phosphatases sit4 and ppz1 play opposite roles in regulation of the cell cycle. *Molecular and cellular biology*, 19(3), 2408–2415. <https://doi.org/10.1128/mcb.19.3.2408>
- Cutler J. E.** (1991). Putative virulence factors of *Candida albicans*. *Annual review of microbiology*, 45, 187–218. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.45.100191.001155>
- Da Cruz e Silva, E. F.**, Hughes, V., McDonald, P., Stark, M. J., & Cohen, P. T. (1991). Protein phosphatase 2Bw and protein phosphatase Z are *Saccharomyces cerevisiae* enzymes. *Biochimica et biophysica acta*, 1089(2), 269–272. [https://doi.org/10.1016/0167-4781\(91\)90023-f](https://doi.org/10.1016/0167-4781(91)90023-f)
- Dantas, A.**, Day, A., Ikeh, M., Kos, I., Achan, B., & Quinn, J. (2015). Oxidative stress responses in the human fungal pathogen, *Candida albicans*. *Biomolecules*, 5(1), 142–165. <https://doi.org/10.3390/biom5010142>
- Davies M. J.** (1989). Detection of peroxy and alkoxy radicals produced by reaction of hydroperoxides with rat liver microsomal fractions. *The Biochemical journal*, 257(2), 603–606. <https://doi.org/10.1042/bj2570603>
- de Nadal, E.**, Clotet, J., Posas, F., Serrano, R., Gomez, N., & Ariño, J. (1998). The yeast halotolerance determinant Hal3p is an inhibitory subunit of the Ppz1p Ser/Thr protein phosphatase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(13), 7357–7362. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.13.7357>
- de Nadal, E.**, Fadden, R. P., Ruiz, A., Haystead, T., & Ariño, J. (2001). A role for the Ppz Ser/Thr protein phosphatases in the regulation of translation elongation factor 1B α . *The Journal of biological chemistry*, 276(18), 14829–14834. <https://doi.org/10.1074/jbc.M010824200>
- Debono, M.**, & Gordee, R. S. (1994). Antibiotics that inhibit fungal cell wall development. *Annual review of microbiology*, 48, 471–497. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.48.100194.002351>
- Di Como, C. J.**, Bose, R., & Arndt, K. T. (1995). Overexpression of SIS2, which contains an extremely acidic region, increases the expression of SWI4, CLN1 and CLN2 in sit4 mutants. *Genetics*, 139(1), 95–107.
- Domínguez, J. M.**, & Martín, J. J. (1998). Identification of elongation factor 2 as the essential protein targeted by sordarins in *Candida albicans*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 42(9), 2279–2283.

- Dünkler, A.**, Walther, A., Specht, C. A., & Wendland, J. (2005). *Candida albicans* CHT3 encodes the functional homolog of the Cts1 chitinase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Fungal genetics and biology : FG & B*, 42(11), 935–947. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2005.08.001>
- Eck, R.**, Hundt, S., Härtl, A., Roemer, E., & Künkel, W. (1999). A multicopper oxidase gene from *Candida albicans*: cloning, characterization and disruption. *Microbiology (Reading, England)*, 145 (Pt 9), 2415–2422. <https://doi.org/10.1099/00221287-145-9-2415>
- Emri, T.**, Pócsi, I., & Szentirmai, A. (1997). Glutathione metabolism and protection against oxidative stress caused by peroxides in *Penicillium chrysogenum*. *Free radical biology & medicine*, 23(5), 809–814. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(97\)00065-8](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(97)00065-8)
- Emri, T.**, Pócsi, I., & Szentirmai, A. (1999). Analysis of the oxidative stress response of *Penicillium chrysogenum* to menadione. *Free radical research*, 30(2), 125–132. <https://doi.org/10.1080/10715769900300131>
- Enjalbert, B.**, Nantel, A., & Whiteway, M. (2003). Stress-induced gene expression in *Candida albicans*: absence of a general stress response. *Molecular biology of the cell*, 14(4), 1460–1467. <https://doi.org/10.1091/mbc.e02-08-0546>
- Fekete, A.**, Emri, T., Gyetvai, A., Gazdag, Z., Pesti, M., Varga, Z., Balla, J., Cserháti, C., Emody, L., Gergely, L., & Pócsi, I. (2007). Development of oxidative stress tolerance resulted in reduced ability to undergo morphologic transitions and decreased pathogenicity in a t-butylhydroperoxide-tolerant mutant of *Candida albicans*. *FEMS yeast research*, 7(6), 834–847. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2007.00244.x>
- Ferrando, A.**, Kron, S. J., Rios, G., Fink, G. R., & Serrano, R. (1995). Regulation of cation transport in *Saccharomyces cerevisiae* by the salt tolerance gene HAL3. *Molecular and cellular biology*, 15(10), 5470–5481. <https://doi.org/10.1128/mcb.15.10.5470>
- Finkel, J. S.**, Xu, W., Huang, D., Hill, E. M., Desai, J. V., Woolford, C. A., Nett, J. E., Taff, H., Norice, C. T., Andes, D. R., Lanni, F., & Mitchell, A. P. (2012). Portrait of *Candida albicans* adherence regulators. *PLoS pathogens*, 8(2), e1002525. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002525>
- Fonzi, W. A.**, & Irwin, M. Y. (1993). Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. *Genetics*, 134(3), 717–728.
- Fox, E. P.**, & Nobile, C. J. (2012). A sticky situation: untangling the transcriptional network controlling biofilm development in *Candida albicans*. *Transcription*, 3(6), 315–322. <https://doi.org/10.4161/trns.22281>
- Fox, E. P.**, Bui, C. K., Nett, J. E., Hartooni, N., Mui, M. C., Andes, D. R., Nobile, C. J., & Johnson, A. D. (2015). An expanded regulatory network temporally controls *Candida albicans*

- biofilm formation. *Molecular microbiology*, 96(6), 1226–1239. <https://doi.org/10.1111/mmi.13002>
- Ganguli, D.**, Kumar, C., & Bachhawat, A. K. (2007). The alternative pathway of glutathione degradation is mediated by a novel protein complex involving three new genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 175(3), 1137–1151. <https://doi.org/10.1534/genetics.106.066944>
- Gauci, V. J.**, Wright, E. P., & Coorsen, J. R. (2011). Quantitative proteomics: assessing the spectrum of in-gel protein detection methods. *Journal of chemical biology*, 4(1), 3–29. <https://doi.org/10.1007/s12154-010-0043-5>
- Gerasimaitė, R.**, & Mayer, A. (2017). Ppn2, a novel Zn²⁺-dependent polyphosphatase in the acidocalcisome-like yeast vacuole. *Journal of cell science*, 130(9), 1625–1636. <https://doi.org/10.1242/jcs.201061>
- Gergely L.** (2003) Orvosi mikrobiológia tankönyv, 516-531.
- Gong, W.**, Li, Y., Cui, G., Hu, J., Fang, H., Jin, C., & Xia, B. (2009). Solution structure and catalytic mechanism of human protein histidine phosphatase 1. *The Biochemical journal*, 418(2), 337–344. <https://doi.org/10.1042/BJ20081571>
- Gow, N. A.**, Brown, A. J., & Odds, F. C. (2002). Fungal morphogenesis and host invasion. *Current opinion in microbiology*, 5(4), 366–371. [https://doi.org/10.1016/s1369-5274\(02\)00338-7](https://doi.org/10.1016/s1369-5274(02)00338-7)
- Gow, N. A.**, van de Veerdonk, F. L., Brown, A. J., & Netea, M. G. (2011). *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. *Nature reviews. Microbiology*, 10(2), 112–122. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2711>
- Gow, N. A.**, & Hube, B. (2012). Importance of the *Candida albicans* cell wall during commensalism and infection. *Current opinion in microbiology*, 15(4), 406–412. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2012.04.005>
- Greenley, T. L.**, & Davies, M. J. (1992). Detection of radicals produced by reaction of hydroperoxides with rat liver microsomal fractions. *Biochimica et biophysica acta*, 1116(2), 192–203. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(92\)90116-c](https://doi.org/10.1016/0304-4165(92)90116-c)
- Hanaoka, N.**, Takano, Y., Shibuya, K., Fugo, H., Uehara, Y., & Niimi, M. (2008). Identification of the putative protein phosphatase gene PTC1 as a virulence-related gene using a silkworm model of *Candida albicans* infection. *Eukaryotic cell*, 7(10), 1640–1648. <https://doi.org/10.1128/EC.00129-08>
- Hardie D. G.** (1990). Roles of protein kinases and phosphatases in signal transduction. *Symposia of the Society for Experimental Biology*, 44, 241–255.

- Heath, C. M.,** Stahl, P. D., & Barbieri, M. A. (2003). Lipid kinases play crucial and multiple roles in membrane trafficking and signaling. *Histology and histopathology*, 18(3), 989–998. <https://doi.org/10.14670/HH-18.989>
- Hernández, M. L.,** Ximénez-Embún, P., Martínez-Gomariz, M., Gutiérrez-Blázquez, M. D., Nombela, C., & Gil, C. (2010). Identification of *Candida albicans* exposed surface proteins in vivo by a rapid proteomic approach. *Journal of proteomics*, 73(7), 1404–1409. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2010.02.008>
- Huang G.** (2012). Regulation of phenotypic transitions in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Virulence*, 3(3), 251–261. <https://doi.org/10.4161/viru.20010>
- Hube, B.,** Stehr, F., Bossenz, M., Mazur, A., Kretschmar, M., & Schäfer, W. (2000). Secreted lipases of *Candida albicans*: cloning, characterisation and expression analysis of a new gene family with at least ten members. *Archives of microbiology*, 174(5), 362–374. <https://doi.org/10.1007/s002030000218>
- Hughes, V.,** Müller, A., Stark, M. J., & Cohen, P. T. (1993). Both isoforms of protein phosphatase Z are essential for the maintenance of cell size and integrity in *Saccharomyces cerevisiae* in response to osmotic stress. *European journal of biochemistry*, 216(1), 269–279. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1993.tb18142.x>
- Huh, W. K., & Kang, S. O.** (1999). Molecular cloning and functional expression of alternative oxidase from *Candida albicans*. *Journal of bacteriology*, 181(13), 4098–4102.
- Huh, W. K., & Kang, S. O.** (2001). Characterization of the gene family encoding alternative oxidase from *Candida albicans*. *The Biochemical journal*, 356(Pt 2), 595–604. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3560595>
- Hunter T.** (2009). Tyrosine phosphorylation: thirty years and counting. *Current opinion in cell biology*, 21(2), 140–146. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.01.028>
- Ingebritsen, T. S., & Cohen, P.** (1983). The protein phosphatases involved in cellular regulation. 1. Classification and substrate specificities. *European journal of biochemistry*, 132(2), 255–261. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1983.tb07357.x>
- Jakab, Á.,** Emri, T., Sipos, L., Kiss, Á., Kovács, R., Dombrádi, V., Kemény-Beke, Á., Balla, J., Majoros, L., & Pócsi, I. (2015). Betamethasone augments the antifungal effect of menadione--towards a novel anti-*Candida albicans* combination therapy. *Journal of basic microbiology*, 55(8), 973–981. <https://doi.org/10.1002/jobm.201400903>
- Jiang, Y., & Broach, J. R.** (1999). Tor proteins and protein phosphatase 2A reciprocally regulate Tap42 in controlling cell growth in yeast. *The EMBO journal*, 18(10), 2782–2792. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.10.2782>

Jin, Y., Yip, H. K., Samaranayake, Y. H., Yau, J. Y., & Samaranayake, L. P. (2003). Biofilm-forming ability of *Candida albicans* is unlikely to contribute to high levels of oral yeast carriage in cases of human immunodeficiency virus infection. *Journal of clinical microbiology*, 41(7), 2961–2967. <https://doi.org/10.1128/jcm.41.7.2961-2967.2003>

Jones, T., Federspiel, N. A., Chibana, H., Dungan, J., Kalman, S., Magee, B. B., Newport, G., Thorstenson, Y. R., Agabian, N., Magee, P. T., Davis, R. W., & Scherer, S. (2004). The diploid genome sequence of *Candida albicans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(19), 7329–7334. <https://doi.org/10.1073/pnas.0401648101>

Kallmeyer, A. K., Keeling, K. M., & Bedwell, D. M. (2006). Eukaryotic release factor 1 phosphorylation by CK2 protein kinase is dynamic but has little effect on the efficiency of translation termination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic cell*, 5(8), 1378–1387. <https://doi.org/10.1128/EC.00073-06>

Karkowska-Kuleta, J., & Kozik, A. (2014). „moonlighting” proteins as virulence factors of pathogenic fungi, parasitic protozoa and multicellular parasites. *Molecular oral microbiology*, 29(6), 270–283. <https://doi.org/10.1111/omi.12078>

Kathiravan, M. K., Salake, A. B., Chothe, A. S., Dudhe, P. B., Watode, R. P., Mukta, M. S., & Gadhwe, S. (2012). The biology and chemistry of antifungal agents: a review. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 20(19), 5678–5698. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2012.04.045>

Kirsch, D. R., & Whitney, R. R. (1991). Pathogenicity of *Candida albicans* auxotrophic mutants in experimental infections. *Infection and immunity*, 59(9), 3297–3300.

Kovács, L., Farkas, I., Majoros, L., Miskei, M., Pócsi, I., & Dombrádi, V. (2010). The polymorphism of protein phosphatase Z1 gene in *Candida albicans*. *Journal of basic microbiology*, 50 Suppl 1, S74–S82. <https://doi.org/10.1002/jobm.200900434>

Kraidlova, L., Van Zeebroeck, G., Van Dijck, P., & Sychrová, H. (2011). The *Candida albicans* GAP gene family encodes permeases involved in general and specific amino acid uptake and sensing. *Eukaryotic cell*, 10(9), 1219–1229. <https://doi.org/10.1128/EC.05026-11>

Kwolek-Mirek, M., & Zadrag-Tecza, R. (2014). Comparison of methods used for assessing the viability and vitality of yeast cells. *FEMS yeast research*, 14(7), 1068–1079. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12202>

Lan, C. Y., Rodarte, G., Murillo, L. A., Jones, T., Davis, R. W., Dungan, J., Newport, G., & Agabian, N. (2004). Regulatory networks affected by iron availability in *Candida albicans*. *Molecular microbiology*, 53(5), 1451–1469. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04214.x>

- Lee, K. S.**, Hines, L. K., & Levin, D. E. (1993). A pair of functionally redundant yeast genes (PPZ1 and PPZ2) encoding type 1-related protein phosphatases function within the PKC1-mediated pathway. *Molecular and cellular biology*, 13(9), 5843–5853. <https://doi.org/10.1128/mcb.13.9.5843>
- Lee, S.**, Milgroom, M. G., Taylor, J. W. (1988) A rapid high yield mini-prep method for isolation of total genomic DNA from fungi. *Fungal Genet News*; 3223
- Leidich, S. D.**, Ibrahim, A. S., Fu, Y., Koul, A., Jessup, C., Vitullo, J., Fonzi, W., Mirbod, F., Nakashima, S., Nozawa, Y., & Ghannoum, M. A. (1998). Cloning and disruption of caPLB1, a phospholipase B gene involved in the pathogenicity of *Candida albicans*. *The Journal of biological chemistry*, 273(40), 26078–26086. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.40.26078>
- Leiter, É.**, González, A., Erdei, É., Casado, C., Kovács, L., Ádám, C., Oláh, J., Miskei, M., Molnar, M., Farkas, I., Hamari, Z., Ariño, J., Pócsi, I., & Dombrádi, V. (2012). Protein phosphatase Z modulates oxidative stress response in fungi. *Fungal genetics and biology : FG & B*, 49(9), 708–716. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2012.06.010>
- Levin D. E.** (2005). Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 69(2), 262–291. <https://doi.org/10.1128/MMBR.69.2.262-291.2005>
- Li, Y.**, Jiao, P., Li, Y., Gong, Y., Chen, X., & Sun, S. (2019). The Synergistic Antifungal Effect and Potential Mechanism of D-Penicillamine Combined With Fluconazole Against *Candida albicans*. *Frontiers in microbiology*, 10, 2853. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02853>
- Liu, N. N.**, Flanagan, P. R., Zeng, J., Jani, N. M., Cardenas, M. E., Moran, G. P., & Köhler, J. R. (2017). Phosphate is the third nutrient monitored by TOR in *Candida albicans* and provides a target for fungal-specific indirect TOR inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(24), 6346–6351. <https://doi.org/10.1073/pnas.1617799114>
- Lockhart, S. R.**, Iqbal, N., Cleveland, A. A., Farley, M. M., Harrison, L. H., Bolden, C. B., Baughman, W., Stein, B., Hollick, R., Park, B. J., & Chiller, T. (2012). Species identification and antifungal susceptibility testing of *Candida* bloodstream isolates from population-based surveillance studies in two U.S. cities from 2008 to 2011. *Journal of clinical microbiology*, 50(11), 3435–3442. <https://doi.org/10.1128/JCM.01283-12>
- Lohse, M. B.**, Gulati, M., Johnson, A. D., & Nobile, C. J. (2018). Development and regulation of single- and multi-species *Candida albicans* biofilms. *Nature reviews. Microbiology*, 16(1), 19–31. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.107>

- Lorenz, M. C.,** Bender, J. A., & Fink, G. R. (2004). Transcriptional response of *Candida albicans* upon internalization by macrophages. *Eukaryotic cell*, 3(5), 1076–1087. <https://doi.org/10.1128/EC.3.5.1076-1087.2004>
- Mann, D. J.,** Dombrádi, V., & Cohen, P. T. (1993). *Drosophila* protein phosphatase V functionally complements a SIT4 mutant in *Saccharomyces cerevisiae* and its amino-terminal region can confer this complementation to a heterologous phosphatase catalytic domain. *The EMBO journal*, 12(12), 4833–4842.
- Manning, G.,** Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T., & Sudarsanam, S. (2002). The protein kinase complement of the human genome. *Science (New York, N.Y.)*, 298(5600), 1912–1934. <https://doi.org/10.1126/science.1075762>
- Martin, R.,** Wächtler, B., Schaller, M., Wilson, D., & Hube, B. (2011). Host-pathogen interactions and virulence-associated genes during *Candida albicans* oral infections. *International journal of medical microbiology: IJMM*, 301(5), 417–422. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2011.04.009>
- Martins, N.,** Ferreira, I. C., Barros, L., Silva, S., & Henriques, M. (2014). Candidiasis: predisposing factors, prevention, diagnosis and alternative treatment. *Mycopathologia*, 177(5-6), 223–240. <https://doi.org/10.1007/s11046-014-9749-1>
- Mathé, L.,** & Van Dijck, P. (2013). Recent insights into *Candida albicans* biofilm resistance mechanisms. *Current genetics*, 59(4), 251–264. <https://doi.org/10.1007/s00294-013-0400-3>
- Mayer, F. L.,** Wilson, D., & Hube, B. (2013). *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*, 4(2), 119–128. <https://doi.org/10.4161/viru.22913>
- McGrath, J. P.,** Jentsch, S., & Varshavsky, A. (1991). UBA 1: an essential yeast gene encoding ubiquitin-activating enzyme. *The EMBO journal*, 10(1), 227–236.
- Mendoza, A.,** Serramía, M. J., Capa, L., & García-Bustos, J. F. (1999). Translation elongation factor 2 is encoded by a single essential gene in *Candida albicans*. *Gene*, 229(1-2), 183–191. [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(99\)00024-4](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(99)00024-4)
- Merchan, S.,** Bernal, D., Serrano, R., & Yenush, L. (2004). Response of the *Saccharomyces cerevisiae* Mpk1 mitogen-activated protein kinase pathway to increases in internal turgor pressure caused by loss of Ppz protein phosphatases. *Eukaryotic cell*, 3(1), 100–107. <https://doi.org/10.1128/ec.3.1.100-107.2004>
- Minhas, A.,** Sharma, A., Kaur, H., Rawal, Y., Ganesan, K., & Mondal, A. K. (2012). Conserved Ser/Arg-rich motif in PPZ orthologs from fungi is important for its role in cation tolerance. *The Journal of biological chemistry*, 287(10), 7301–7312. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.299438>

- Mitrovich, Q. M.**, Tuch, B. B., Guthrie, C., & Johnson, A. D. (2007). Computational and experimental approaches double the number of known introns in the pathogenic yeast *Candida albicans*. *Genome research*, 17(4), 492–502. <https://doi.org/10.1101/gr.6111907>
- Molero, C.**, Petrényi, K., González, A., Carmona, M., Gelis, S., Abrie, J. A., Strauss, E., Ramos, J., Dombradi, V., Hidalgo, E., & Ariño, J. (2013). The *Schizosaccharomyces pombe* fusion gene *hal3* encodes three distinct activities. *Molecular microbiology*, 90(2), 367–382. <https://doi.org/10.1111/mmi.12370>
- Moorhead, G. B.**, De Wever, V., Templeton, G., & Kerk, D. (2009). Evolution of protein phosphatases in plants and animals. *The Biochemical journal*, 417(2), 401–409. <https://doi.org/10.1042/BJ20081986>
- Morgan J.** (2005). Global trends in candidemia: review of reports from 1995-2005. *Current infectious disease reports*, 7(6), 429–439. <https://doi.org/10.1007/s11908-005-0044-7>
- Morschhäuser J.** (2016). The development of fluconazole resistance in *Candida albicans* - an example of microevolution of a fungal pathogen. *Journal of microbiology (Seoul, Korea)*, 54(3), 192–201. <https://doi.org/10.1007/s12275-016-5628-4>
- Murad, A. M.**, d'Enfert, C., Gaillardin, C., Tournu, H., Tekaia, F., Talibi, D., Marechal, D., Marchais, V., Cottin, J., & Brown, A. J. (2001). Transcript profiling in *Candida albicans* reveals new cellular functions for the transcriptional repressors CaTup1, CaMig1 and CaNrg1. *Molecular microbiology*, 42(4), 981–993. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02713.x>
- Muszkieta, L.**, Carrion, S., Robinet, P., Beau, R., Elbim, C., Pearlman, E., & Latgé, J. P. (2014). The protein phosphatase PhzA of *A. fumigatus* is involved in oxidative stress tolerance and fungal virulence. *Fungal genetics and biology: FG & B*, 66, 79–85. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2014.02.009>
- Naglik, J. R.**, Challacombe, S. J., & Hube, B. (2003). *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 67(3), 400–428. <https://doi.org/10.1128/mmmbr.67.3.400-428.2003>
- Naglik, J. R.**, Moyes, D. L., Wächtler, B., & Hube, B. (2011). *Candida albicans* interactions with epithelial cells and mucosal immunity. *Microbes and infection*, 13(12-13), 963–976. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2011.06.009>
- Nagy, G.**, Hennig, G. W., Petrenyi, K., Kovacs, L., Pócsi, I., Dombradi, V., & Banfalvi, G. (2014). Time-lapse video microscopy and image analysis of adherence and growth patterns of *Candida albicans* strains. *Applied microbiology and biotechnology*, 98(11), 5185–5194. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5696-5>

- Netea, M. G.,** Brown, G. D., Kullberg, B. J., & Gow, N. A. (2008). An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. *Nature reviews. Microbiology*, 6(1), 67–78. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1815>
- Netea, M. G.,** Joosten, L. A., van der Meer, J. W., Kullberg, B. J., & van de Veerdonk, F. L. (2015). Immune defence against *Candida* fungal infections. *Nature reviews. Immunology*, 15(10), 630–642. <https://doi.org/10.1038/nri3897>
- Nett, J.,** Lincoln, L., Marchillo, K., Massey, R., Holoyda, K., Hoff, B., VanHandel, M., & Andes, D. (2007). Putative role of beta-1,3 glucans in *Candida albicans* biofilm resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 51(2), 510–520. <https://doi.org/10.1128/AAC.01056-06>
- Nobile, C. J.,** Fox, E. P., Nett, J. E., Sorrells, T. R., Mitrovich, Q. M., Hernday, A. D., Tuch, B. B., Andes, D. R., & Johnson, A. D. (2012). A recently evolved transcriptional network controls biofilm development in *Candida albicans*. *Cell*, 148(1-2), 126–138. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.10.048>
- Nobile, C. J.,** & Johnson, A. D. (2015). *Candida albicans* Biofilms and Human Disease. *Annual review of microbiology*, 69, 71–92. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091014-104330>
- Noble, S. M.,** & Johnson, A. D. (2005). Strains and strategies for large-scale gene deletion studies of the diploid human fungal pathogen *Candida albicans*. *Eukaryotic cell*, 4(2), 298–309. <https://doi.org/10.1128/EC.4.2.298-309.2005>
- Noble, S. M.,** French, S., Kohn, L. A., Chen, V., & Johnson, A. D. (2010). Systematic screens of a *Candida albicans* homozygous deletion library decouple morphogenetic switching and pathogenicity. *Nature genetics*, 42(7), 590–598. <https://doi.org/10.1038/ng.605>
- Obenauer, J. C.,** Cantley, L. C., & Yaffe, M. B. (2003). Scansite 2.0: Proteome-wide prediction of cell signaling interactions using short sequence motifs. *Nucleic acids research*, 31(13), 3635–3641. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg584>
- Oberley, L. W.,** & Spitz, D. R. (1984). Assay of superoxide dismutase activity in tumor tissue. *Methods in enzymology*, 105, 457–464. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(84\)05064-3](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(84)05064-3)
- Odds F. C.** (1987). *Candida* infections: an overview. *Critical reviews in microbiology*, 15(1), 1–5. <https://doi.org/10.3109/10408418709104444>
- Odds, F. C.,** Brown, A. J., & Gow, N. A. (2003). Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends in microbiology*, 11(6), 272–279. [https://doi.org/10.1016/s0966-842x\(03\)00117-3](https://doi.org/10.1016/s0966-842x(03)00117-3)

- Offley, S. R., & Schmidt, M. C.** (2019). Protein phosphatases of *Saccharomyces cerevisiae*. *Current genetics*, 65(1), 41–55. <https://doi.org/10.1007/s00294-018-0884-y>
- Olsen, J. V., Blagoev, B., Gnäd, F., Macek, B., Kumar, C., Mortensen, P., & Mann, M.** (2006). Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell*, 127(3), 635–648. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.09.026>
- Pannifer, A. D., Flint, A. J., Tonks, N. K., & Barford, D.** (1998). Visualization of the cysteinyl-phosphate intermediate of a protein-tyrosine phosphatase by x-ray crystallography. *The Journal of biological chemistry*, 273(17), 10454–10462. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.17.10454>
- Pappas, P. G., Kauffman, C. A., Andes, D. R., Clancy, C. J., Marr, K. A., Ostrosky-Zeichner, L., Reboli, A. C., Schuster, M. G., Vazquez, J. A., Walsh, T. J., Zaoutis, T. E., & Sobel, J. D.** (2016). Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 62(4), e1–e50. <https://doi.org/10.1093/cid/civ933>
- Pathak, R., Blank, H. M., Guo, J., Ellis, S., & Polymenis, M.** (2007). The Dcr2p phosphatase destabilizes Sic1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and biophysical research communications*, 361(3), 700–704. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.07.092>
- Pendrak, M. L., & Roberts, D. D.** (2011). Ribosomal RNA processing in *Candida albicans*. *RNA (New York, N.Y.)*, 17(12), 2235–2248. <https://doi.org/10.1261/rna.028050.111>
- Perlin D. S.** (2014). Echinocandin resistance, susceptibility testing and prophylaxis: implications for patient management. *Drugs*, 74(14), 1573–1585. <https://doi.org/10.1007/s40265-014-0286-5>
- Perlroth, J., Choi, B., & Spellberg, B.** (2007). Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis, and treatment. *Medical mycology*, 45(4), 321–346. <https://doi.org/10.1080/13693780701218689>
- Petrényi, K., Molero, C., Kónya, Z., Erdődi, F., Ariño, J., & Dombrádi, V.** (2016). Analysis of Two Putative *Candida albicans* Phosphopantothienoylcysteine Decarboxylase / Protein Phosphatase Z Regulatory Subunits Reveals an Unexpected Distribution of Functional Roles. *PloS one*, 11(8), e0160965. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160965>
- Pfaller, M. A., Moet, G. J., Messer, S. A., Jones, R. N., Castanheira, M.** (2011). Candida bloodstream infections: comparison of species distributions and antifungal resistance patterns in community-onset and nosocomial isolates in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2008-2009. *Antimicrob Agents Chemother* 55(2): 561-566.

- Polke, M.**, Leonhardt, I., Kurzai, O., & Jacobsen, I. D. (2018). Farnesol signalling in *Candida albicans* - more than just communication. *Critical reviews in microbiology*, 44(2), 230–243. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2017.1337711>
- Posas, F.**, Casamayor, A., Morral, N., & Ariño, J. (1992). Molecular cloning and analysis of a yeast protein phosphatase with an unusual amino-terminal region. *The Journal of biological chemistry*, 267(17), 11734–11740.
- Posas, F.**, Casamayor, A., & Ariño, J. (1993). The PPZ protein phosphatases are involved in the maintenance of osmotic stability of yeast cells. *FEBS letters*, 318(3), 282–286. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)80529-4](https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)80529-4)
- Posas, F.**, Camps, M., & Ariño, J. (1995). The PPZ protein phosphatases are important determinants of salt tolerance in yeast cells. *The Journal of biological chemistry*, 270(22), 13036–13041. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.22.13036>
- Poulain D.** (2015). *Candida albicans*, plasticity and pathogenesis. *Critical reviews in microbiology*, 41(2), 208–217. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2013.813904>
- Prakash, S.**, & Prakash, L. (2000). Nucleotide excision repair in yeast. *Mutation research*, 451(1-2), 13–24. [https://doi.org/10.1016/s0027-5107\(00\)00037-3](https://doi.org/10.1016/s0027-5107(00)00037-3)
- R Core Team.** (2014) R: A language and environment for statistical computing. *R Foundation for Statistical Computing*, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org/>.
- Rabilloud, T.**, Strub, J. M., Luche, S., van Dorsselaer, A., & Lunardi, J. (2001). A comparison between Sypro Ruby and ruthenium II tris (bathophenanthroline disulfonate) as fluorescent stains for protein detection in gels. *Proteomics*, 1(5), 699–704. [https://doi.org/10.1002/1615-9861\(200104\)1:5<699::AID-PROT699>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/1615-9861(200104)1:5<699::AID-PROT699>3.0.CO;2-C)
- Ritchie, M. E.**, Silver, J., Oshlack, A., Holmes, M., Diyagama, D., Holloway, A., & Smyth, G. K. (2007). A comparison of background correction methods for two-colour microarrays. *Bioinformatics* (Oxford, England), 23(20), 2700–2707. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm412>
- Robbins, N.**, Caplan, T., & Cowen, L. E. (2017). Molecular Evolution of Antifungal Drug Resistance. *Annual review of microbiology*, 71, 753–775. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-030117-020345>
- Rodriguez-Gabriel, M. A.**, Remacha, M., & Ballesta, J. P. (1998). Phosphorylation of ribosomal protein P0 is not essential for ribosome function but can affect translation. *Biochemistry*, 37(47), 16620–16626. <https://doi.org/10.1021/bi981396i>
- Ruiz, A.**, Muñoz, I., Serrano, R., González, A., Simón, E., & Ariño, J. (2004). Functional characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* VHS3 gene: a regulatory subunit of the

Ppz1 protein phosphatase with novel, phosphatase-unrelated functions. *The Journal of biological chemistry*, 279(33), 34421–34430. <https://doi.org/10.1074/jbc.M400572200>

Ruiz, A., González, A., Muñoz, I., Serrano, R., Abrie, J. A., Strauss, E., & Ariño, J. (2009). Moonlighting proteins Hal3 and Vhs3 form a heteromeric PPCDC with Ykl088w in yeast CoA biosynthesis. *Nature chemical biology*, 5(12), 920–928. <https://doi.org/10.1038/nchembio.243>

Rustchenko E. (2007). Chromosome instability in *Candida albicans*. *FEMS yeast research*, 7(1), 2–11. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2006.00150.x>

Samaranayake D. P., Hanes SD. (2011) Milestones in *Candida albicans* gene manipulations. *Fungal Genetics and Biology* 48, 858-865

San José, C., Monge, R. A., Pérez-Díaz, R., Pla, J., & Nombela, C. (1996). The mitogen-activated protein kinase homolog HOG1 gene controls glycerol accumulation in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Journal of bacteriology*, 178(19), 5850–5852. <https://doi.org/10.1128/jb.178.19.5850-5852.1996>

Sanglard D. (2016). Emerging Threats in Antifungal-Resistant Fungal Pathogens. *Frontiers in medicine*, 3, 11. <https://doi.org/10.3389/fmed.2016.00011>

Sanglard, D., Ischer, F., Monod, M., & Bille, J. (1996). Susceptibilities of *Candida albicans* multidrug transporter mutants to various antifungal agents and other metabolic inhibitors. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 40(10), 2300–2305.

Santos, M. A., & Tuite, M. F. (1995). The CUG codon is decoded in vivo as serine and not leucine in *Candida albicans*. *Nucleic acids research*, 23(9), 1481–1486. <https://doi.org/10.1093/nar/23.9.1481>

Sardi, J. C., Scorzoni, L., Bernardi, T., Fusco-Almeida, A. M., & Mendes Giannini, M. J. (2013). *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *Journal of medical microbiology*, 62(Pt 1), 10–24. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.045054-0>

Schaller, M., Borelli, C., Korting, H. C., & Hube, B. (2005). Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses*, 48(6), 365–377. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2005.01165.x>

Schulz, J. C., Zampieri, M., Wanka, S., von Mering, C., & Sauer, U. (2014). Large-scale functional analysis of the roles of phosphorylation in yeast metabolic pathways. *Science signaling*, 7(353), rs6. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2005602>

Scorzoni, L., de Paula E Silva, A. C., Marcos, C. M., Assato, P. A., de Melo, W. C., de Oliveira, H. C., Costa-Orlandi, C. B., Mendes-Giannini, M. J., & Fusco-Almeida, A. M.

- (2017). Antifungal Therapy: New Advances in the Understanding and Treatment of Mycosis. *Frontiers in microbiology*, 8, 36. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00036>
- Sellam, A., & Whiteway, M.** (2016). Recent advances on *Candida albicans* biology and virulence. *F1000Research*, 5, 2582. <https://doi.org/10.12688/f1000research.9617.1>
- Shi Y.** (2009). Serine/threonine phosphatases: mechanism through structure. *Cell*, 139(3), 468–484. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.10.006>
- Shim, E., & Park, S. H.** (2014). Identification of a novel Ser/Thr protein phosphatase Ppq1 as a negative regulator of mating MAP kinase pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and biophysical research communications*, 443(1), 252–258. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.11.110>
- Shrestha, S., Fosso, M. & Garneau-Tsodikova, S.** A combination approach to treating fungal infections. *Sci Rep* 5, 17070 (2015). <https://doi.org/10.1038/srep17070>
- Skrzypek, M. S., Binkley, J., Binkley, G., Miyasato, S. R., Simison, M., & Sherlock, G.** (2017). The Candida Genome Database (CGD): incorporation of Assembly 22, systematic identifiers and visualization of high throughput sequencing data. *Nucleic acids research*, 45(D1), D592–D596. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw924>
- Smith, D. A., Nicholls, S., Morgan, B. A., Brown, A. J., & Quinn, J.** (2004). A conserved stress-activated protein kinase regulates a core stress response in the human pathogen *Candida albicans*. *Molecular biology of the cell*, 15(9), 4179–4190. <https://doi.org/10.1091/mbc.e04-03-0181>
- Smyth, G. K.** (2005) Limma: linear models for microarray data In: Gentleman R, Carey V, Dudoit S, Irizarry R, Huber W, editors. Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor. *New York:Springer*; p.397-420.
- Staib, P., & Morschhäuser, J.** (2007). Chlamyospore formation in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*--an enigmatic developmental programme. *Mycoses*, 50(1), 1–12. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2006.01308.x>
- Stehr, F., Felk, A., Kretschmar, M., Schaller, M., Schäfer, W., & Hube, B.** (2000). Extrazelluläre hydrolytische Enzyme und ihre Relevanz bei *Candida-albicans*-Infektionen [Extracellular hydrolytic enzymes and their relevance during *Candida albicans* infections]. *Mycoses*, 43 Suppl 2, 17–21.
- Sudbery, P., Gow, N., & Berman, J.** (2004). The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends in microbiology*, 12(7), 317–324. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.05.008>

- Sugiyama, Y.**, Nakashima, S., Mirbod, F., Kanoh, H., Kitajima, Y., Ghannoum, M. A., & Nozawa, Y. (1999). Molecular cloning of a second phospholipase B gene, caPLB2 from *Candida albicans*. *Medical mycology*, 37(1), 61–67.
- Sutton, A.**, Immanuel, D., & Arndt, K. T. (1991). The SIT4 protein phosphatase functions in late G1 for progression into S phase. *Molecular and cellular biology*, 11(4), 2133–2148. <https://doi.org/10.1128/mcb.11.4.2133>
- Swoboda, R. K.**, Bertram, G., Delbrück, S., Ernst, J. F., Gow, N. A., Gooday, G. W., & Brown, A. J. (1994). Fluctuations in glycolytic mRNA levels during morphogenesis in *Candida albicans* reflect underlying changes in growth and are not a response to cellular dimorphism. *Molecular microbiology*, 13(4), 663–672. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1994.tb00460.x>
- Swoboda, R. K.**, Bertram, G., Hollander, H., Greenspan, D., Greenspan, J. S., Gow, N. A., Gooday, G. W., & Brown, A. J. (1993). Glycolytic enzymes of *Candida albicans* are nonubiquitous immunogens during candidiasis. *Infection and immunity*, 61(10), 4263–4271.
- Szabó K.**, Kónya Z., Erdódi F., Farkas I., & Dombrádi V. (2019a). Dissection of the regulatory role for the N-terminal domain in *Candida albicans* protein phosphatase Z1. *PloS one*, 14(2), e0211426. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211426>
- Szklarczyk, D.**, Morris, J. H., Cook, H., Kuhn, M., Wyder, S., Simonovic, M., Santos, A., Doncheva, N. T., Roth, A., Bork, P., Jensen, L. J., & von Mering, C. (2017). The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. *Nucleic acids research*, 45(D1), D362–D368. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw937>
- Szöör, B.**, Fehér, Z., Zeke, T., Gergely, P., Yatzkan, E., Yarden, O., & Dombrádi, V. (1998). pzl-1 encodes a novel protein phosphatase-Z-like Ser/Thr protein phosphatase in *Neurospora crassa*. *Biochimica et biophysica acta*, 1388(1), 260–266. [https://doi.org/10.1016/s0167-4838\(98\)00201-5](https://doi.org/10.1016/s0167-4838(98)00201-5)
- Tavanti, A.**, Davidson, A. D., Gow, N. A., Maiden, M. C., & Odds, F. C. (2005). *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. *Journal of clinical microbiology*, 43(1), 284–292. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.1.284-292.2005>
- Tsay, S.**, Williams, S., Mu, Y., Epton, E., Johnston, H., Farley, M. M., Harrison, L. H., Vonbank, B., Shrum, S., Dumyati, G., Zhang, A., Schaffner, W., Magill, S., & Vallabhaneni, S. (2018). 363. National Burden of Candidemia, United States, 2017. *Open Forum Infectious Diseases*, 5(Suppl 1), S142–S143. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofy210.374>

- Tsui, C.**, Kong, E. F., & Jabra-Rizk, M. A. (2016). Pathogenesis of *Candida albicans* biofilm. *Pathogens and disease*, 74(4), ftw018. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftw018>
- Uppuluri, P.**, Chaturvedi, A. K., Srinivasan, A., Banerjee, M., Ramasubramaniam, A. K., Köhler, J. R., Kadosh, D., & Lopez-Ribot, J. L. (2010). Dispersion as an important step in the *Candida albicans* biofilm developmental cycle. *PLoS pathogens*, 6(3), e1000828. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000828>
- Urban, C.**, Xiong, X., Sohn, K., Schröppel, K., Brunner, H., & Rupp, S. (2005). The „moonlighting” protein Tsalp is implicated in oxidative stress response and in cell wall biogenesis in *Candida albicans*. *Molecular microbiology*, 57(5), 1318–1341. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04771.x>
- Varma, A.**, Singh, B. B., Karnani, N., Lichtenberg-Fraté, H., Höfer, M., Magee, B. B., & Prasad, R. (2000). Molecular cloning and functional characterisation of a glucose transporter, CaHGT1, of *Candida albicans*. *FEMS microbiology letters*, 182(1), 15–21. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2000.tb08866.x>
- Vediyappan, G.**, Rossignol, T., & d'Enfert, C. (2010). Interaction of *Candida albicans* biofilms with antifungals: transcriptional response and binding of antifungals to beta-glucans. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54(5), 2096–2111. <https://doi.org/10.1128/AAC.01638-09>
- Vialás, V.**, Perumal, P., Gutierrez, D., Ximénez-Embún, P., Nombela, C., Gil, C., & Chaffin, W. L. (2012). Cell surface shaving of *Candida albicans* biofilms, hyphae, and yeast form cells. *Proteomics*, 12(14), 2331–2339. <https://doi.org/10.1002/pmic.201100588>
- Vissi, E.**, Clotet, J., de Nadal, E., Barceló, A., Bakó, E., Gergely, P., Dombrádi, V., & Ariño, J. (2001). Functional analysis of the *Neurospora crassa* PZL-1 protein phosphatase by expression in budding and fission yeast. *Yeast (Chichester, England)*, 18(2), 115–124. [https://doi.org/10.1002/1097-0061\(20010130\)18:2<115::AID-YEA653>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/1097-0061(20010130)18:2<115::AID-YEA653>3.0.CO;2-G)
- Vlastaridis, P.**, Kyriakidou, P., Chaliotis, A., Van de Peer, Y., Oliver, S. G., & Amoutzias, G. D. (2017). Estimating the total number of phosphoproteins and phosphorylation sites in eukaryotic proteomes. *GigaScience*, 6(2), 1–11. <https://doi.org/10.1093/gigascience/giw015>
- Wächtler, B.**, Wilson, D., Haedicke, K., Dalle, F., & Hube, B. (2011). From attachment to damage: defined genes of *Candida albicans* mediate adhesion, invasion and damage during interaction with oral epithelial cells. *PloS one*, 6(2), e17046. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017046>
- Walsh, T. J.**, Anaissie, E. J., Denning, D. W., Herbrecht, R., Kontoyiannis, D. P., Marr, K. A., Morrison, V. A., Segal, B. H., Steinbach, W. J., Stevens, D. A., van Burik, J. A., Wingard,

- J. R., Patterson, T. F., & Infectious Diseases Society of America (2008). Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America. *Clinical infectious diseases* : an official publication of the Infectious Diseases Society of America, 46(3), 327–360. <https://doi.org/10.1086/525258>
- Warner, J. R.**, Kumar, A., Udem, S. A., & Wu, R. S. (1972). Ribosomal proteins and the assembly of ribosomes in eukaryotes. *The Biochemical journal*, 129(3), 29P–30P. <https://doi.org/10.1042/bj1290029p>
- Wendland, J.**, Schaub, Y., & Walther, A. (2009). N-acetylglucosamine utilization by *Saccharomyces cerevisiae* based on expression of *Candida albicans* NAG genes. *Applied and environmental microbiology*, 75(18), 5840–5845. <https://doi.org/10.1128/AEM.00053-09>
- Yamada-Okabe, T.**, & Yamada-Okabe, H. (2002). Characterization of the CaNAG3, CaNAG4, and CaNAG6 genes of the pathogenic fungus *Candida albicans*: possible involvement of these genes in the susceptibilities of cytotoxic agents. *FEMS microbiology letters*, 212(1), 15–21. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2002.tb11238.x>
- Yenush, L.**, Merchan, S., Holmes, J., & Serrano, R. (2005). pH-Responsive, posttranslational regulation of the Trk1 potassium transporter by the type 1-related Ppz1 phosphatase. *Molecular and cellular biology*, 25(19), 8683–8692. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.19.8683-8692.2005>
- Yenush, L.**, Mulet, J. M., Ariño, J., & Serrano, R. (2002). The Ppz protein phosphatases are key regulators of K⁺ and pH homeostasis: implications for salt tolerance, cell wall integrity and cell cycle progression. *The EMBO journal*, 21(5), 920–929. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.5.920>
- Yu, L.**, Ling, G., Deng, X., Jin, J., Jin, Q., & Guo, N. (2011). In vitro interaction between fluconazole and triclosan against clinical isolates of fluconazole-resistant *Candida albicans* determined by different methods. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55(7), 3609–3612. <https://doi.org/10.1128/AAC.01313-10>
- Zhang, C.**, García-Rodas, R., Molero, C., de Oliveira, H. C., Tabernero, L., Reverter, D., Zaragoza, O., & Ariño, J. (2019). Characterization of the atypical Ppz/Hal3 phosphatase system from the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Molecular microbiology*, 111(4), 898–917. <https://doi.org/10.1111/mmi.14181>

11. Tárgyszavak

Candida albicans

protein foszfatáz Z1

oxidatív stressz

proteomika

foszfoproteomika

transzkriptomika

RNS szekvenálás

RT-qPCR

biofilm

transzláció

Candida albicans

protein phosphatase Z1

oxidative stress

proteomics

phosphoproteomics

transcriptomics

RNA sequencing

RT-qPCR

biofilm

translation

12. Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt köszönettel tartozom témavezetőmnek Dr. Dombrádi Viktor Béla egyetemi tanárnak, aki végig támogatott, elméleti és gyakorlati tanácsokkal látott el, valamint elősegítette, hogy ez a munka létrejöhessen.

Szeretnék köszönetet mondani a Dombrádi munkacsoport egykori és jelenlegi tagjainak: Dr. Petrényi Katalinnak, aki már Msc-s tanulmányaim alatt segített a laboratóriumi protokollok elsajátításában; Dr. Farkas Ilonának, aki gyakorlati és elméleti tanácsokkal látott el, és segített az értekezés, valamint a tézisek javításában. Végül Tankáné Farkas Andrea asszisztensnek, aki kiváló technikai segítséget nyújtott az évek során és lelkileg támogatott a nehéz időkben.

Köszönettel tartozom Dr. Virág László professzornak, aki támogatta munkám elvégzését az általa vezetett Orvosi Vegytani Intézetben, valamint az Intézet összes dolgozójának, akik hozzájárultak kísérleteim elvégzéséhez.

Köszönet jár Dr. Márkus Bernadettnek, aki a proteomikai vizsgálatokat végezte, valamint Dr. Csősz Évának, a Proteomika labor vezetőjének és Dr. Tőzsér József intézetvezető professzornak, akik ezt a munkát lehetővé tették. Köszönettel tartozom Dr. Pfliegler Walter Péternek és Boros Enikőnek, a biofilm vizsgálatokért.

Az RNS szekvenálásért és annak kiértékeléséért köszönetet mondok Dr. Póliska Szilárdnak, míg a DNS chip tervezéséért Dr. Miksei Mártonnak és az eredmények kiértékeléséért Dr. Emri Tamásnak jár köszönet. A konfokális mikroszkópos felvételek készítésében és a kiértékelésben, valamint az áramlási citometriás kísérletek kivitelezésében Dr. Kovács Katalin segített, amit köszönök. Köszönöm Dr. Jakab Ágnesnek, hogy segítő kezet nyújtott az enzimaktivitás mérések kivitelezésénél és a fáziskontraszt mikroszkópos kísérleteknél valamint, hogy több módszerhez adott hasznos gyakorlati tanácsot. Köszönet jár Lama Hassan Bouissa MSc hallgatónak, aki a mikroszkópos képek kiértékelésében segített, és Dr. Pócsi István professzor úrnak, aki számos hasznos tanáccsal látott el.

Köszönetet mondok Prof. Alexander D. Johnson-nak (Department of Biochemistry and Biophysics, University of California, San Francisco, USA), aki rendelkezésünkre bocsátotta a QMY23 törzset, valamint Dr. Ádám Csabának, aki laborunkban korábban előállította a KO törzset.

Végül, de nem utolsósorban hálával tartozom családomnak, férjemnek és barátaimnak, akik végig támogattak és tartották bennem a lelket.

Munkámat a NKFIH K108989 pályázat, valamint az Emberi Erőforrások Minisztériuma ÚNKP-18-3 kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programja támogatta.

13. Publikációs lista



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/136/2020.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Tóthné Szabó Krisztina
Neptun kód: GXG2A2
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Szabó, K.**, Jakab, Á., Pólska, S., Petrényi, K., Kovács, K., Issa, L. H. B., Emri, T., Pócsi, I., Dombrádi, V.: Deletion of the fungus specific protein phosphatase Z1 exaggerates the oxidative stress response in *Candida albicans*. BMC Genomics. 20, 1-17, 2019. IF: 3.501 (2018)
2. Márkus, B., **Szabó, K.**, Pfliegler, V. P., Petrényi, K., Boros, E., Pócsi, I., Tózsér, J., Csősz, É., Dombrádi, V.: Proteomic analysis of protein phosphatase Z1 from *Candida albicans*. PLoS One. 12 (8), 1-21, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0183176> IF: 2.766

További közlemények

3. **Szabó, K.**, Kónya, Z., Erdődi, F., Farkas, I., Dombrádi, V.: Dissection of the regulatory role for the N-terminal domain in *Candida albicans* protein phosphatase Z1. PLoS One. 14 (2), 1-27, 2019. IF: 2.776 (2018)

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 9,043

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 6,267

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2020.04.29.



Értekezéshez kapcsolódó konferencia prezentációk

Előadások

Szabó Krisztina, Dombrádi Viktor. Proteomic analysis of protein phosphatase Z1 from *Candida albicans*. Annual Symposium of the Doctoral School of Molecular Medicine, Debrecen, 2017. szeptember 7.

Szabó Krisztina, Dombrádi Viktor. Egy gomba specifikus protein foszfatáz vizsgálata (Investigation of a fungal specific protein phosphatase), New National Excellence Program of the Ministry of Human Capacities, 2019. június 17.

Szabó Krisztina, Dombrádi Viktor. Synergistic action of protein phosphatase Z1 deletion and oxidative stress in the opportunistic pathogen *Candida albicans*. 18th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology, Budapest, 2019. július 03-05.

Szabó Krisztina, Dombrádi Viktor. The role of protein phosphatase Z1 in oxidative stress response of *Candida albicans*. Annual Symposium of the Doctoral School of Molecular Medicine, Debrecen, 2017. szeptember 3.

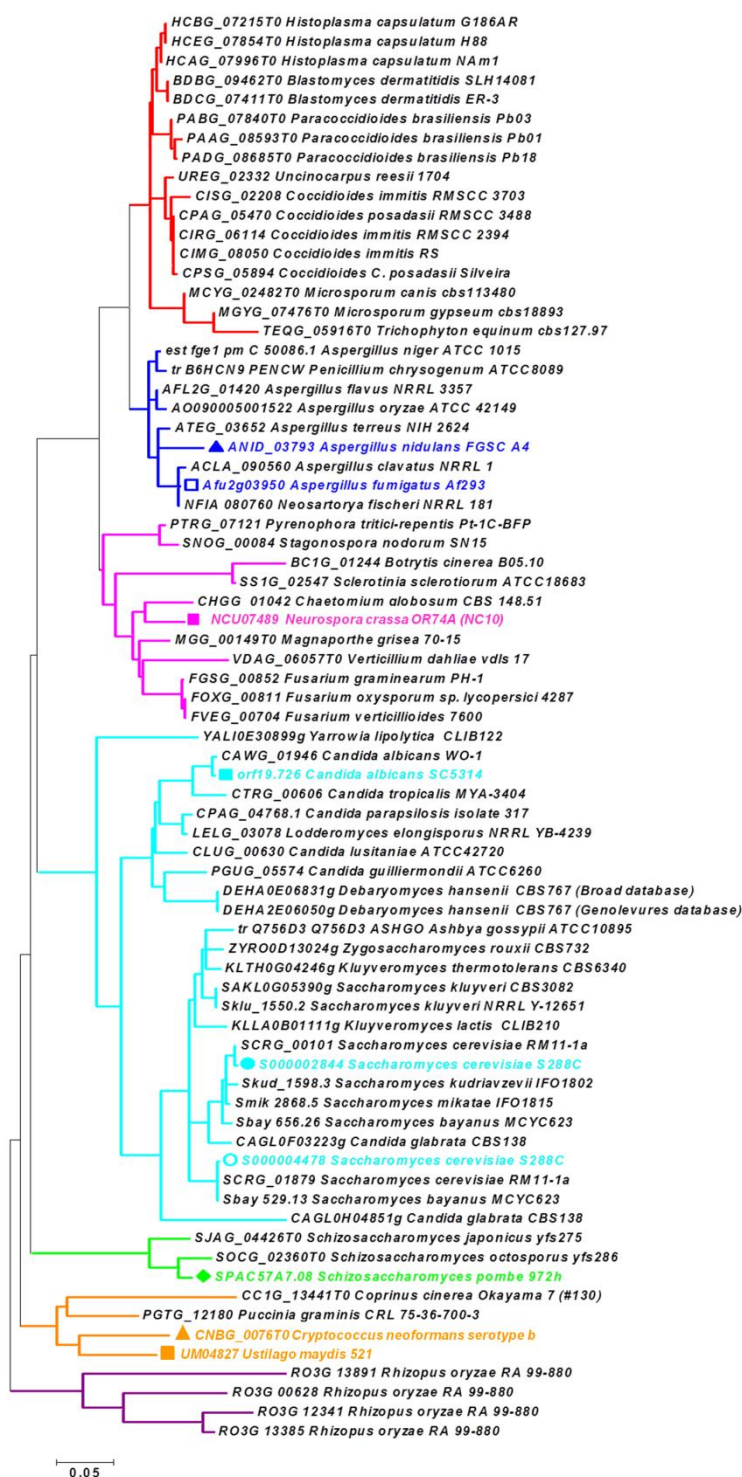
Poszter prezentációk

Szabó Krisztina, Kónya Zoltán, Erdődi Ferenc, Farkas Ilona, Dombrádi Viktor. Functional dissection of *Candida albicans* protein phosphatase Z1, Europhosphatase 2017, Párizs, 2017. 07.23-07.28.

Szabó Krisztina, Jakab Ágnes, Pólska Szilárd, Emri Tamás, Pócsi István, Dombrádi Viktor. The effect of the CaPpz1 protein phosphatase on gene expression in *Candida albicans* under oxidative stress conditions. Hungarian Molecular Life Sciences 2019 Eger, 2019.03.29-03.31.

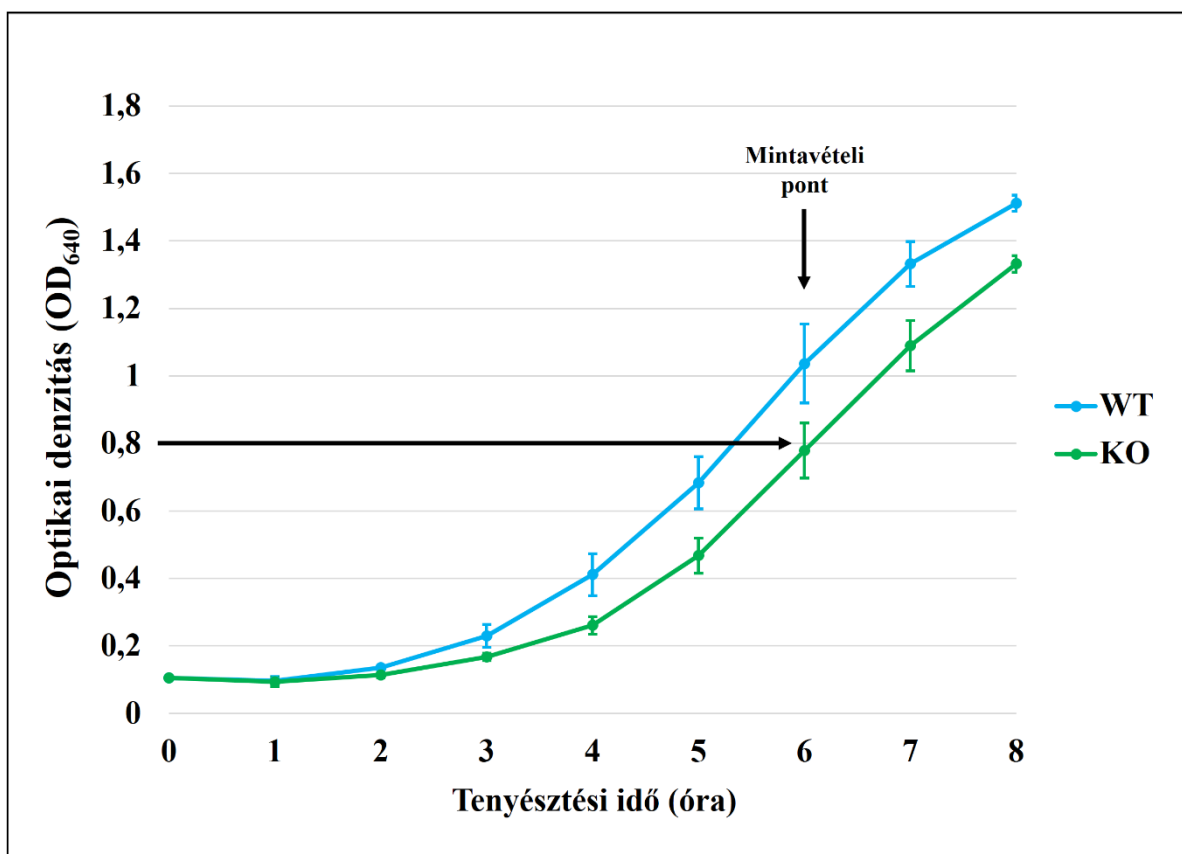
Szabó Krisztina, Jakab Ágnes, Pólska Szilárd, Kovács Katalin, Lama Hasan Bou Issa, Emri Tamás, Pócsi István, Dombrádi Viktor. Deletion of CaPpz1 protein phosphatase enhances the effects of oxidative stress in *Candida albicans*, Europhosphatase 2019, Debrecen, 2019. 06.11.-16.

14. Függelék



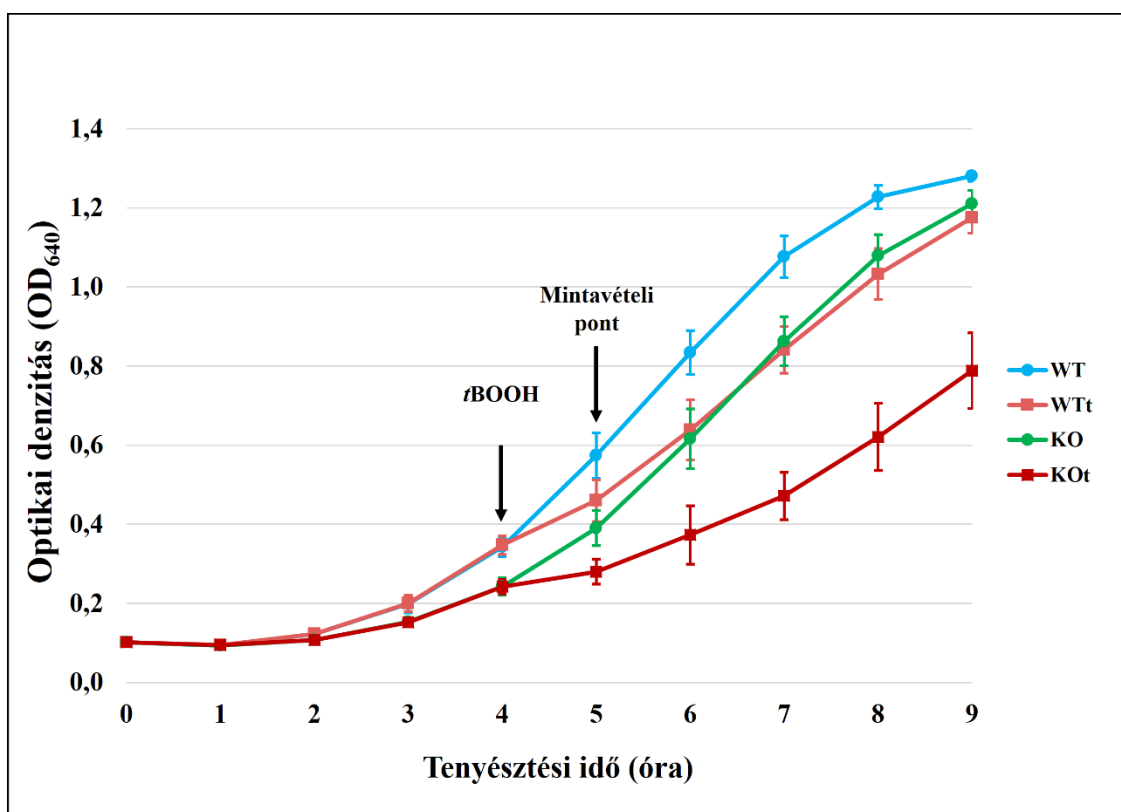
1. Függelék. A protein foszfatáz Z fehérje filogenetikája a gombák világában

A filogenetikai fa a 7. ábrával egyenértékű. A jobb megértés végett itt a fajneveket feltüntetve ábrázoltuk a fát. Az ábrán található jelölések megegyeznek a 7. ábra szövegében leírtakkal. Skála: 0,05 aminosav szubsztitúció/hely.



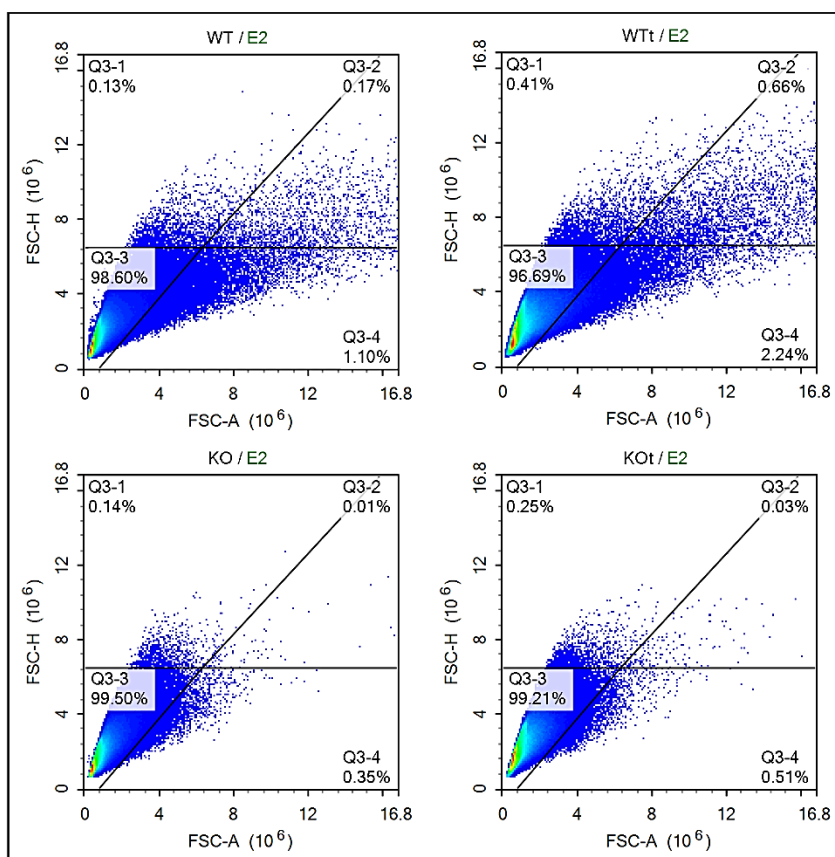
2. Függelék. *C. albicans* törzsek tenyésztése a proteomikai vizsgálatokhoz

A kontroll QMY23 (WT) és az ennek megfelelő genetikai háttérrel rendelkező foszfatáz deléciós mutáns (KO) törzsek növekedése látható normál körülmények között (ld.: *Módszerek* fejezet 5.2.1.1). A sejtek optikai denzitását 640 nm-en mértük. Az átlag $\pm$ SD értékek 5 biológiai párhuzamos mintából származnak. A mutáns sejtek lassabban növekedtek, így a mintavételi pontot a KO törzs növekedése alapján határoztuk meg. A sejteket a 0,8-as optikai denzitás érték elérésekor gyűjtöttük össze.



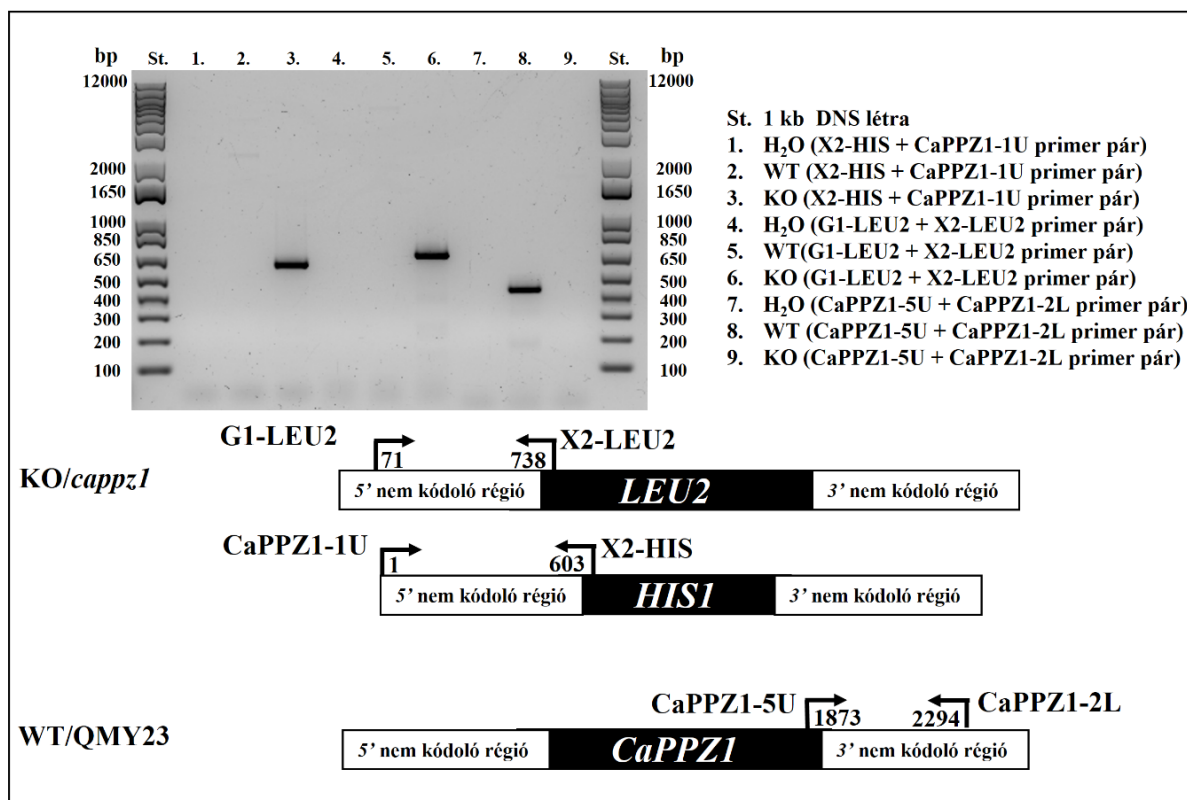
3. Függelék. *C. albicans* törzsek tenyésztése a transzkriptomikai vizsgálatokhoz

A kontroll (WT) és az ennek megfelelő genetikai háttérrel rendelkező foszfatáz deléciós mutáns (KO) törzsek növekedése látható normál és oxidatív stressz körülmények között (ld.: *Módszerek fejezet 5.2.1.1*). Az oxidatív stresszt okozó ágenst (0,4 mM végkoncentrációjú *tBOOH*) a 4. órában, a nyíllal jelzett ponton adtuk a megfelelő mintákhoz (KOt és WTt). A sejtek optikai densitását 640 nm-en mértük. Az átlag $\pm$ SD értékek 4 független párhuzamos mintából származnak. A KO törzs növekedési rátája alacsonyabb volt a kontroll törzshöz képest, valamint a kezelés mindkét törzs növekedését visszaszorította. A sejteket az 5. órában, 1 órás oxidatív stressz kezelést követően gyűjtöttük össze.



4. Függelék. *C. albicans* sejtek morfológiai vizsgálata áramlási citométerrel normál és oxidatív stressz körülmények között

Az ábrán egy-egy reprezentatív plotot láthatunk minden mintára (WT, WTt, KO, KOt). A plotokon az FSC-H-t ábrázoltuk a FSC-A függvényében. Az áramlási citometriás vizsgálatokat FungaLight™ festést követően végeztük. A festési protokollt a *Módszerek* fejezet 5.2.1.5 pontjában ismertettem. Segítségével a morfológiai formák (élesztő, hifa) százalékos arányát határoztuk meg az egyes mintákban. A hármas kvadránsban (Q3-3) rögzített események adták az élesztősejtes formákat, míg a másik három kvadráns a hifa populációt (Q3-1, Q3-2 és Q3-4). Az események eloszlását a 4 kvadránsban százalékosan tüntettük fel.



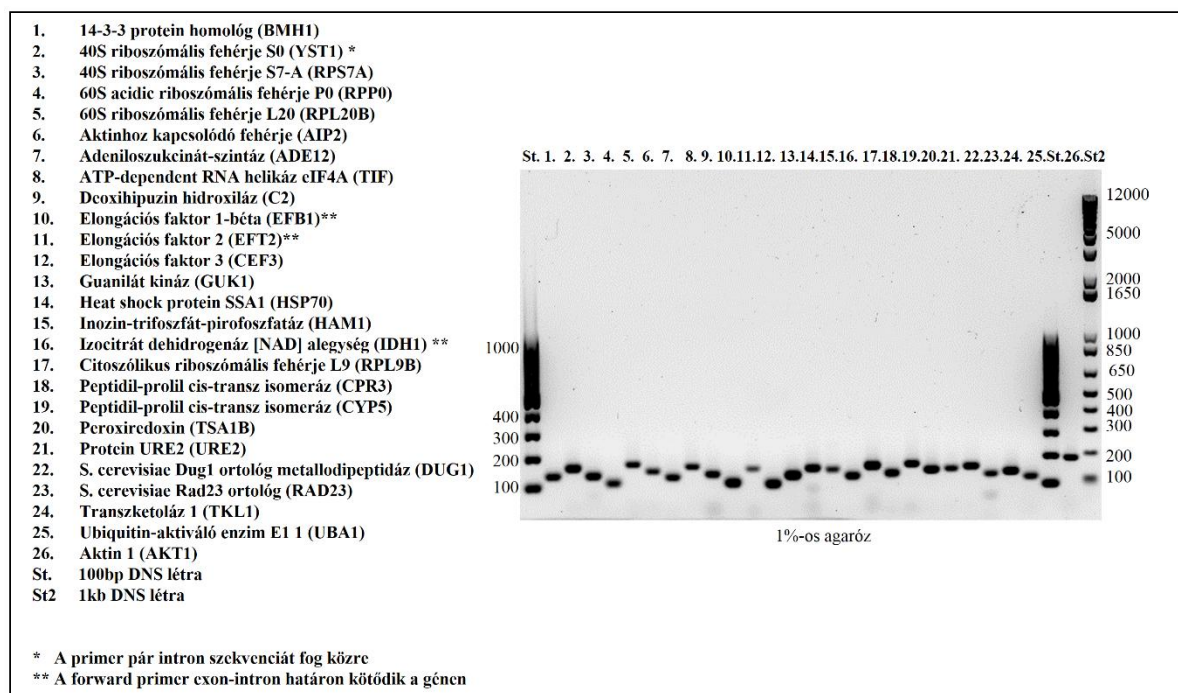
5. Függelék. A *C. albicans* törzsek genotípusának ellenőrzése

A törzsek genetikai hátterét minden esetben PCR segítségével ellenőriztük. A különböző primer párok az adott marker génekre (LEU2, HIS1), illetve a *CaPPZ1* génre specifikusak (Ádám és mtsai., 2012), amelyek hibridizációs helyét a sematikus ábrán nyilak segítségével jelöltük. A primer párokat úgy terveztük, hogy az egyik oligonukleotid a *PPZ1* gén nem kódoló régiójához kötődjön, míg a másik primer a markergénre vagy a *CaPPZ1* génkódoló régiójára legyen specifikus, így kimutatható vele a KO törzsben a *CaPPZ1* génbe ékelődött marker gén, valamint a WT törzsben az intakt *PPZ1* gén. A WT törzsnél azért nem kapunk sávot a marker gének esetében, mert az integrációjuk nem a *CaPPZ1* génbe történt. A KO törzsben minden esetben sikerült kimutatni mind a *LEU2*, mind a *HIS1* marker integrálódását a megfelelő helyre, míg a WT törzsben bizonyítottuk a *PPZ1* gén jelenlétét. A DNS létra sávjainak méreteit bázispárban (bp) adtuk meg. A következő táblázatban mutatom be a kísérletben használt oligonukleotidok tulajdonságait. A primereket Ádám és mtsai. (2012) alapján terveztük.

Primer neve	Primer szekvencia (5'-3')	T _m (°C)**	Termék (bp)
G1-LEU2	ACACAAGGACTGGCACACGCAC	70,3	668
X2-LEU2	CGGTACCGACGTGATCACCTGGTA	71,1	
CaPPZ1-1U	CGTTGTGTAATGGCTAGGAG	58,2	603
X2-HIS	TAAACTGTATATCGGCACCG	58,5	
CaPPZ1-5U	ATCCTTTAGATAGTGCTGC	51,8	422
CaPPZ1-2L*	TAGATATTTTGGTCCGTGTG	57,5	

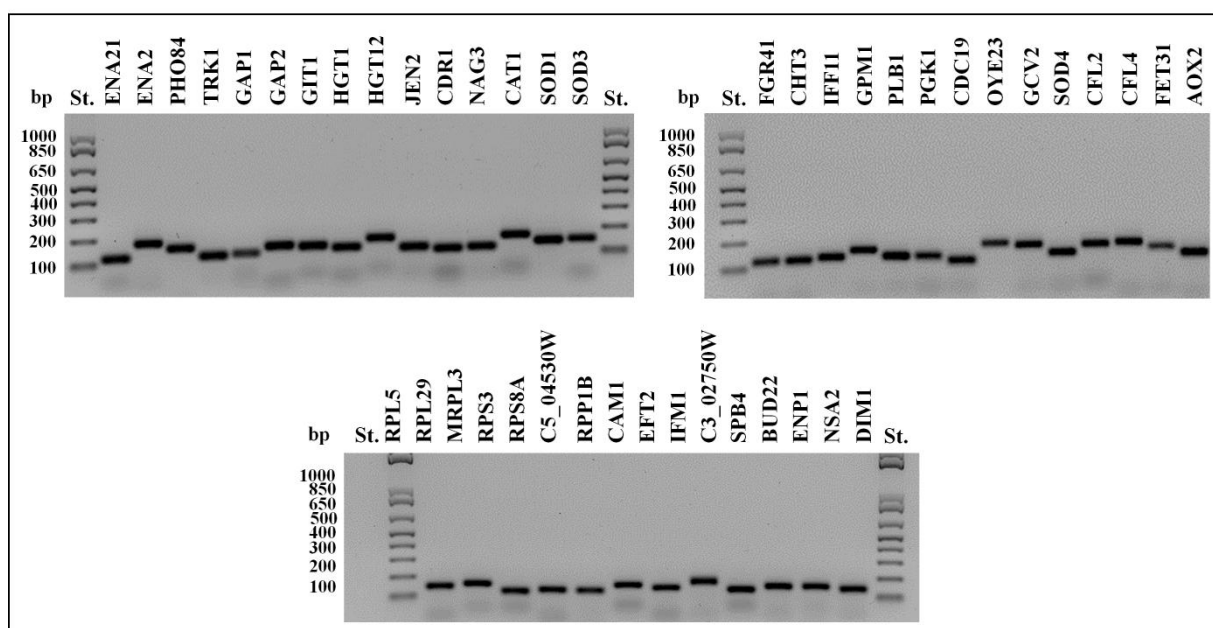
* Egy C-t elhagytunk az eredeti (Ádám és mtsai., 2012) primer szekvencia 5'-végéről.

** Oligo Analyser 1.0.2 szoftver segítségével számított olvadási hőmérséklet.



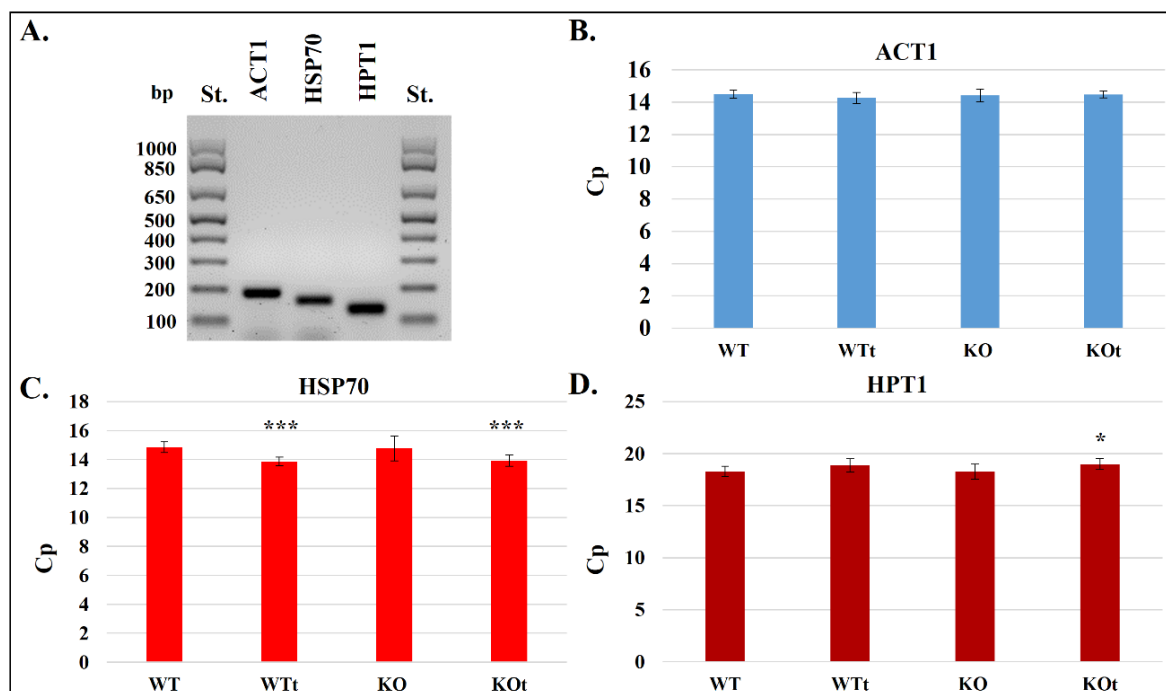
6. Függelék. A proteomikai mérések kiegészítéséhez használt oligonukleotidok ellenőrzése

A primer párok PCR-rel való ellenőrzéséhez templátként WT mintából származó cDNS-t használtunk az *Anyagok és módszerek* 5.2.2.4 pontjában leírt módon. A 2. táblázat foglalja össze a primer párok és a PCR termékek jellemzőit. Az összes oligonukleotid pár megfelelően működött, ugyanis minden esetben egyetlen sávot kaptunk a várt méretnél. A St. jelzésű DNS létrák sávméreteit bázispárban (bp) adtuk meg.



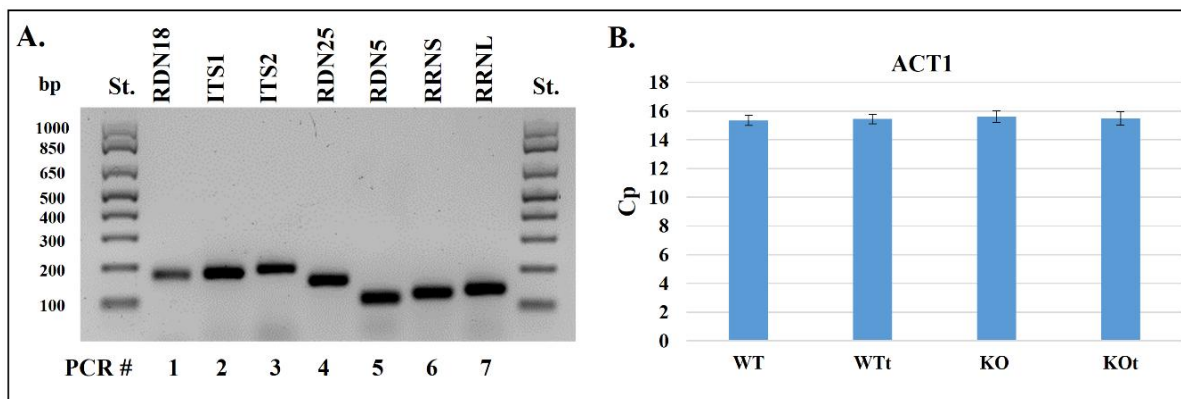
7. Függelék. A transzkriptomikai vizsgálatok során validálásra használt oligonukleotidok ellenőrzése

A primer párok PCR-rel való ellenőrzéséhez templátként WT mintából származó gDNS-t használtunk az *Anyagok és módszerek* 5.2.2.4 pontjában leírt módon. A primer párokat és a PCR termékek jellemzőit a 3. táblázat tartalmazza. Az összes oligonukleotid pár megfelelően működött, ugyanis minden esetben egyetlen sávot kaptunk a várt méretnél. A St. jelzésű 1kb DNS létra sávméreteit bázispárban (bp) adtuk meg.



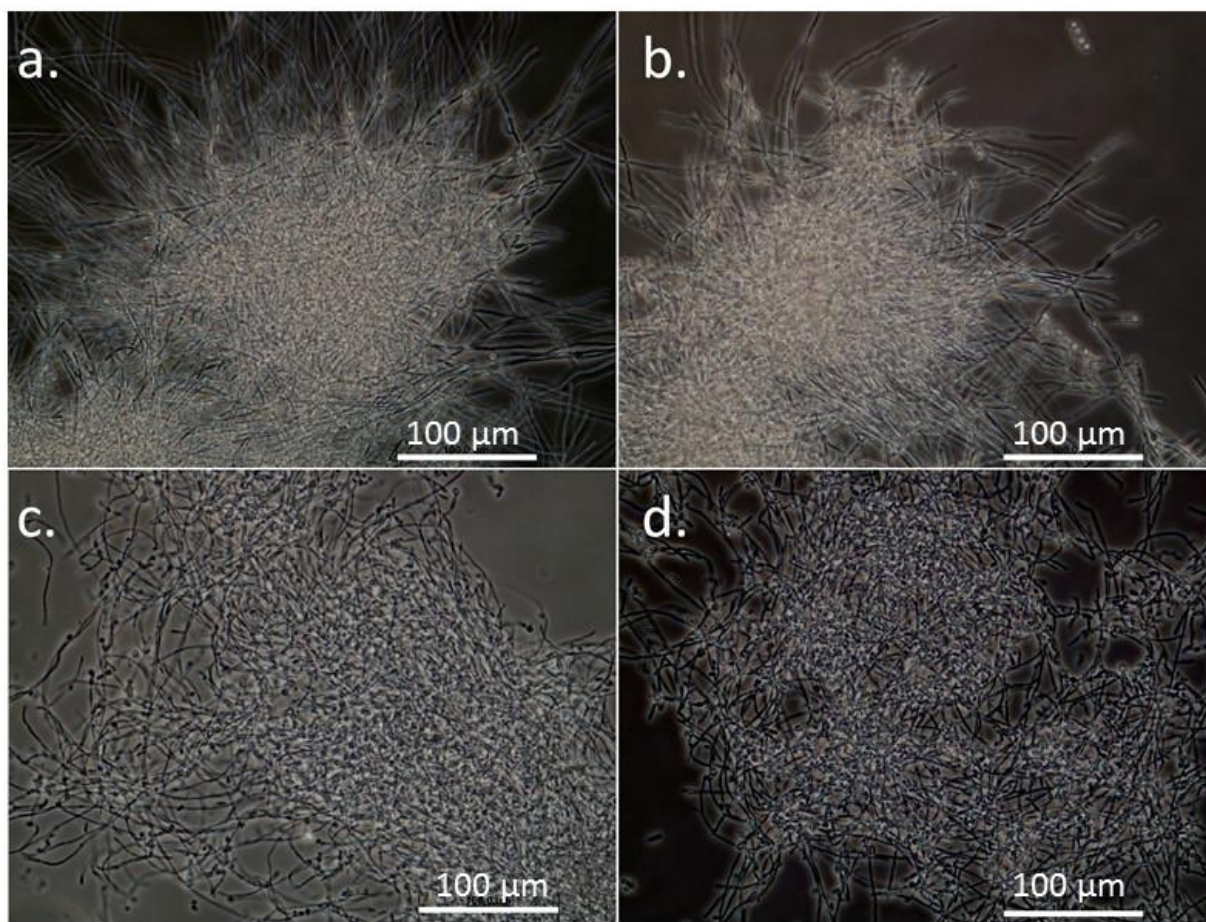
8. Függelék. Az RT-qPCR kísérletekhez tervezett normalizáló gének ellenőrzése

3 általánosan használt normalizáló gént teszteltünk az általunk tervezett kísérleti körülmények között. Az oligonukleotid primerek jellemzése a 3. táblázatban található. **A.:** Az oligonukleotid párok PCR-rel való ellenőrzéséhez templátként WT mintából származó gDNS-t használtunk. Az összes oligonukleotid megfelelően működött, ugyanis minden esetben egyetlen sávot kaptunk a várt méretnél. A St. jelzésű 1kb DNS létra sávméreteit bázispárban (bp) adtuk meg. **B.-D.:** RT-qPCR során kapott nyers Cp értékeket oszlop diagramon ábrázoltuk abból a célból, hogy lássuk, mennyire változnak az abszolút értékek a különböző kísérleti körülmények között. Ebből az eredményből arra következtettünk, hogy csak az *ACT1* gén alkalmazható megbízhatóan normalizáló génként, ugyanis a *HSP70* és a *HPT1* gének Cp értékei *tBOOH* kezelés hatására szignifikánsan változtak a WTt és/illetve KOt mintákban. Az ábrán 7 független biológiai párhuzamos minta átlagai $\pm$ SD látható. A p értékeket Student-féle t-tesztel számoltuk. $*=p < 0.05$ és $***=p < 0.001$.



9. Függelék. Az rRNS érés folyamatának vizsgálatára tervezett primer párok ellenőrzése és az RT-qPCR mérés során használt *ACT1* normalizáló gén validálása

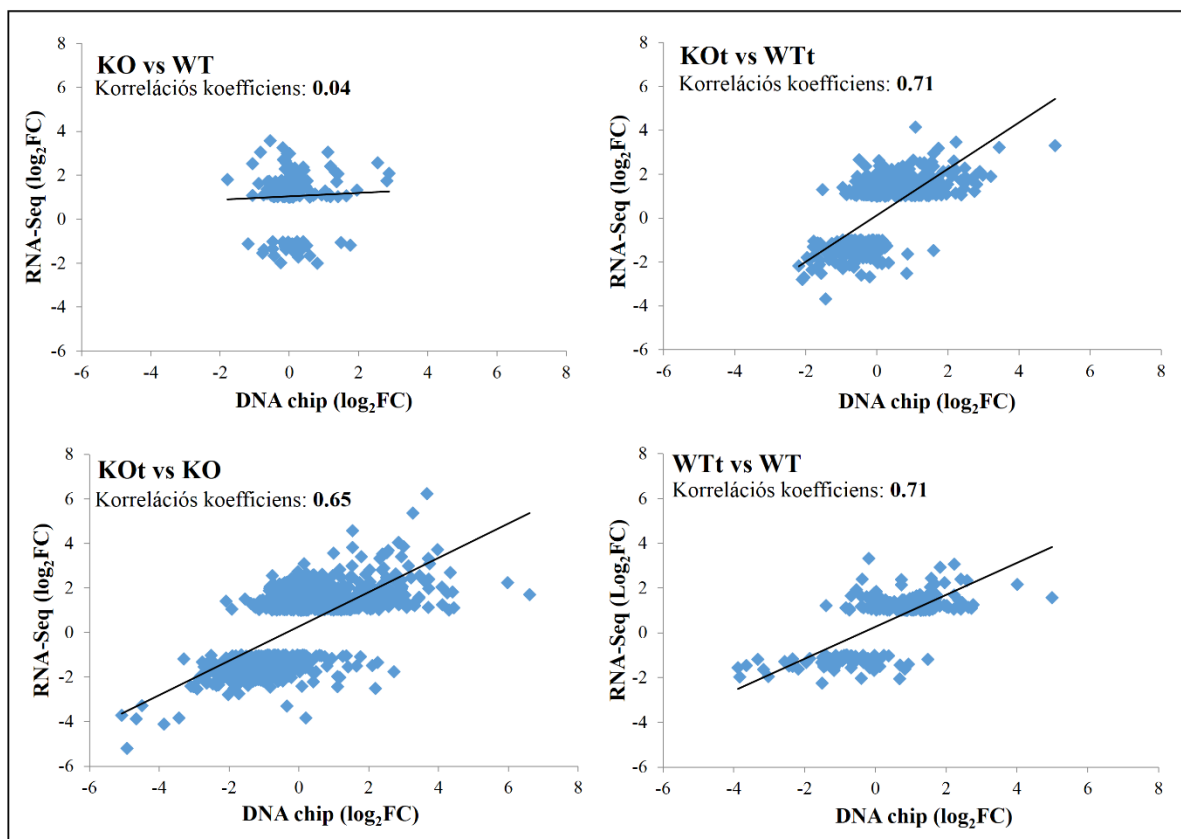
A.: A 20. ábrán bemutatott primer párok PCR-rel való ellenőrzéséhez templátként WT mintából származó gDNS-t használtunk. Az összes oligonukleotid pár megfelelően működött, ugyanis minden esetben egyetlen sávot kaptunk a várt méretnél. Az St. jelzésű 1kb DNS létra sávméreteit bázispárban (bp) adtuk meg. A primer párok és a PCR termékek tulajdonságait a 4. táblázat tartalmazza. **B.:** RT-qPCR segítségével ellenőriztük a random hexamer primerrel átírt cDNS-en a vonatkozási alapként választott *ACT1* normalizáló génként való használhatóságát. A 7 biológiai replika nyers Cp értékeinek átlagát $\pm$ SD láthatjuk az ábrán. Megállapítható, hogy az *ACT1* gén ebben az esetben is használható volt normalizálásra, ugyanis sem a foszfátáz hiánya, sem a tBOOH kezelés nem befolyásolta a nyers Cp értékeket.



10. Függelék. A kontroll (WT) és mutáns (KO) törzsek által képzett biofilm morfológiája

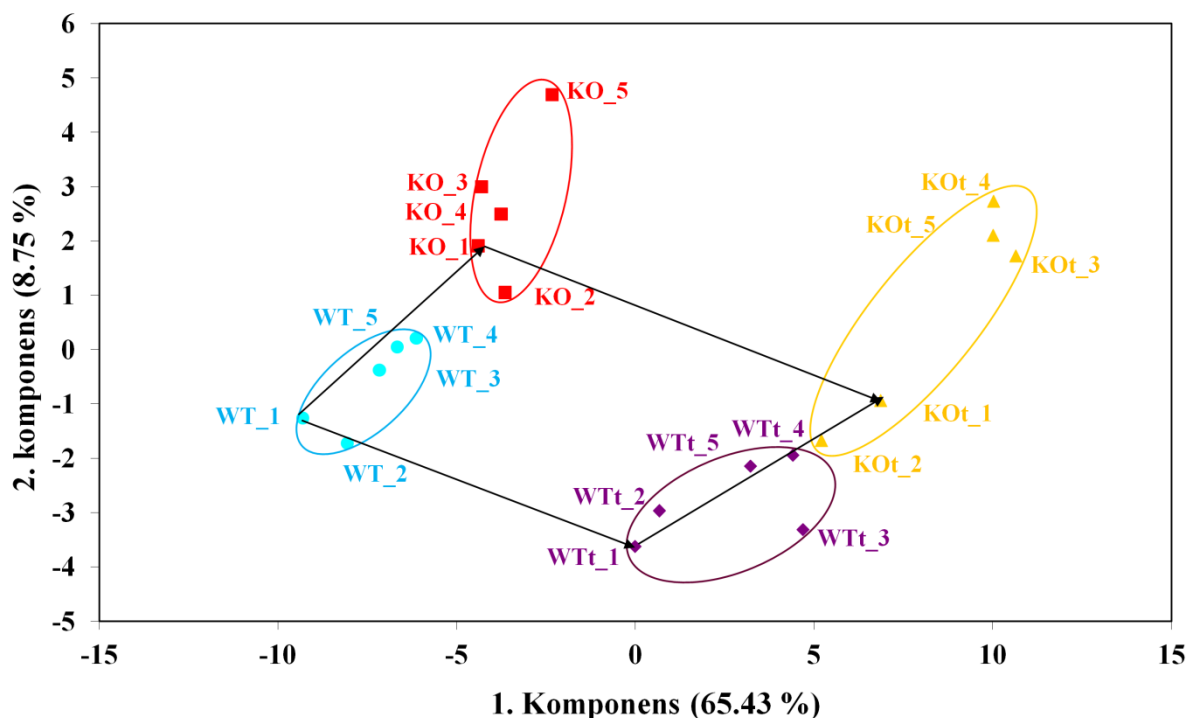
A biofilm képződéséről fáziskontraszt mikroszkóppal készítettünk felvételeket. Az *ábra* egy-egy reprezentatív képen mutatja be a KO és WT törzs biofilm képződését a különböző tápoldatokban. A képek 24 órás 37 °C-os inkubációt követően készültek az RPMI-1640 és a Spider tápoldat esetében is. **a.:** WT törzs RPMI-1640 tápoldatban, **b.:** KO törzs RPMI-1640 tápoldatban, **c.:** WT törzs Spider tápoldatban, **d.:** KO törzs Spider tápoldatban

Mindkét gomba törzs erőteljesen hifázott az RPMI-1640 táplevesben, míg a szelektív Spider médiumban már kevesebb hifa és több élesztő sejt (fekete foltok) volt jelen. Az élesztő sejtek mennyisége a KO törzsben nagyobb, mint a WT törzsben, ami megmagyarázza a KO törzs erősebb biofilmképző hajlamát (8. táblázat).



11. Függelék. Az RNS szekvenáláson és DNS chip hibridizáción alapuló génexpressziós adatok közötti korreláció

Az RNS szekvenálás (RNA-Seq) relatív génexpressziós adatainak átlagát hasonlítottuk össze az egy mérésből származó DNS chip adatokkal (log₂FC értékben kifejezve) négyféle relációban. Az RNA-Seq kis változást mutató, -1 és +1 közötti értékeit kihagytuk az analízisből. Minden összehasonlításnál megadtuk a Pearson-féle korrelációs együtthatót. A KO vs. WT összehasonlítást leszámítva, a két független eljárással nyert adatok jól korreláltak egymással.



12. Függelék. Az RT-qPCR adatok minőségi ellenőrzése főkomponens analízissel (PCA)

A számok az egymástól független biológiai párhuzamosokat jelölik. A színek az egy kísérleti csoportba tartozó mintákat reprezentálják. Az összetartozó mintákat bekarikáztuk, és a köztük lévő különbségeket nyilakkal érzékeltettük. A nyilak iránya a kísérletek kiértékelésének logikus menetét mutatja, vagyis a nyilak hossza mutatja az eltérések mértékét, amelyet önmagában az oxidatív kezelés, a foszfataz hiánya vagy a kettő együttesen hozott létre.

Az RT-qPCR adatok PCA analízise során szintén egymás mellé kerültek a biológiailag párhuzamos minták, és azok távolsága jól tükrözi a fiziológiás méréseink, valamint RNA-Seq során tapasztalt tendenciákat.

13. Függelék. A 3 omikai megközelítés eredményeinek összehasonlítása génexpressziós (log₂FC) szinten

Gén név	Gén ID	KO vs WT			KOt vs WTt			KOt vs KO			WTt vs WT			Funkció
		DNS chip ¹	RNS -Seq ²	RT- qPCR ³	DNS chip ¹	RNS -Seq ²	RT- qPCR ³	DNS chip ¹	RNS -Seq ²	RT- qPCR ³	DNS chip ¹	RNS -Seq ²	RT- qPCR ³	
Transzmembrán transzport														
ENA2	C1_00390W	-0,12	2,29 *	2,20 **	2,10	0,80	0,29	2,52	-0,85	0,01	0,30	0,64	1,93 **	Na ⁺ transzporter
ENA21	C7_02910W	0,12	1,18	1,25 *	1,15	1,27 **	0,10	3,03	0,80	0,53	2,00	0,71	1,68 **	Na ⁺ transzporter
PHO84	C1_11480W	-1,07	2,53 *	1,53 *	-1,53	1,29	0,39	0,78	-0,81	-0,03	1,24	0,43	1,11	Pi transzporter
TRK1	CR_07960C	0,23	-0,18	0,34	-0,20	0,21	0,44	0,07	0,59 *	0,78 *	0,50	0,20	0,68	K ⁺ transzporter
GAP1	C5_02790C	0,53	-0,14	0,02	-0,23	0,47	0,67	-0,08	1,80 ***	2,19 ***	0,69	1,18 *	1,54 **	Aminosav transzporter
GAP2	C3_05580C	-0,83	3,04 *	1,05	2,37	1,71 *	0,33	3,58	-0,21	0,78	0,38	1,12	1,49 **	Aminosav transzporter
GIT1	C2_06590C	-0,56	3,58 *	1,92 **	0,21	2,15 *	1,25 *	0,18	-1,14	0,21	-0,59	0,29	0,87	GPI transzporter
HGT1	C1_01980W	0,02	1,12 *	1,71 *	1,71	1,84 *	1,17	4,40	1,82 **	3,23 ***	2,71	1,10	3,78 ***	Glükóz transzporter
HGT12	C7_00280W	-0,11	2,66 *	-0,42	2,08	0,97	1,29	2,26	-1,35 *	0,87	0,07	0,34	-0,83	Hexóz transzporter
JEN2	C4_04030W	0,11	1,23	0,49	5,01	3,31 **	1,74	5,98	2,24 **	2,00	1,07	0,16	0,76	Dikarbonsav transzporter
CDR1	C3_05220W	0,84	-0,42	0,30	0,97	1,06 *	0,50	2,94	2,36 ***	1,93 ***	2,82	0,89 *	1,73 **	ABC transzporter
NAG3	C6_04610C	1,82	-0,67	1,03 *	3,44	3,23 **	2,54 ***	2,99	3,86 **	2,35 ***	1,37	-0,03	0,84	MFS transzporter
Sejtfelszín														
CHT3	CR_10110W	-0,35	-0,45	-0,09	-1,44	-3,69 **	-2,06 ***	-4,93	-5,21 ***	-3,84 ***	-3,83	-1,97 *	-1,86 ***	Kitináz
FGR41	C1_10400C	0,27	-0,12	0,27	-0,43	-2,60 **	-1,30 ***	-3,87	-4,12 ***	-3,19 ***	-3,16	-1,63 *	-1,62 ***	Adhezin szerű fehérje
IFF11	C3_00600W	-0,07	0,64	0,16	0,33	-2,04 *	-0,02	0,20	-3,84 **	-2,01 ***	-0,20	-1,16	-1,84 ***	Szekretált fehérje
CDC19	C2_05460W	-0,23	-0,41	-0,19	-0,98	-1,99 **	-0,81 **	-1,23	-2,08 **	-1,32 ***	-0,48	-0,50 *	-0,70 *	Piruvát kináz
GPM1	C2_03270W	-0,17	-0,63	-0,21	-0,64	-2,05 **	-1,05 *	-0,81	-1,97 ***	-1,41 **	-0,34	-0,55 *	-0,57	Foszfoglucérát-mutáz
PGK1	C6_00750C	-0,11	-0,59	-0,09	-0,64	-2,24 **	-0,94 **	-0,48	-1,98 **	-1,19 ***	0,05	-0,33	-0,34	Foszfoglucérát kináz
PLB1	C6_01990W	-0,56	-0,11	-0,19	-1,57	-2,52 *	-1,29	-4,65	-3,88 **	-2,88 ***	-3,65	-1,46 *	-1,78*	Foszfolipáz B

Gén név	Gén ID	KO vs WT			KOt vs WTt			KOt vs KO			WTt vs WT			Funkció
		DNS chip ¹	RNS -Seq ²	RT-qPCR ³	DNS chip ¹	RNS -Seq ²	RT-qPCR ³	DNS chip ¹	RNS -Seq ²	RT-qPCR ³	DNS chip ¹	RNS -Seq ²	RT-qPCR ³	
Oxidáció-redukció														
AOX2	C1_09150W	0,82	-2,01	1,77 **	-0,51	2,66 *	0,77	3,67	6,24 ***	4,05 ***	4,99	1,57	5,05 ***	Alternatív oxidáz
CAT1	C1_06810W	0,02	0,69	-0,63	1,89	-0,52	0,00	3,01	-0,93 **	0,92	1,15	0,27	0,29	Kataláz
CFL2	C4_05780C	2,56	2,57 *	2,50 ***	1,87	2,12 **	2,77 ***	0,17	0,11	1,20 **	0,85	0,57	0,92 *	Oxidoreduktáz
CFL4	C5_01360W	1,96	1,33	2,41 ***	2,17	2,61 **	2,59 ***	1,46	2,48 **	2,77 ***	1,24	1,21 *	2,59 ***	Fe ³⁺ -reduktáz
FET31	C6_00480C	1,20	2,40 *	2,28 ***	-0,25	2,26 **	1,79 ***	0,61	0,51	0,29	0,34	0,65 *	0,78 **	Multiréz-oxidáz
OYE23	C6_01510W	0,04	0,22	0,56	0,96	0,14	0,56	-1,26	-1,70 **	-1,14	-2,18	-1,63 *	-1,14	NADPH-dehidrogenáz
SOD1	C4_02320C	0,10	0,21	0,31	0,69	-0,08	0,41	0,25	0,18	0,73	0,54	0,47 *	0,63	Réz és cink-tartalmú SOD
SOD3	C7_00110W	-0,23	-0,01	-0,04	-0,58	0,42	0,26	1,10	1,34 ***	2,45 ***	1,45	0,90 *	2,15 ***	Mangán-tartalmú SOD
SOD4	C2_00660C	-0,17	1,50 *	1,18 ***	1,60	2,37 **	2,67 ***	1,52	2,49 ***	3,95 ***	-0,24	1,62 *	2,47 ***	Réz-tartalmú SOD
Riboszómális fehérjék														
RPL5	C7_01790C	0,10	-0,33	0,07	-1,01	-1,58 **	-0,40	-1,91	-2,25 ***	-1,65	-0,80	-1,00 *	-1,18	Riboszóma nagy alegység
RPL29	C1_11040W	-0,14	0,11	0,21	-0,92	-1,19 **	-0,30	-1,35	-2,18 ***	-1,44 ***	-0,57	-0,87 *	-0,93 ***	Riboszóma nagy alegység
MRPL3	C1_07910C	0,33	0,02	0,76 **	-0,60	0,40	0,36	-0,41	1,03 *	0,58 *	0,52	0,65	0,98 ***	Riboszóma nagy alegység
RPS3	CR_04810W	-0,40	-0,17	0,16	-1,18	-2,04 **	-0,62 **	-1,72	-2,75 **	-1,76 ***	-0,94	-0,89 *	-0,98 ***	Riboszóma kis alegység
RPS8A	C2_05610C	-0,14	-0,15	0,09	-0,92	-1,38 **	-0,50*	-1,41	-2,08 **	-1,46 ***	-0,62	-0,85 *	-0,88 ***	Riboszóma kis alegység
	C5_04530W	0,35	0,14	0,45 *	-0,39	0,49	0,24	-0,55	1,08 *	0,47 **	0,52	0,74	0,68 ***	Riboszóma kis alegység
RPP1B	C7_03920C	-0,13	-0,02	0,14	-1,09	-1,56 **	-0,57	-1,80	-2,39 ***	-1,79 ***	-0,84	-0,86 *	-1,07 ***	Savas riboszómális fehérje
CAM1	C3_06010W	-0,12	-0,53	-0,28	-1,05	-1,34 **	-0,36	-1,84	-1,46 ***	-1,18 ***	-0,92	-0,65 *	-1,10 ***	Transzláció elongációs faktor
EFT2	C2_03100W	-0,12	-0,25	0,11	-0,60	-1,08 **	-0,38	-0,80	-1,26 **	-1,29 ***	-0,32	-0,43	-0,79 *	Esszenciális elongációs faktor
IFM1	C7_02940C	-0,16	0,25	0,51	-0,48	0,56	0,11	-0,12	1,16 **	0,57	0,20	0,85	0,97 **	Ttranszlációs iniciációs faktor

Gén név	Gén ID	KO vs WT			KOt vs WTt			KOt vs KO			WTt vs WT			Funkció
		DNS chip ¹	RNS -Seq ²	RT-qPCR ³	DNS chip ¹	RNS -Seq ²	RT-qPCR ³	DNS chip ¹	RNS -Seq ²	RT-qPCR ³	DNS chip ¹	RNS -Seq ²	RT-qPCR ³	
RNS metabolizmus														
	C3_02750W	0,67	-0,02	1,21 *	1,40	0,87	1,08 *	2,31	3,33 **	3,60 ***	1,59	2,44 *	3,73 ***	Ribonukleáz
DIM1	C1_13730C	0,97	0,39	2,02 *	-0,36	1,31 **	2,19 **	0,38	2,22 ***	2,47 **	1,72	1,30	2,29 **	rRNS dimetiláz
SPB4	C5_01600C	0,59	0,37	1,24 **	-0,27	1,18 **	1,37 **	0,40	2,51 ***	2,37 ***	1,26	1,70 *	2,24 ***	RNS helikáz
BUD22	CR_00680W	0,54	0,14	0,87 *	-0,65	0,93 **	1,34 ***	-0,06	2,18 ***	2,49 ***	1,14	1,38 *	2,01 ***	rRNS érés
ENP1	C7_03700C	0,96	-0,34	0,90 *	-0,31	1,05 *	0,41	0,42	2,59 ***	2,29 ***	1,69	1,19	2,78 ***	pre-rRNS feldolgozás
NSA2	C3_06380W	na	0,90	1,97 ***	NA	1,17 *	1,54 **	NA	2,31 ***	2,00 ***	NA	2,04 *	2,43 ***	pre-rRNS komponens
Pearson féle korrelációs koefficiens:														
DNS chip vs RNS-Seq		-0,076			0,650			0,700			0,795			
DNS chip vs RT-qPCR			0,502			0,620			0,759			0,836		
RNS-Seq vs RT-qPCR				0,500			0,891			0,945			0,915	

¹Egyetlen kísérlet eredményei

²Három biológiai párhuzamos kísérlet átlag és szignifikancia értékei

³Öt biológiai párhuzamos kísérlet átlag és szignifikancia értékei

A több mint kétszeres változásokat félkövér betűtípussal szedtük.

Szín kóddal láttuk el a több mint kétszeres/szignifikáns változások irányát (kék- alulszabályozott, piros- felül szabályozott).

A narancssárgával jelzett gének a mitokondriumban lokalizálódnak.

na: nincs adat, mivel az adott gén nem volt jelen a DNS-chipen

A szignifikancia értékeket Anova teszttel határoztuk meg, amit Tukey post hoc teszttel kombináltunk. (Fontos, hogy a DNS-chip adatokra nem tudtunk szignifikanciát számolni.)

A diszkusszióban látható 29. ábra a táblázat adatai alapján készült.

14. Függelék. A proteomikai vizsgálatok során azonosított fehérjék funkcionális jellemzése

<i>C. albicans</i> fehérje ¹	<i>C. albicans</i> fehérje neve ²	<i>S. cerevisiae</i> ortológ ³	Molekuláris funkció ^{1,3} / Biológiai folyamat ¹
Ade12	Adeniloszukcinát-szintetáz	Ade12	adeniloszukcinát szintetáz enzimaktivitás, 'de novo' AMP bioszintézisben betöltött szerep /felülszabályozott expresszió biofilmben ; csökkent expresszió hifában az élesztő sejtekhez képest
Bmh1	14-3-3 fehérje homológ	Bmh2	foszfoszerinhez való kötődés, DNS replikációs origóhoz való kötődés / hifa növekedésben betöltött szerep, csökkent Spider biofilm képzés
Efb1	Elongációs faktor 1-béta	Efb1	transzlációban elongációs faktor aktivitás, guanil-nukleotid cserélő faktor aktivitás / csökkent Spider biofilm képzés
Idh1	Izocitrát-dehidrogenáz [NAD] 1 alegység (mitokondriális)	Idh1	izocitrát dehidrogenáz (NAD ⁺) aktivitás / hifában oldható fehérjeként található; a fehérje szintje csökken a stacionárius fázisban levő kultúrákban
Ure2	URE2 protein	Ure2	glutation peroxidáz enzimaktivitás, glutation transzferáz enzimaktivitás, foszfofehérjék kötése, transzkripció korepresszor aktivitás
Cef3	Elongációs faktor 3	Yef3	transzlációban elongációs faktor aktivitás, ATPáz enzimaktivitás / stacionárius fázisban magasabb a fehérje mennyisége
Cpr3	Peptidil-prolil cisz-transz izomeráz	Cpr3	Peptidil-prolil cisz-transz izomeráz enzimaktivitás/ fehérje folding, apoptotikus folyamatokban való részvétel, biofilm mátrix komponens
Hsp70/Ssa1	SSA1 hősokk fehérje	Ssa4	chaperon (dajkafehérje), fel nem tekeredett fehérjékhez való kötődés / farnezol által alul szabályozott expresszió biofilmben , Spider biofilmben indukált expresszió
Rpl20B	60S riboszómális fehérje L20	Rpl20B	a riboszóma szerkezeti eleme / transzlációban betöltött szerep, Spider biofilmben represszált/elnyomott
Tkl1	Transzketoláz 1	Tkl1	transzketoláz enzimaktivitás/ pentóz-foszfát shunt, / hifában oldható fehérjeként található, biofilm mátrix komponens

<i>C. albicans</i> fehérje ¹	<i>C. albicans</i> fehérje neve ²	<i>S. cerevisiae</i> ortológ ³	Molekuláris funkció ^{1,3} / Biológiai folyamat ¹
Tsa1	TSA1 peroxiredoxin	Tsa1	tioredoxin peroxidáz enzimaktivitás, fel nem tekeredett fehérjékhez való kötődés / oxidatív stresszben sejtes válaszban való részvétel, filamentózus növekedésben betöltött szerep
Yst1	S0 40S riboszómális fehérje	Rps0A	riboszóma szerkezeti elem / transzlációban betöltött szerep, Spider biofilmben represszált/elnyomott
Aip2	D-laktát dehidrogenáz	Dld2	dehidrogenáz enzimaktivitás, aktinhoz való kötődés/ csökkent biofilm képzés folyékony tenyészetben
Cyp5	Peptidil-prolil cisz-transz izomeráz	Cpr5	Peptidil-prolil cisz-transz izomeráz enzimaktivitás/ fehérje folding, biofilm mátrix komponens
Dug1-like	DUG1 Cys-Gly metallodipeptidáz	Dug1	metallodipeptidáz enzimaktivitás, omega-peptidáz enzimaktivitás/ glutation katabolizmusban való részvétel, Spider biofilmben represszált/elnyomott
Eft2	Elongációs faktor 2	Eft1	transzlációban elongációs faktor aktivitás, GTPáz enzimaktivitás/ stacionárius fázisban magasabb a fehérje mennyisége
Guk1	Guanilát kináz	Guk1	guanilát kináz enzimaktivitás/ biofilm mátrix komponens
Ham1	Inozin-trifoszfát pirofoszfátáz	Ham1	deoxiribonukleozid-trifoszfát-pirofoszfát hidroláz enzimaktivitás
Rad23	Rad23p	Rad23	károsodott DNS-hez való kötődés, hozzájárul az amidáz enzimaktivitáshoz, proteoszómához való kötődés, fehérjéhez való kötődés, fehérje hidak képzése, ubikvitinhez való kötődés
Rpl9B	L9 citoszólikus riboszómális fehérje	Rpl9B	riboszóma szerkezeti elem / transzlációban (citoszol) betöltött szerep / stacionárius fázisban a fehérje szintje csökken, Spider biofilmben represszált/elnyomott
Rpp0	P0 60S savas riboszómális fehérje	Rpp0	riboszóma szerkezeti elem, nagy riboszómális alegység rRNS-éhez kötődik / transzlációban (citoszol) betöltött szerep, Spider biofilmben represszált/elnyomott

<i>C. albicans</i> fehérje ¹	<i>C. albicans</i> fehérje neve ²	<i>S. cerevisiae</i> ortológ ³	Molekuláris funkció ^{1,3} / Biológiai folyamat ¹
Rps7A	S7-A 40S riboszómális fehérje	Rps7A	riboszóma szerkezetelem / transzlációban betöltött szerep, Spider biofilmben represszált/elnyomott
Tif1	eIF4A ATP-függő RNS helikáz	Tif2	transzlációban iniciációs faktor aktivitás, ATP-függő RNS helikáz enzimaktivitás / Spider biofilmben represszált/elnyomott
Lia1-like	Deoxihipuzin hidroxiláz	Lia1	deoxihipuzin monooxygenáz enzimaktivitás / filamentózus növekedésben betöltött szerep, Spider biofilmben represszált/elnyomott
Uba1	E1 Ubikvitin-aktiváló enzim	Uba1	ubikvitin-aktiváló enzimaktivitás/ a fehérje szintje csökken a stacionárius fázisban levő élesztő kultúrákban

A fehérjék és a gének neveit ¹<http://www.uniprot.org/>, ²<http://www.candidagenome.org/> és a ³<http://www.yeastgenome.org/> alapján adtuk meg.