

37. OTDK Biológia Szekció

**Az antibiotikum-rezisztencia növelheti a *K. pneumoniae* inváziós képességét
és citotoxicitását**

Benedek Barbara
Biológia Msc II. évfolyam

Szegedi Tudományegyetem
HUN-REN Szegedi Biológiai Kutatóközpont

Témavezető: Dr. Pál Csaba

Szeged
2025

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS	5
1.1. Antibiotikumok és antibiotikum-rezisztencia	5
1.2. Virulencia és virulencia faktorok	10
1.3. Inváziós képesség	13
1.4. Citotoxicitás	16
2. CÉLKITŰZÉSEK	19
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	20
3.1. Baktériumok	20
3.2. Humán sejtek	22
3.3. Antibiotikumok, tápok	22
3.4. Bakteriális inváziós assay	22
3.5. Caco-2 sejtek túlélési vizsgálata	23
4. EREDMÉNYEK	24
4.1. Az evolúciós kísérletek eredménye	24
4.2. A virulencia vizsgálatok eredménye	26
4.3. Bakteriális inváziós képesség vizsgálat eredményei	28
4.4. Caco-2 sejtek túlélési vizsgálatának eredményei	31
5. ÖSSZEFOGLALÁS	34
IRODALOMJEGYZÉK	35
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	40

Rövidítések

ALE	Adaptív laboratóriumi evolúció (Adaptive Laboratory Evolution)
AMR	Antimikrobiális rezisztencia (Antimicrobial Resistance)
CFU	Kolóniaképző egység (Colony Forming Unit)
CPS	Kapszula poliszacharid (Capsule polysaccharide)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
FBS	Magzati szarvasmarha szérum (Fetal Bovine Serum)
FoR	Rezisztencia frekvencia vizsgálat (Frequency of Resistance)
LPS	Lipopoliszacharid
MDR	Multidrog-rezisztencia (Multidrug-Resistance)
MHB	Mueller Hinton Broth tápoldat
MIC	Minimális gátló koncentráció (Minimum Inhibitory Concentration)
NEAA	Nem esszenciális aminosavak (Non-Essential Amino Acid)
OD	Optikai denzitás (Optical density)
PBP	Penicillin-kötő fehérjék (Penicillin-binding proteins)
PBS	Foszfát puffer
T3SS	III-as típusú szekréciós rendszer (Type III secretion system)
T6SS	VI-os típusú szekréciós rendszer (Type VI secretion system)

Absztrakt

A baktériumok rövid idő alatt képesek rezisztenciát kialakítani az antibiotikumokkal szemben és a rezisztencia mechanizmusok befolyásolhatják azok fertőzőképességét. Ugyanakkor az, hogy hogyan változik a virulencia, még kevésbé ismert. Kutatásunkban azt a hipotézist vizsgáltuk, hogy az antibiotikum-rezisztencia növelheti a baktériumok fertőzőképességét. Ennek érdekében vizsgáltuk antibiotikum-rezisztens *Klebsiella pneumoniae* törzsek humán sejtekbe történő bejutását és ölőképességét. Eredményeink azt mutatják, hogy a membrán targetáló antibiotikumokkal szembeni rezisztencia kialakulása során a baktériumok inváziós képessége és citotoxicitása is növekedett, ami jelentős egészségügyi kockázatot jelent. Ezeknek a virulencia faktoroknak a változását fontos figyelembe venni az új antibiotikumok fejlesztése során, mivel a növekedett virulencia nagymértékben függ attól, hogy a baktérium milyen típusú antibiotikumhoz adaptálódott.

Kulcsszavak: antibiotikum-rezisztencia, virulencia, *Klebsiella pneumoniae*, Caco-2, inváziós képesség, citotoxicitás

Az antibiotikum-rezisztencia növelheti a *K. pneumoniae* inváziós képességét és citotoxicitását

1. BEVEZETÉS

A baktériumok antibiotikumokkal szembeni rezisztenciája egyre nagyobb egészségügyi problémát jelent. Előrejelzések szerint 2050-re évi 10 millió halálesetért lesznek felelősek az antibiotikum rezisztens baktériumtörzsek (1). A multidrog rezisztens baktériumok terjedése kockáztatja az új antibiotikumok kifejlesztését és sikerességét, éppen ezért több gyógyszeripari vállalat is leállította a gyógyszer kutatást, ugyanis a rezisztens baktériumok gyors evolúciója miatt bizonytalan a piaci siker (2).

1.1. Antibiotikumok és antibiotikum-rezisztencia

Az antimikrobiális szerek olyan gyógyszerek, amelyeket fertőző betegségek megelőzésére és kezelésére használnak. A kórokozókat elpusztítják, illetve gátolják növekedésüket vagy szaporodásukat (3).

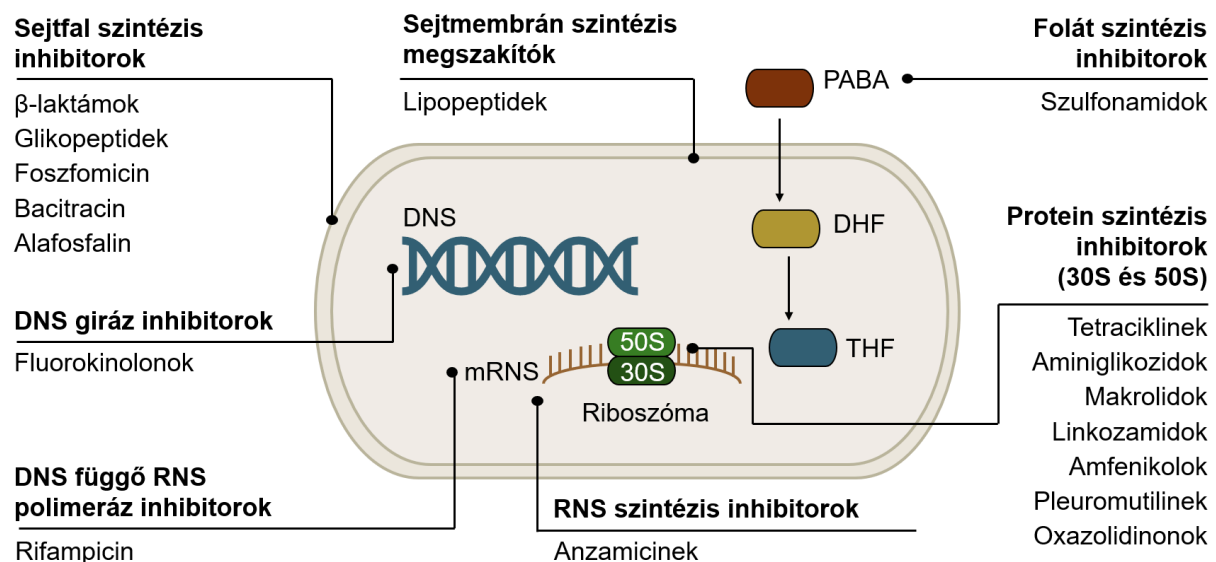
Az antibiotikumok kémiai szerkezetük és hatásmechanizmusuk alapján csoportosíthatók az alábbi osztályokba (1. ábra) (4):

- Tetraciklinek: Ezek az antibiotikumok a baktériumok 30S riboszómális alegységet célozzák meg, akadályozva az aminoacil-tRNS kötődését az mRNS-riboszóma komplexen található akceptor helyhez. Ez a folyamat megakadályozza az új fehérjék szintézisét, így a sejt már nem tudja fenntartani megfelelő működését és lehetetlenné teszi a növekedést vagy a további szaporodást, ami végső soron a baktériumok elpusztulásához vezet (4).
- Cefalosporinok: A baktériumok sejtfalukat peptidoglikán egységek keresztkötésével építik fel penicillinkötő fehérjék (PBP) segítségével. A cefalosporinok, az eredetileg a *Cephalosporium* fajú gombából származó baktériumölő antibiotikumok osztálya, β -laktámgyűrűiken keresztül fejtik ki hatásukat. Ezek a gyűrűk a PBP-khez kötődnek, blokkolva azok normális működését. Ennek eredményeként a baktériumok nem képesek megfelelő sejtfalat építeni, ami a sejtek pusztulásához vezet (3).

- **Topoizomeráz inhibitorok:** A topoizomeráz-inhibitorok vagy fluorokinolonok a topoizomeráz enzimek gátlásán keresztül fejtik ki ölü hatásukat. A topoizomeráz enzim gátlásával a DNS replikáció során a DNS-törések felhalmozódnak, ami a sejt halálhoz vezet. A különböző osztályok vagy a topoizomeráz I vagy a II-t célozzák, a topoizomeráz I gátlók megakadályozzák az egyszálú DNS-javítást, a topoizomeráz II gátlók pedig a kétszálú javítást (5).
- **Aminoglikozidok:** Az aminoglikozidok gátolják a fehérjeszintézist azáltal, hogy nagy affinitással kötődnek a 30S riboszómális alegység 16S rRNS-ének A kötőhelyéhez, megváltoztatva annak konformációját. A pontos kötődési mechanizmus és hatás az aminoglikozid kémiai szerkezetétől függően változik (6).
- **Karbapenemek:** A β -laktám antibiotikumok egyik osztálya, a külső membránfehérjék (porinok) révén jutnak be a Gram-negatív baktériumokba, és a periplazmatikus térben acilátot képeznek a PBP-kből. A karbapenemek gátolják a PBP-k peptidáz doménjét, blokkolva a peptidek keresztkötését. Hatékonyságuk kulcsa, hogy képesek több PBP-t is megkötni. A PBP-k gátlásával a sejtfal autolízise folytatódik, ami a peptidoglikán szerkezet meggyengüléséhez és végül az ozmotikus nyomás miatt a sejtek líziséhez vezet (7).
- **Membrán targetáló antibiotikumok:** A membrán-targetáló antibiotikumok a baktériumsejtek membránjának megbontásával hatnak, ami a sejtek pusztulásához vezet. Ezek az antibiotikumok jellemzően kölcsönhatásba lépnek a membránlipidekkel, destabilizációt okozva vagy pórusokat képezve. Egyes antibiotikumok, mint a polimixinek, a Gram-negatív baktériumok lipopoliszacharidjaihoz (LPS) kötődnek, destabilizálva a membránt és növelve az áteresztőképességet. Mások, mint a daptomicin, behatolnak a membránba, pórusokat hozva létre, amelyek megzavarják az iongradienst és a membránpotenciált. Ez a sejttartalom kiszivárgásához és az alapvető funkciók elvesztéséhez, végső soron a baktériumok elpusztításához vezet. A konkrét mechanizmus az antibiotikum szerkezetétől és a bakteriális membrán összetételétől függ (8).

Emellett vannak még penicillinek, amelyek a béta-laktám gyűrű révén kapcsolódnak a transzpeptidázokhoz, ezáltal megakadályozzák az új sejtfal kialakulását (4). A szulfonamidok gátolják a dihidropteroát-szintetáz enzimet, így megakadályozzák a dihidrofolát és a tetrahidrofolát képződését, végül gátolják a bakteriális DNS-replikációt és sejtosztódást. (3).

A makrolidok a baktériumok 50S riboszomális alegységéhez kötődve gátolják a fehérjeszintézist (4).



1. ábra. Antibiotikumok hatásmechanizmusai (9).

Antimikrobiális rezisztencia (AMR) akkor lép fel, amikor az antibiotikumok már nem tudják kifejezni gátló hatásukat a baktériumokkal szemben. A rezisztencia következtében az antibiotikumok hatástalanokká válnak, ami ellehetetleníti vagy megnehezíti a fertőzések kezelését, és növeli a súlyos betegségek és halálozás kockázatát (3).

Az AMR egy evolúciós folyamat, melynek során a baktériumok genetikai állománya megváltozik az antibiotikumok által kifejtett szelekciós nyomás hatására. Az emberi tevékenység, különösen az antimikrobiális szerek helytelen és túlzott alkalmazása emberek, állatok és növények fertőzéseinek kezelésére, megelőzésére vagy ellenőrzésére, felgyorsítja ezt a folyamatot (3).

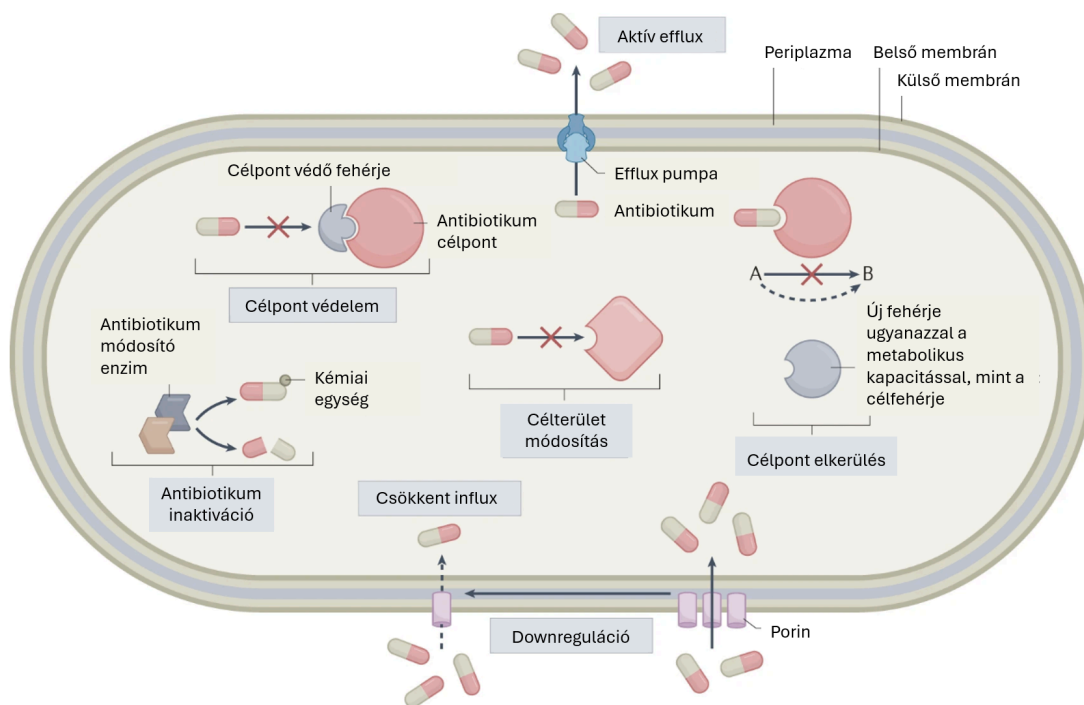
Számos molekuláris tényező járul hozzá a rezisztencia kialakulásához (2. ábra) (10). Két fő mechanizmusról beszélünk: az antibiotikumok eliminálása és a célpont módosítása.

Az antibiotikumok eltávolításához egyes baktériumok efflux pumpákat alkalmazhatnak, amelyek aktívan kiűzik az antibiotikumokat a sejtől, ezáltal csökkentve a gyógyszer

hatékonyságát (11). Vannak baktériumok, amelyek az antibiotikumok enzimatis lebonásra is képesek. Ezek az enzimek képesek hidrolizálni vagy módosítani az antibiotikumokat, semlegesítve azok hatását (12). Emellett a baktériumsejtek membránjának megváltozása korlátozhatja az antibiotikumok bejutását. Ide tartoznak a porincsatornákban bekövetkező változások, amelyek csökkentik az áteresztőképességet bizonyos gyógyszerek számára, és ezáltal hozzájárulnak a rezisztenciához (13).

Mások az antibiotikum baktériumon belüli célpontját változtatják meg, ami az antibiotikumot hatástalanná teszi. Egyes baktériumok módosítják a PBPs szerkezetét, így csökkentve vagy megszüntetve a sejtfalszintézis gátló antibiotikumok támadáspontját. Vannak baktériumok, amelyek mutációkat vezetnek be a riboszóma rRNS-ében vagy a riboszóma fehérjében, ami megváltoztatja a kötőhelyet, így a fehérjeszintézis gátló antibiotikumok már nem tudnak megfelelően kötődni. Emellett mutációkat fejleszthetnek ki a DNS-giráz génjeiben, ami csökkenti fluorokinolon antibiotikumok hatását (14).

Emellett megemlítenő, hogy a biofilmképződés során a biofilmekben lévő baktériumok a védőmátrixuk és megváltozott anyagcsereállapotuk miatt ellenállóbbak az antibiotikumokkal szemben, ami megnehezíti a kezelést (15). Megfigyelhető az adaptív rezisztencia egyes baktériumoknál. Ezek a kórokozók az antibiotikumokkal szemben toleráns állapotba kerülhetnek, ami lehetővé teszi számukra, hogy a kezelést tartós genetikai változások nélkül is túléljék. Ez a perzisztens sejteknél figyelhető meg, amelyek az antibiotikum-expozíció során nyugalmi állapotban maradnak (10). Végül, a célpont-védelemről akkor beszélhetünk, amikor egy védőfehérje társul az antibiotikum célpontjához, megvédve azt az antibiotikum gátló hatásaitól. A rezisztencia e sokrétű megközelítése kiemeli az antibiotikum-kezeléssel szembeni bakteriális túlélési stratégiák összetettségét (16).



2. ábra. Az antibiotikum-rezisztencia molekuláris mechanizmusai (10).

A baktériumok évmilliárdok óta fejlődnek az antibakteriális vegyületekkel szemben. A rezisztencia két fő úton alakulhat ki evolúciós szempontból. A vertikális evolúció, amikor a rezisztenciát okozó mutációk *de novo* alakulnak ki a baktérium saját genetikai anyagában. Ezek a mutációk átadódnak az utódoknak. A másik általános folyamat a horizontális evolúció, vagy horizontális géntranszfer. A folyamat során a baktériumok más baktériumoktól szereznek rezisztenciagéneket olyan folyamatok révén, mint a konjugáció, a transzdukción vagy a transzformáció (17). A rezisztencia evolúcióját számos tényező befolyásolja. Ilyen tényezők a rezisztenciagének és mutációk megjelenésének sebessége, a rezisztencia mechanizmusok hatékonysága, a rezisztens törzsek fittsége és a környezetből származó szelekciós nyomás. További tényezők, mint például a génközösinterakciók, kompenzáló mutációk, keresztrezisztencia és társ-szelekció szintén szerepet játszanak. Ezek a folyamatok együttesen mozgatják az antibiotikum-rezisztencia kialakulását és terjedését a baktérium populációkban (18).

Az antibiotikum-rezisztencia predikciója több tényezőre épül. Először is figyelembe kell venni a baktériumok evolúciós mechanizmusait, amelyek révén *de novo* mutációk és géntranszfer útján új rezisztencia mechanizmusok jelenhetnek meg. Az antibiotikumok

alkalmazása szelekciós nyomást gyakorol a baktériumokra és így kedvező körülményeket biztosít a rezisztens baktériumtörzsek fennmaradásának és terjedésének. A rezisztencia előrejelzése magában foglalja a genetikai változások nyomon követését, a baktériumok populációs dinamikájának vizsgálatát, valamint az ökológiai tényezők szerepét. Ezek révén lehet azonosítani a rezisztencia kialakulásának kockázatait és lehetséges irányait (19).

Az antibiotikum-rezisztencia egyre nagyobb veszélyt jelent a bakteriális fertőzések kezelésére és különféle orvosi beavatkozások hatékonyságára. Ahogy a rezisztens baktériumok terjednek, egyre nagyobb aggodalomra ad okot, hogy a jelenleg használt antibiotikumok hatástalanok lesznek (1).

A gyógyszerek fejlesztésének korai szakaszában a baktériumok ellenálló képességét laboratóriumi körülmények között (*in vitro*) vizsgálják, de gyakran nem figyelnek kellőképpen azokra a tényezőkre, amelyek a rezisztencia kialakulását okozzák. Ez oda vezethet, hogy ígéretes gyógyszereket vetnek el, vagy olyan antibiotikumokat fejlesztenek, amelyek később gyorsan hatástalanná válnak (18). Ezért új megközelítés szükséges a rezisztencia értékelésére a gyógyszerfejlesztés során. Ahelyett, hogy kizárólag az *in vitro* mutációs rátákra támaszkodnánk, az olyan tényezők szélesebb körű elemzését kellene szem előtt tartani, mint a baktériumok fitneszt, azon belül is a rezisztens baktériumok virulenciáját meghatározó faktorok. Ezeket a virulencia faktorokat a fejlesztési folyamat korai szakaszában kell vizsgálni a gyógyszer sikerének jobb előrejelzése érdekében.

A baktériumok fertőzőképessége megváltozhat az antibiotikumokhoz való adaptálódás során. Viszont, hogy a rezisztencia hogyan befolyásolja a baktériumok virulenciáját, még kevésbé kutatott téma.

1.2. Virulencia és virulencia faktorok

A virulencia a baktériumok azon képessége, amellyel kárt okoznak a gazdaszervezetben. Ez egy összetett gazda-patógén interakciókon alapszik (20).

Annak ellenére, hogy jelentős előrelépések történtek a kezelés és megelőzés terén, a bakteriális kórokozók továbbra is komoly közegészségügyi fenyegetést jelentenek világszerte. Alapvető fontosságú megérteni, hogyan lépnek kölcsönhatásba a kórokozó baktériumok a gazdaszervezettel a betegség kialakulása során. A legelső lépés a virulencia

faktorok azonosítása, amelyek vakcina- és gyógyszerfejlesztési célpontként szolgálhatnak (21).

A patogén baktériumok azon képességét, hogy megbetegítsenek egy fogékony gazdaszervezetet, több virulenciafaktor határozza meg, amelyek a fertőzés különböző szakaszaiban külön-külön vagy együttesen fejtik ki hatásukat. Ezek a faktorok gyakran a gazdaszövetekkel való közvetlen kölcsönhatásban vesznek részt, vagy segítenek a baktériumnak elrejtőzni a gazdaszervezet védekező mechanizmusai elől (21).

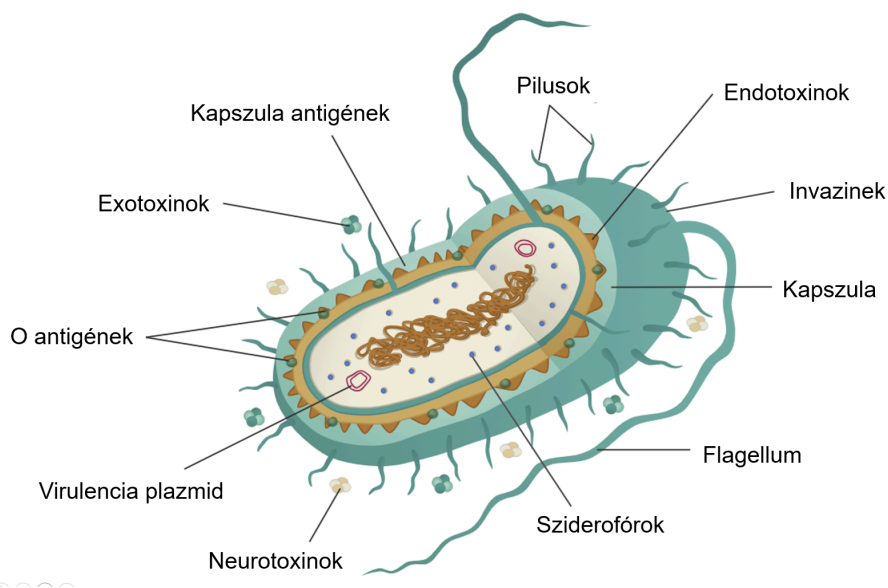
A bakteriális virulencia faktorok több csoportba sorolhatók funkciójuk és mechanizmusuk alapján (3. ábra) (15).

- Adhéziós faktorok: A baktériumoknak ahhoz, hogy fertőzést okozhassanak, először meg kell tapadniuk a nyálkahártya felszínén. Ilyen nyálkahártyával borított felszínnek a tápcsatorna és a légutak. A baktériumoknak a hámhoz kell kapcsolódniuk és el kell szaporodniuk, mielőtt a nyálka vagy a sejtek cseréje miatt eltávolítódnának. Ehhez különböző kötődési mechanizmusokat, például pilusokat (fimbriákat) alkalmaznak (22).
- Inváziós faktorok: A baktériumok különféle mechanizmusokat alkalmaznak az eukarióta sejtek inváziójára, ami elősegíti a nyálkahártyákon való behatolásukat. Az inváziót elősegítő speciális bakteriális felszíni faktorok többsége még ismeretlen, és gyakran több géntermék is részt vesz a folyamatban (22).
- Kapszulák: A baktériumok különféle strukturális és metabolikus virulenciafaktorokat fejlesztettek ki, hogy növeljék a gazdaszervezetben való túlélésüket. A kapszulaképződés egy jól ismert védelmi mechanizmus, amely a kapszulázott törzseket virulensebbé és a fagocitózissal szemben ellenállóbbá teszi a nem kapszulázott törzsekkel szemben. Egyes, fertőzést okozó baktériumok szérum rezisztenciát mutatnak, ami a kapszula antigénjeinek és a lipopoliszacharid szerkezetének mennyiségével és összetételével kapcsolatos. Ezek sejtfal- és külső membrán komponensek, amelyek gyulladást okoznak (22).
- Endotoxinok: Az endotoxin a Gram-negatív baktériumok külső membránjában található toxikus lipopoliszacharid, amely jelentős biológiai hatást gyakorolhat a gazdaszervezetre, és akár halált is okozhat. Az "endotoxin" kifejezést Pfeiffer vezette

be 1893-ban, hogy megkülönböztesse a baktériumok lízise során felszabaduló anyagokat a baktériumok által kibocsátott exotoxinoktól (21).

- **Exotoxinok:** Az exotoxinok baktériumok által kibocsátott fehérje toxinok, amelyek a leghatásosabb mérgező anyagok közé tartoznak, ellentétben az endotoxinokkal. Míg a legtöbb nagy molekulatömegű exotoxin hőérzékeny, addig számos kis molekulatömegű peptid hőstabil. Exotoxinokat egyes Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumok termelnek, és gyakran ismeretlen funkcióval rendelkeznek, sok esetben hiányuk nem befolyásolja a baktériumok növekedését. Az endotoxinokkal szemben, amelyek széleskörű szisztémás hatása van, az exotoxinok általában lokalizált hatást fejtenek ki, amelyek bizonyos sejttípusokat vagy receptorokat céloznak meg (21).
- **Sziderofórok:** Egyes baktériumok sziderofórokat termelnek, amelyek képesek kivonni a vasat a gazdafehérjékből. A vashiány aktiválja a sziderofór szintéziséért felelős gének és a kötött vasat felismerő felszíni receptorok termelését. A sziderofórok erős vonzalmat mutatnak a vas iránt, így a baktériumok még a transferrinből és laktoferrinből is képesek azt kinyerni. A sziderofór-termelés a legtöbb patogén baktérium esetében alapvető virulenciafaktornak számít (22).

Számos további virulenciafaktor létezik, viszont kísérleteim során az invázióra és citotoxicitásra összpontosítottam.



3. ábra. Mikrobiális virulencia faktorok (22).

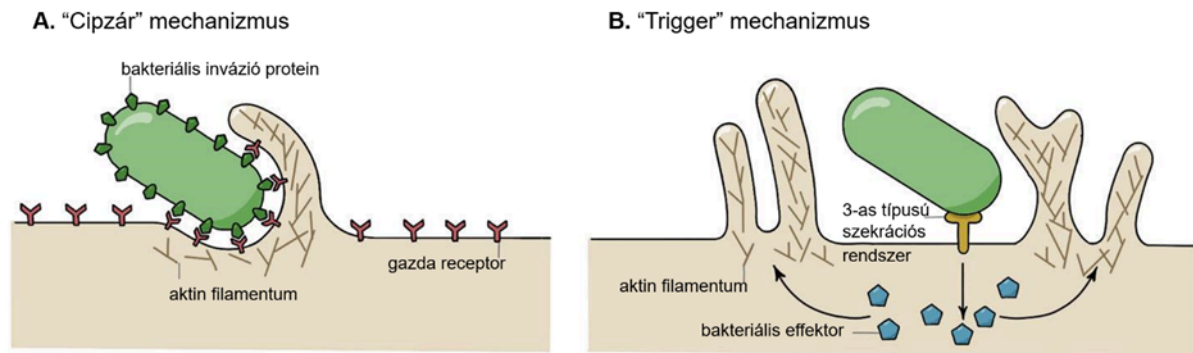
1.3. Inváziós képesség

A sikeres fertőzés érdekében a mikrobiális kórokozók különféle stratégiákat alkalmaznak a gazdaszervezetbe való bejutáshoz, az immunválasz elkerüléséhez és a szaporodáshoz. Az invazív baktériumok képesek olyan sejtekbe behatolni, amelyek normál esetben nem fagocitálnak. A baktériumok az ilyen nem fagocitáló sejtekben képesek intracellulárisan fenmaradni. A baktériumok aktívan részt vesznek saját fagocitózisuk kiváltásában, míg más esetekben a citoszkeletont kihasználva mozognak. Egyes baktériumok a vakuólumban maradnak és ott szaporodnak, míg mások a citoszolban terjednek tovább. A fertőzés sikeressége a baktérium és a gazdasejt közötti komplex kommunikáción múlik (23).

Egyes mikrobiális kórokozók, mint a *Yersinia pseudotuberculosis*, olyan felszíni fehérjéket termelnek (invazin, E-kaderin, InlA, InlB), amelyek eukarióta sejtreceptorokhoz kötődnek, ezáltal elősegítve a bejutásukat nem fagocita sejtekbe, például bélhámsejtekbe. A fehérje-receptor kölcsönhatás egy jelátviteli kaszkádot indít el, amely foszforilációkat és a citoszkeleton aktiválását eredményezi, elősegítve a baktérium internalizálását. Bizonyos baktériumok, mint a *Listeria monocytogenes* transzmembrán sejtadhéziós fehérjéket használnak receptorként a humán sejtekbe való bejutáshoz, ahol a baktérium ligandja először a receptorhoz kötődik, ami a receptorok csoportosulásához vezet. Ezt követően a fagocita membránjából egy „csésze” alakul ki, amit a ligandum-receptor komplexek kialakulása után keletkező átmeneti jelek váltanak ki, amelyek a behatoló mikroba körül terjednek. Ezek a jelek aktin-polimerizációt és membránnyúlványok kialakulását idézik elő, végül a fagocita csésze bezáródik és visszahúzódik, miközben az aktin depolimerizálódik. Ez az ún. „cipzár” mechanizmus (4.ábra) (23).

Más kórokozók, mint a *Salmonella* és a *Shigella*, közvetítő fehérjéket vagy effektorokat használnak, hogy közvetlenül irányítsák a citoszkeleton dinamikáját, makropinocita zsebeket kialakítva a baktérium körül. Ezek a baktériumok III-as típusú szekréciós rendszert (T3SS) használnak a gazdasejtekbe való bejutáshoz, amely lehetővé teszi számukra, hogy effektor fehérjéikkel manipulálják a gazdaszervezet citoszkeletonját. Ezek az effektorok pórusokat alakítanak ki a gazdasejt membránján, miközben chaperonokhoz kötődnek, így a szekréció csak a gazdasejttel való érintkezéskor indul el. A baktériumok képesek felismerni a gazdasejt receptorait, aktiválni a T3SS-t, és manipulálni az aktin citoszkeletonját a bejutás elősegítése érdekében. A folyamat során destabilizálják a mikrotubulusokat, fokozzák az aktin nukleációt

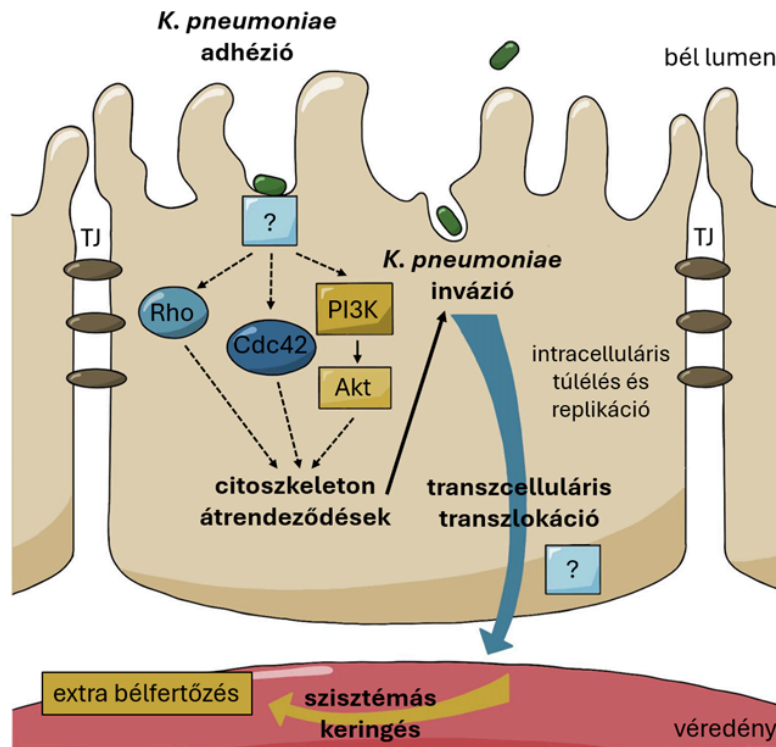
és stabilizációt, végül aktin depolimerizáció következik be. Ezt nevezzük “trigger” mechanizmusnak (4. ábra) (23).



4.ábra. Az invazív baktériumok epitélsejtbe való behatolásának mechanizmusai a citoszkeleton megváltoztatása révén (24).

A *Klebsiella pneumoniae* az *Enterobacteriaceae* családba tartozó Gram negatív baktérium. Mivel a *K. pneumoniae* egy opportunista kórokozó, jelentős egészségügyi jelentőséggel bír. Széles körben megtalálható a szájban, a bőrön és a belekben, valamint a kórházi környezetben és a kórházakban. Számos betegséget képes okozni, mint a húgyuti fertőzések, hólyaghurut, tüdőgyulladás, sebfertőzések, endokarditis, szeptikémia, májtályog stb (25).

A *K. pneumoniae* képes behatolni és áthatolni a bélhámra, transzlokációja a polarizált bélhámra keresztül történik. A gastrointesztinális *K. pneumoniae* transzcelluláris mechanizmus révén, aktív bakteriális invázióval hatol át a bélhámra. Az adhézió és az interakció a bélhámsejtekkel, azonosíthatatlan faktorok révén, sejtes jelátviteli kaszkádokat indít el. Ennek következtében aktiválódik a gazdaszervezet Rho családjába tartozó Rho és Cdc42 GTPázok, valamint a PI3K/Akt útvonal, ami a sejtek citoszkeletonjának átrendeződését idézi elő, ezáltal lehetővé téve a baktériumok bekebelezését és invázióját. Az intracelluláris *K. pneumoniae* sejtek képesek túlélni és szaporodni, majd egy ismeretlen mechanizmus révén kilépni a sejtől a bazális membránra keresztül. A transzcelluláris átjutás lehetővé teszi a *K. pneumoniae* számára, hogy áthatoljon a bélhámra, belépjen a szisztémás keringésbe, és eljusson extraintesztinális helyekre (5. ábra) (26).



5.ábra. A *K. pneumoniae* bélrendszeri transzlokációjának modellje (26). (Rho- inhibitor, GTPáz család, PI3K- foszfatidilinositol 3-kináz, Akt- Akt1/2 kináz inhibitor, TJ- tight junction fehérje.)

A bakteriális VI-os típusú szekréciós rendszert a Gram-negatív baktériumok több mint 25%-ában azonosították (27). Számos patogén baktérium ezt a szekréciós rendszert (T6SS) alkalmazza, mint a *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae* vagy *Acinetobacter baylyi* (24). Feltételezések szerint ezek a kórokozók olyan stratégiákat alakítottak ki, amelyek lehetővé teszik számukra a bakteriális riválisok elpusztítását és a fertőzés létrejöttét. A *K. pneumoniae* szintén ezen a transzcelluláris transzlokációs mechanizmuson keresztül képes a bélflórából más szövetekbe átvándorolni, ami szisztémás fertőzéseket okozhat (28). Kimutatták, hogy a *K. pneumoniae* VI. típusú szekréciós rendszerei szerepet játszanak a humán Caco-2 vastagbél epiteliális sejtekhez való adhézióban és invázióban, amelyek kulcsfontosságúak a gazdaszervezet kolonizációjához (29).

Emellett, korábbi tanulmányokban megállapították, hogy a *K. pneumoniae* aktiválja a TGF- β (transzformáló növekedési faktor-béta) jelátviteli útvonalat, amely döntő szerepet játszik a baktérium invazivitásának fokozásában. Ez az aktiválás kifejezetten a TLL1 (tolloid-like 1

fehérje) expressziójának felszabályozásához vezet, amely fehérje részt vesz a szövetek fejlődésében és javításában. A TLL1-expresszió növekedése megkönnyíti a baktériumnak bélhámsejtekhez való tapadását és invázióját, lehetővé téve számára a fertőzések hatékonyabb kialakulását (30).

1.4. Citotoxicitás

A bakteriális toxinok változatosak, kémiai szerkezetük, hatásmechanizmusuk és a gazdasejtekre gyakorolt hatásuk alapján osztályozhatók. Általánosságban a bakteriális toxinok két fő típusba sorolhatók: endotoxinok és exotoxinok (31).

Az endotoxinok, különösen a Gram-negatív baktériumokból származó lipopoliszacharidok (LPS) a citokintermelés erős indukáló ágensei. Az immunsejtek toll-szerű 4-es receptorához (TLR4) kötődnek, és olyan jelátviteli kaszkádokat indítanak el, amelyek gyulladásos citokinek kiválasztását eredményezik. Ez túltermelés esetén szisztémás hatásokhoz, például széptikus sokkhoz vezethet (32).

Az exotoxinok a baktériumok által termelt, szekretált fehérjék, amelyek közvetlenül károsíthatják a gazdasejteket, vagy megzavarhatják az immunválaszokat. Aktiválják az immunsejteket, ami gyulladáskeltő citokinek, például TNF- α (tumor nekrosis faktor α), IL-1 és IL-6 (interleukin) felszabadulásához vezet (32).

Az exotoxinok hatásmódjuk alapján több kategóriába sorolhatók. A neurotoxinok kifejezetten az idegsejteket veszik célba, megzavarva a normális idegi jelátvitelt. Az enterotoxinok elsősorban a beleket veszik célba, gyakran súlyos hasmenést és gyomor-bélrendszeri zavarokat okozva. Megzavarják a normális ion- és vízszállítást a bélbélnyálkahártyán keresztül. A citotoxinok a gazdasejteket célozzák meg és károsítják, ami sejtlízishez vagy apoptózishoz (sejthalálhoz) vezet. A baktériumtól függően a szervezet különböző sejtípusait érinthetik (31).

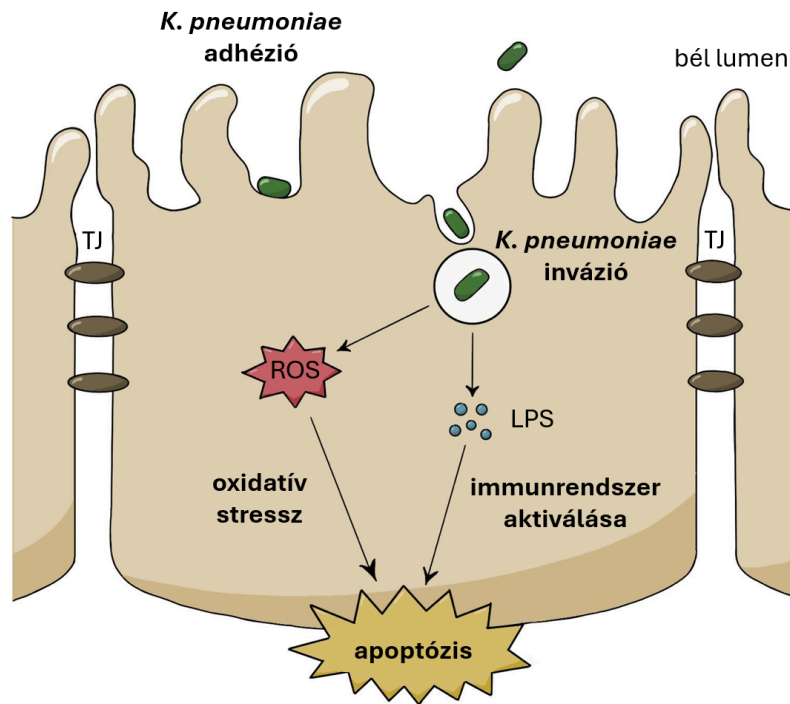
A citotoxicitás megmutatja, hogy egy molekula mennyire képes károsítani a sejteket. Azokat a molekulákat vagy folyamatokat, amelyek sejtkárosodást vagy sejthalált idéznek elő, citotoxikusnak nevezzük. A citotoxikus vegyületek hatásának kitett sejtek esetében különböző folyamatok léphetnek fel, mint például a nekrosis (nem programozott sejthalál), apoptózis (programozott sejthalál), autofágia, vagy a sejtek proliferációjának csökkenése, amely a növekedés és osztódás leállításához vezet (33).

A *K. pneumoniae* citotoxikus a humán sejtekre nézve. Az epitheliális sejtekre gyakorolt citotoxikus hatása arra utal, hogy a baktérium a fertőzés során jelentős károsodást és pusztulást képes okozni ezekben a sejtekben. Ez a citotoxikus hatás az élő, kapszulázott *K. pneumoniae* jelenlétéhez kapcsolódik. A kapszula poliszacharidja (CPS) döntő fontosságú a károsodás kiváltásában, bár a CPS önmagában nem elegendő a károsodás kiváltásához. A baktériumok sejtleválást, lízist és végül sejthalált okoznak, ami hozzájárul a szövet károsodásához a fertőzésekben. Úgy tűnik, hogy ez a citotoxicitás nem kapcsolódik a III. típusú szekréciós rendszerhez (T3SS), mivel a *K. pneumoniae* nem rendelkezik T3SS komponensekkel, de más mechanizmusok, például a külső membrán vezikulák felszabadulása is szerepet játszhat benne (34).

A *K. pneumoniae*, jelentős citotoxikus hatást fejt ki a tumorsejtekre, ami a potenciális onkolitikus terápiák kutatásának középpontjába helyezi. A baktériumról ismert, hogy különböző humán epitelsejtekben sejtkárosodást idéz elő olyan mechanizmusokon keresztül, amelyek közé tartozik az oxidatív stressz és a citoszelektális zavarok kiváltása (35).

Vizsgálatok kimutatták, hogy a *K. pneumoniae* dóziszfüggő módon képes sejthalált előidézni. Ez a citotoxicitás a reaktív oxigén származékok (ROS) keletkezéséhez köthető, ami oxidatív stresszhez vezet, amely döntő szerepet játszik a tumorsejtek elpusztításában (36). Továbbá az LPS jelentős szerepet játszik a baktérium betegséget okozó képességében. Amikor a *K. pneumoniae* behatol, az LPS aktiválja az immunrendszert, ami gyulladáshoz vezet. Ez súlyos immunválaszokat, például szeptikus sokkot eredményezhet, ha a baktérium a véráramba kerül (37). A baktérium azon képessége, hogy LPS-ben gazdag külső membránvezikulákat (OMV) termel és szekretál, ezáltal képes citokint expresszálni, hozzájárul a citotoxicitáshoz (6. ábra) (36). Ezek a vezikulák toxikus molekulákat szállítanak, amelyek károsíthatják a gazdasejteket, beleértve a rákos sejteket is (35).

A *K. pneumoniae* citotoxicitása tisztázatlan, éppen ezért fontos vizsgálni ölühatását a humán sejtekre nézve.



6. ábra. A *K. pneumoniae* citotoxikus hatása a humán sejtekre, ROS képződést indukálva és LPS-t szekretálva apoptózist idéz elő.

2. CÉLKITŰZÉSEK

A baktériumok az antibiotikumokkal szemben gyorsan, akár napok alatt kialakítanak rezisztenciát. Számomra a legfontosabb kérdés, hogy az antibiotikumokkal szemben szerzett rezisztencia hogyan befolyásolja a baktériumok virulenciáját: csökkenti, vagy növeli azt? Ha megváltoztatja a virulenciát, mennyire függ az adott antibiotikum típusától? A kutatásom során olyan baktériumokat vizsgáltam, amelyek már rezisztensek voltak különböző új, fejlesztés alatt álló antibiotikummal szemben. A kísérletem során *Klebsiella pneumoniae* törzseket használtam, amelyeket laborunk adaptált ezekre az antibiotikumokra. A rezisztens törzsek virulenciája már bizonyított, ugyanis korábban csoportunk vizsgálta fertőzőképességüket nagy viasmoly (*Galleria mellonella*) gerinctelen fertőzési modellt alkalmazva (38). Ahhoz, hogy megértsük miért válnak virulenssé ezek a törzsek, mélyrehatóbb vizsgálatok szükségesek, mivel az eddigi kísérletek nem adnak magyarázatot az okokra. Ezért volt célom vizsgálni a baktériumok közvetlen hatását a humán sejtekre. Számos virulenciafaktor létezik, azonban kutatásom során a baktériumok inváziós képességét és citotoxicitását elemeztem az alábbi módszerekkel:

1. Baktériumok inváziós képességének vizsgálata:

Az antibiotikum adaptált vonalak humán sejtbe való bejutásának tanulmányozása bakteriális inváziós assay alkalmazásával.

2. Caco-2 humán sejtek túlélési vizsgálata:

Az antibiotikum adaptált vonalak citotoxicitásának tesztelése ko-kulturálás utáni humán sejtek (Caco-2) túlélésével.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Baktériumok

Az inváziós képesség és citotoxicitás vizsgálatok során humán sejteket növesztettem együtt *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031 antibiotikum rezisztens változataival.

A rezisztens törzsek két különböző adaptációs kísérletből származtak, melyek a következők:

A rezisztencia frekvencia vizsgálatok (Frequency of Resistance assay- FoR) során a baktérium populációban a spontán mutációk által okozott rezisztencia gyakoriságát becsültük meg. Körülbelül 10^{10} baktériumsejtet ültettünk szelektív antibiotikumot különböző koncentrációkban (2x, 4x, 8x, 20x MIC) tartalmazó táptalajra. 48 órán át tartó inkubáció után a kolóniaképző egység (CFU) meghatározásával következtettünk a rezisztencia frekvenciájára. A rezisztencia frekvenciát a rezisztens telepek számának és az eredeti sejtszámnak a hányadosaként határoztuk meg. A FoR kísérleteket 3 párhuzamos kísérletben végeztük el.

A másik kísérleti eljárás az adaptív laboratóriumi evolúció (Adaptive Laboratory Evolution- ALE). A kísérlet célja a legmagasabb rezisztencia szintű baktérium populációk kiválasztása. Tíz párhuzamos populációt növesztettünk antibiotikummal. Minden inkubáció után kis mennyiségű baktériumot vittünk át új táptalajokba, amelyek különböző antibiotikum (0,5x, 1x, 1,5x és 2,5x az előző lépés koncentrációjának megfelelő) koncentrációt tartalmaztak. Minden alkalommal (20 transzferen keresztül) csak a legmagasabb koncentráción növekvő populációkat vittük tovább.

Az evolúciós kísérletek után standard folyadék hígítási módszerrel határoztuk meg az adaptált vonalak minimális gátló koncentrációját (MIC) és az kiindulási ős MIC értékéhez normalizálva határoztuk meg a relatív MIC-t.

Így összességében 57 antibiotikum rezisztens vonalat hoztunk létre FoR és 148 vonalat az ALE módszerekből. Ebből 48 vonal virulenciáját mértük nagy viaszmosoly (*Galleria mellonella*) lárvában. Ezekből választottam ki 8 vonalat a kísérleteimhez az alapján, hogy csökkent vagy növekedett virulenciával rendelkeztek. A vonalakat az 1. táblázat tartalmazza.

Baktérium rövidítése	Antibiotikum	Adaptációs mechanizmus	Virulencia	relatív MIC
SPR FoR 1	SPR-206	FoR	Növekedett	64
SPR FoR 3	SPR-206	FoR	Növekedett	256
POL ALE 8	POL-7306	ALE	Növekedett	32
POL ALE 10	POL-7306	ALE	Növekedett	64
SCH ALE 9	SCH79797	ALE	Csökkent	8
OMA ALE 9	Omadaciklin	ALE	Csökkent	128
DEL ALE 8	Delafloxacin	ALE	Csökkent	65536
ZOL ALE 6	Zoliflodacin	ALE	Csökkent	1024

1.táblázat. Antibiotikumokhoz adaptált baktériumtörzsek, azok adaptációs mechanizmusa, *Galleria mellonella* lárvában mért virulenciájuk és a relatív minimális gátló koncentrációjuk (relatív MIC) az adaptáció után. Különböző módszerekkel adaptálódtak a vonalaink: rezisztencia frekvencia vizsgálatok (Frequency of Resistance- FoR) és adaptív laboratóriumi evolúció (Adaptive Laboratory Evolution- ALE).

A kísérletek során *Klebsiella aerogenes* ATCC 13048 törzset használtam, mint pozitív kontroll, mert hatékonyabban marad fenn a humán sejtben, mint a *K. pneumoniae*. Az O antigénnel (lipopoliszacharid összetevő) és a K antigénnel (kapszula képződésért felelős) egyaránt rendelkező törzsek nagyobb ellenállást mutatnak az immunrendszer támadásaival szemben, ami arra utal, hogy ezen antigének kombinációja a *K. aerogenes* számára fokozott túlélési mechanizmusokat biztosít a gazdaszervezetben. Mindkét faj képes poliszacharid kapszulát termelni, a *K. aerogenes* azonban gyakran vastagabb kapszulát termel, ami növeli a gazdaszervezetben való túlélési képességét, ami hozzájárul virulenciájához (39).

3.2. Humán sejtek

A vizsgálat során az emberi vastagbél adenokarcinóma sejtek immortalizált sejtvonalat (Caco-2) használtam. Azért választottam ezeket a rákos sejteket, mert a szakirodalomban elterjedt humán sejt, könnyen és hosszú ideig fenntartható a primer sejtekhez képest.

A Caco-2 sejteket DMEM-ben (Capricorn) tenyésztettem, amelyet 10% v/v magzati szarvasmarha szérummal (FBS), 1% v/v nem esszenciális aminosavakkal (NEAA), 100 µg/ml penicillinnel és 100 U/mL sztreptomicinnel egészítettem ki, és 37°C-on, 5%-os CO₂ inkubátorban tartottam. A *Mycoplasma spp.* szennyeződést a Lonza MycoAlert® Detection Kit segítségével zártam ki.

3.3. Antibiotikumok, tápok

A vizsgálatok során gentamicint (extracelluláris kórokozók elpusztítása érdekében) és primocint (extra- és intracelluláris kórokozók elpusztítására) alkalmaztam. A gentamicint az RK Tech-től, míg a primocint InvivoGen forgalmazótól vásároltuk. Az antibiotikumokra feloldásuk után szűréssel sterilizáltam és felhasználásig -20 °C-on tároltam.

A vizsgálat során baktériumok esetén Mueller-Hinton Broth 2 (MHBII) táptalajt használtam. A humán sejtek esetén végig Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) tápoldattal dolgoztam. A sejtek mosásához foszfát puffert (PBS) alkalmaztam.

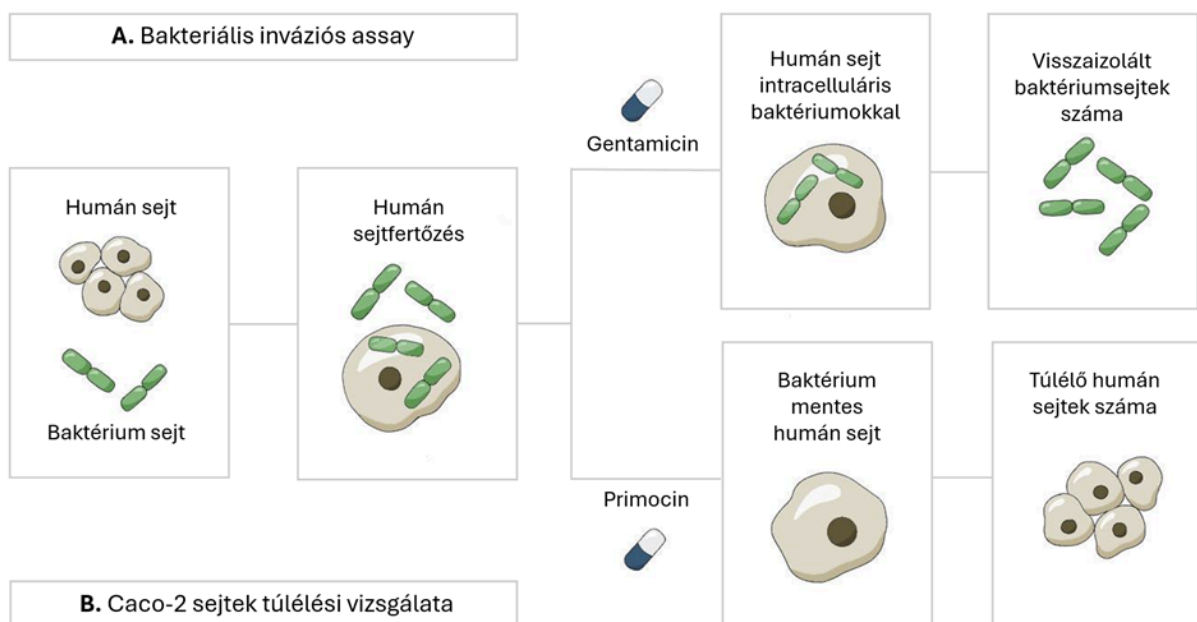
3.4. Bakteriális inváziós assay

A bakteriális inváziós képesség vizsgálatához a korábban leírt protokollt alkalmaztam kisebb módosításokkal (40). A baktériumtörzseket 3 ml Mueller-Hinton Broth II (MHBII) táptalajba oltottam, és egy éjszakán át 37°C-on inkubáltam rázó inkubátorban. A humán sejtek fertőzéséhez az éjszakai baktériumtenyészeteket centrifugáltam (4500 rpm, 5 perc, 4°C) és PBS-el mostam, majd 0,5 OD₆₀₀-ra hígítottam fertőzési tápfolyadékban (antibiotikum mentes DMEM, kiegészítve 10% v/v FBS-el és 10 mM HEPES-el). A humán sejteket 3 órán át inkubáltam a baktériumokkal 37°C-on, 5%-os CO₂ inkubátorban. Az inkubációt követően a fertőzési tápfolyadékot leszívtam, és a sejteket PBS-el mostam, majd a fertőzött humán sejteket 24 órán keresztül 400 µg/ml gentamicinnel kiegészített tenyésztőközeggel kezeltem az extracelluláris baktériumok elpusztítása érdekében (37°C, 5% CO₂ inkubátor). Az inkubációt követően a tápot lecseréltem antibiotikum mentes táppal (DMEM) és két órán át hagytam regenerálódni a sejteket 37 °C-on. A regenerálódást követően a felülúszót kiszélesztettem MHBII agarlemezre, annak érdekében, hogy megbizonyosodjak, nem

maradt baktériumsejt a külső közegben. A humán sejt kultúrákat ezt követően 0,5% v/v Triton X-100-zal és 0,25% tripszinnel mostam, hogy a humán sejteket lizáljam és leválasszam a Petri-csészék aljáról. A lizátumokat mikrocentrifuga csövekbe helyeztem át és 40 KHz frekvencián 3 másodpercig szonikáltam VEVOR 10L ultrahangos tisztítógép segítségével. Az invazív baktériumsejtek kolóniaképző egységeit (CFU) MHBII agarlemezre történő szélesztésével határoztam meg (7. ábra).

3.5. Caco-2 sejtek túlélési vizsgálata

A túlélési vizsgálatok során a baktériumtörzseket 3 ml MHBII táptalajba oltottam és egy éjszakán át 37°C-on inkubáltam rázó inkubátorban. A humán sejtek fertőzéséhez az éjszakai baktériumtenyészeteket centrifugáltam, PBS-el mostam, és 0,5 OD₆₀₀-ra hígítottam fertőzési tápfolyadékban (10% v/v FBS-el és 10 mM HEPES-el kiegészített antibiotikum mentes DMEM). A humán sejteket ezután 3 órán át inkubáltam a baktériumokkal 37°C-on, 5%-os CO₂ inkubátorban. Az inkubációt követően a fertőzési tápfolyadékot leszívtam, a sejteket PBS-el mostam, majd 24 órán keresztül 100 µg/ml primocint tartalmazó tápfolyadékkal kezeltem az extracelluláris és intracelluláris baktériumok eltávolítása érdekében. A primocin kezelést követően a Caco-2 sejteket PBS-el mostam. A sejtek számát egy automatizált Luna II® sejtszámlálóval (Logos Biosystems) határoztam meg. A túlélő sejtek frakcióját kiszámítottam és a nem fertőzött kontroll sejtekhez normalizáltam (7. ábra).



7.ábra. A bakteriális inváziós képesség és citotoxicitás vizsgálat folyamatának sematikus ábrája.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Az evolúciós kísérletek eredménye

Csoportunk korábban vizsgálta az antibiotikum rezisztencia kialakulását. A kísérlet során vizsgáltuk, hogy a *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031 baktérium milyen szintű rezisztenciát képes fejleszteni olyan antibiotikumokra, melyek évtizedek óta használnak a klinikumban (kontroll), illetve olyan antibiotikumokra, melyek még engedélyeztetési fázisban vannak, vagy csak pár éve használatosak a gyógyászatban (új). A vizsgált antibiotikumokat a 2. táblázat mutatja be. A baktériumok a kontroll és az újabb gyógyszerekkel szemben is kialakítottak rezisztenciát (2. ábra).

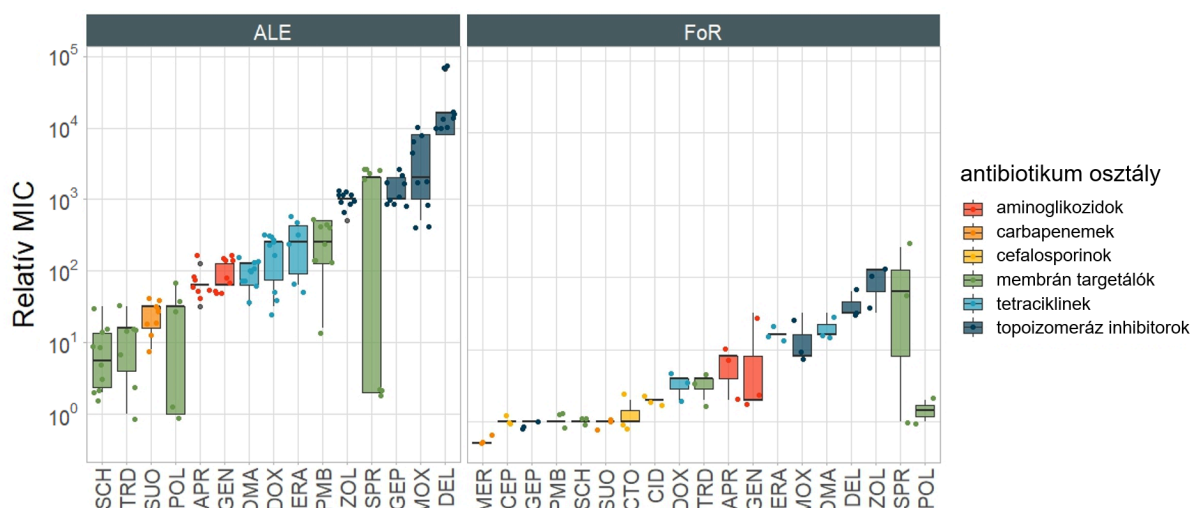
Antibiotikum	Rövidítés	Antibiotikum osztály	Generáció	Jóváhagyás ideje/klinikai fázis
Omadaciklin	OMA	tetraciklinek	új	2018
Eravaciklin	ERA		új	2018
Doxiciklin	DOX		kontroll	1967
Ceftobiprol	CTO	cefalosporinok	új	2019
Cefiderokol	CID		új	2019
Cefepim	CEP		kontroll	1994
Delafloxacin*	DEL	topoizomeráz inhibitorok	új	2017
Gepotidacin*	GEP		új	3. fázis
Zoliflodacin	ZOL		új	3. fázis
Moxifloxacin*	MOX		kontroll	1999
Apramicin	APR	aminoglikozidok	új	1. fázis
Gentamicin	GEN		kontroll	1964
Sulopenem	SUO	carbapenemek	új	3. fázis
Meropenem	MER		kontroll	1996
Tridekaptin M152-P3	TRD	membrán targetálók	új	pre-klinikai
POL-7306*	POL		új	pre-klinikai
SCH79797*	SCH		új	pre-klinikai
SPR-206	SPR		új	1. fázis
Polimixin B	PMB		kontroll	1964

2.táblázat. Az evolúciós kísérletek során használt kontroll és új antibiotikumok osztályok szerint csoportosítva és ezek engedélyeztetési fázisai. A több támadáspontú vegyületek csillaggal vannak jelölve, *.

A rezisztencia frekvencia vizsgálatok (FoR) során a spontán rezisztenciát elemeztük különböző antibiotikumok esetén. Megfigyeltük, hogy a baktérium populációk 42%-ának csökkent az érzékenysége az antibiotikumokkal szemben, megnőtt a rezisztencia szintjük (legalább négyszeres MIC), ami azt jelzi, hogy a rezisztencia kialakulása gyakori. A klinikai töréspontok általában nem ismertek a vizsgált "újabb" antibiotikumok esetén, többségüknél viszont rendelkezésre állnak az intravénás alkalmazásra vonatkozó ajánlások. Ezért a gyógyszer intravénás beadásakor mért legmagasabb plazma csúcskoncentrációját használtuk a mutánsok MIC-változásainak lehetséges klinikai jelentőségének becslésére. Az adaptált vonalak 37%-ban az MIC érték elérte vagy meghaladta a plazma csúcskoncentrációját. Az eredmények alapján elmondható elmondható, hogy az új antibiotikumokkal szembeni rezisztencia akár napok alatt is kialakulhat.

Az adaptív laboratóriumi kísérletek (ALE) célja a populációk antibiotikum-rezisztencia szintjének maximalizálása volt. Kimutattuk, hogy a baktériumok rezisztencia szintje jelentősen megnövekedett, az adaptált vonalak MIC értéke megközelítőleg 2048-szorosa volt az ősnak. A vizsgált törzsek 67%-ban az MIC érték elérte vagy meghaladta a plazma csúcskoncentrációját, ami klinikai szempontból releváns. Az "új" és "kontroll" antibiotikumok hasonlóan rezisztenciát idéztek elő és aggasztó módon a legújabb antibiotikumokkal szemben is gyorsan kialakult (párosított T-test, $p = 0.8617$).

A kialakult rezisztencia szintek között jelentős eltérések voltak megfigyelhetők. A topoizomeráz inhibitorok esetén jelentősen növekedett a relatív MIC (Fisher egzakt teszt, $p = 0,00001$). Ezzel szemben a membrán targetáló antibiotikumoknál nem figyelhető meg eltérés, kivétel az SPR, amely esetén szignifikánsan növekedett a relatív MIC mindkét evolúciós kísérlet során (Fisher egzakt teszt, $p = 0,0298$). Ehhez képest a többi membrán targetáló antibiotikum esetén nincs jelentős különbség, például az SCH egyik evolúciós kísérlet esetében sem mutatott növekedést (Fisher egzakt teszt, $p = 0,0908$). Ez rávilágított arra, hogy a baktériumok rezisztenciája gyorsan fejlődhet és a különböző gyógyszerekkel szembeni rezisztencia kialakulásának sebessége, mértéke eltérhet az antibiotikumok között (8. ábra).



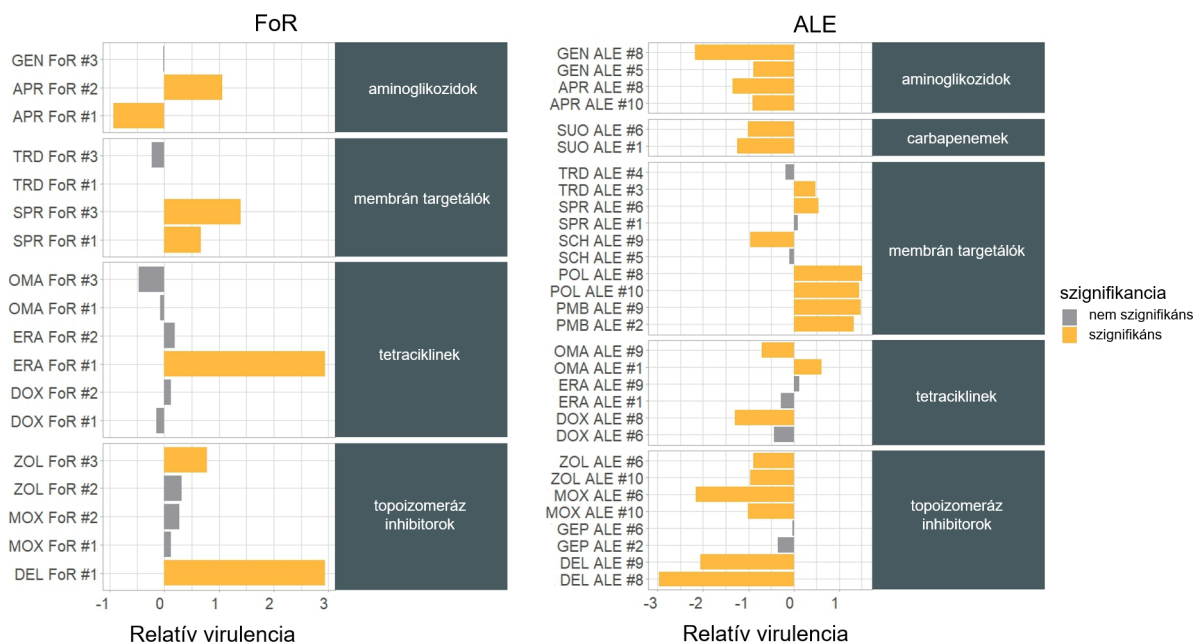
8.ábra. Az antibiotikum adaptált vonalak relatív MIC értéke. A relatív MIC az evolált vonal és az ősz MIC értékének a hányadosa. Minden pont egy laboratóriumi evolált vonal, a színek az antibiotikum osztályt jelzik. A boxplotok a mediánt, az első és a harmadik kvartiliseket jelölik, a whiskerek pedig az interkvartilis tartomány 1,5-szeresét. Szignifikáns heterogenitás látható relatív MIC-ban az antibiotikum törzs kombinációk között (Kruskal-Wallis, $p = 2.9e-12$). Az antibiotikumok rövidítéseit lásd a 2. táblázatban.

4.2. A virulencia vizsgálatok eredménye

Az antibiotikum rezisztencia virulenciára gyakorolt hatását nagy viaszmosoly (*Galleria mellonella*) lárvámodellben vizsgáltuk. A viaszmosoly közkezdvelt modellszervezet a kísérletek során a nagyfokú reprodukálhatóságnak, a nagy áteresztőképességnek és az emberhez hasonló immunitásának köszönhetően. A kísérlet során lárvákat fertőztünk meg antibiotikum rezisztens baktériumokkal, amelyek virulenciáját összehasonlítottunk az ősszel. A baktérium szuszpenziókat fecskendővel a lárvák hemocoelájába (vérfolyadék) fecskendeztük a második bal prolegon (előláb) keresztül, majd 48 órán keresztüli inkubálás során 6 óránként dokumentáltuk a túlélésüket. A rovarok akkor voltak halottnak tekinthetők, ha nem reagáltak érintésre. A kísérlet során 48 adaptált vonalat vizsgáltunk.

Az eredményekből látható volt, hogy azok a baktériumok, amelyek rezisztenciát alakítottak ki valamely antibiotikummal szemben jelentősen megváltozott a fertőzőképességük. A vizsgált vonalak 27%-a növekedett virulenciát mutatott, míg 33%-ának ezzel szemben

szignifikánsan csökkent a virulenciája az őshöz képest. Antibiotikum csoportok tekintetében az aminoglikozidok esetén volt leggyakoribb a virulencia csökkenés (71%), azonban a membrán targetálók mutatták a leggyakoribb növekedést (57%). Ez arra utal, hogy a membrán targetálók esetén gyakran a rezisztencia kialakulása megnövekedett virulenciával jár, szemben a többi antibiotikum osztállyal (9. ábra).



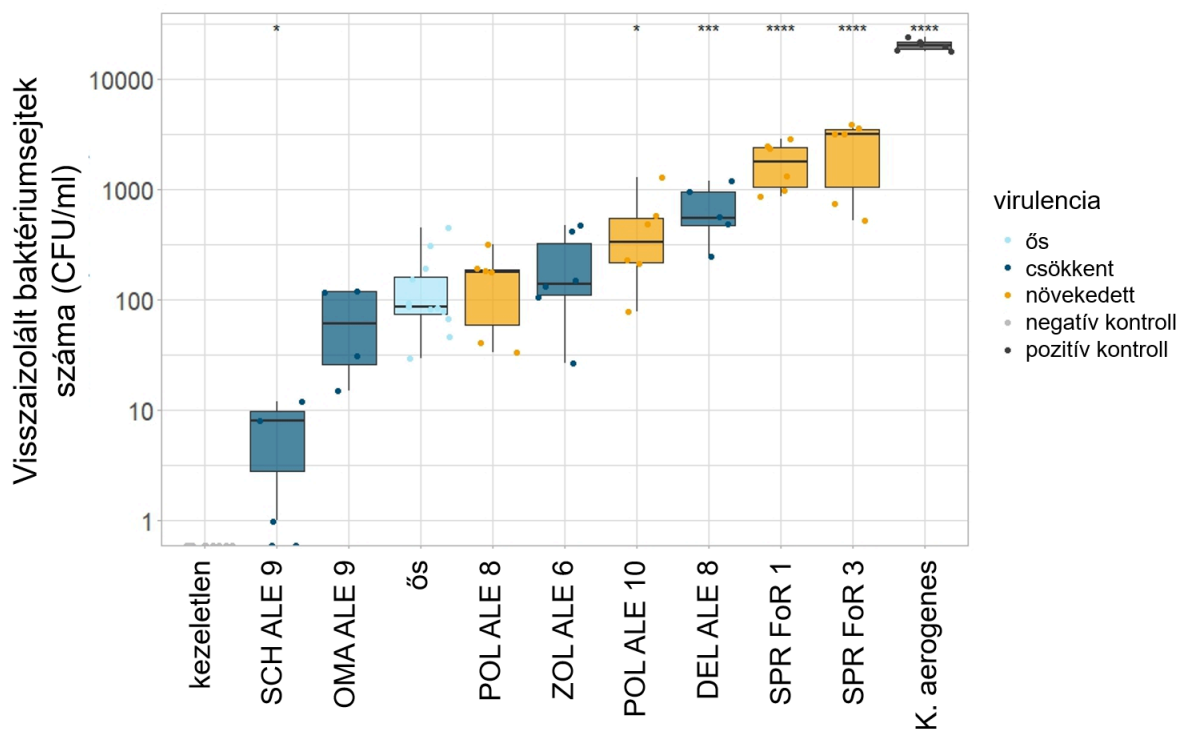
9.ábra. Az antibiotikum adaptált vonalak *Galleria mellonella* modellben mért relatív virulencia értéke. A relatív virulencia az ősz és az adaptált vonal túlélési görbe meredekségének összehasonlító értéke. A színek a virulencia szignifikanciáját mutatják az ősz törzshöz képest, ami jelentős diverzitást mutat az antibiotikum csoportok között. A negatív értékek a csökkent virulenciát mutatják, míg a pozitív értékek a növekedett virulenciát. Az antibiotikumok rövidítését lásd a 2. táblázatban.

A fent említett virulencia vizsgálatok alapján választottam ki négy csökkent és négy megnövekedett virulenciával rendelkező vonalat, kísérleteimet pedig a továbbiakban ezekkel végeztem (1. táblázat).

4.3. Bakteriális inváziós képesség vizsgálat eredményei

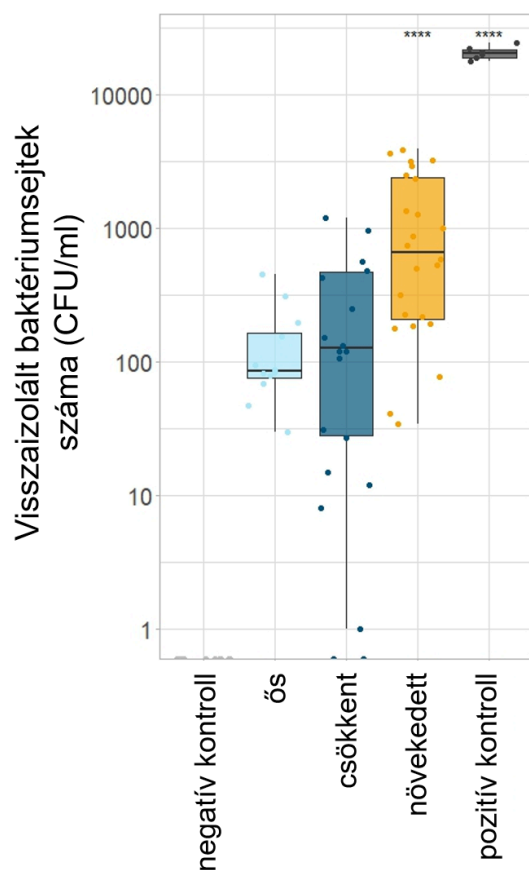
Az inváziós kísérleteink során antibiotikum-érzékeny ősz (*K. pneumoniae* ATCC 10031) és a nyolc antibiotikum rezisztens vonal bélhámsejtekbe való bejutását vizsgáltam Caco-2 sejtek esetén. Pozitív kontrollként a *K. aerogenes* törzset használtam, míg negatív kontrollként a kezeletlen humán sejtet. Az adaptált vonalak közül négy növekedett virulenciát, míg négy vonal csökkent virulenciát mutatott, ahogyan azt korábban a *Galleria mellonella* fertőzési modellben kimutattuk. A vizsgálatok során a 3 órás fertőzést követően az extracelluláris baktériumokat 24 órás gentamicin kezeléssel elimináltam. A tenyészetet szonikáltam a humán sejtek feltárása érdekében. A Caco-2 sejtek bakteriális invázióját az intracelluláris baktériumok kolóniaképző egységek (CFU) számának meghatározásával számszerűsítettem. A kísérleteket legalább 4-6 biológiai replikátummal végeztem.

Az eredmények azt mutatták, hogy a visszaizolált baktériumok száma jelentősen megváltozott az antibiotikum-érzékeny ősz törzshöz képest. Az antibiotikum rezisztens baktériumok inváziós képessége a virulens vonalak esetén jelentősen megnövekedett, azaz sokkal hatékonyabban jutottak be a humán sejtekbe, mint az ősz törzs. Különösen az SPR FoR #3 és az SPR FoR #1 mutatott jelentős invazivitást. Ebben az esetben kivételt képezett a POL ALE #8 vonal, ahol az inváziós képesség nem változott az őshöz képest. Ezzel szemben a csökkent virulenciájú vonalak változatos inváziós képességet mutattak. Kifejezetten a SCH ALE #9 vonal mutatott jelentős csökkenést az invazivitásban. A DEL ALE #8 vonal azonban a csökkent virulencia ellenére megnövekedett inváziós képességet mutatott (10. ábra).



10.ábra. Bakteriális inváziós vizsgálat antibiotikum-érzékeny és 8 antibiotikum-rezisztens *K. pneumoniae* vonallal. A sárga boxplotok a baktériumok növekedett virulenciáját, míg a kék a csökkent virulenciáját jelzi, ahogyan azt a korábban elvégzett virulencia vizsgálatok során tanulmányozták. Az szignifikáns eltéréseket csillaggal jelöltük (kétoldalas t-teszt: *****/****/****/****/ p <= 0,0001/0,001/0,01/0,05). A boxplotok a mediánt, az első és harmadik kvartiliseket, míg a whiskerek az interkvartilis tartomány 1,5-szeresét jelölik. A rövidítéseket lásd az 1. táblázatban.

Az egyéni elemzések után csoportosítottam a csökkent és a megnövekedett virulenciával rendelkező baktériumtörzseket, amelyet összehasonlítottam az ős-típussal. Az összesített eredmények azt mutatják, hogy a megnövekedett virulenciával rendelkező vonalak jelentősen nagyobb inváziós képességet mutatnak az antibiotikum-érzékeny ős törzshöz képest. A csökkent virulenciájú baktériumok inváziós képessége azonban nem változott. Ezek az eredmények azt jelzik, hogy ezek a baktériumok nem csak, hogy rezisztenciát alakítottak ki az antibiotikumokkal szemben, hanem emellett még az inváziós képességük is megnövekedett, ami jelentős egészségügyi kockázatot jelent (11. ábra).

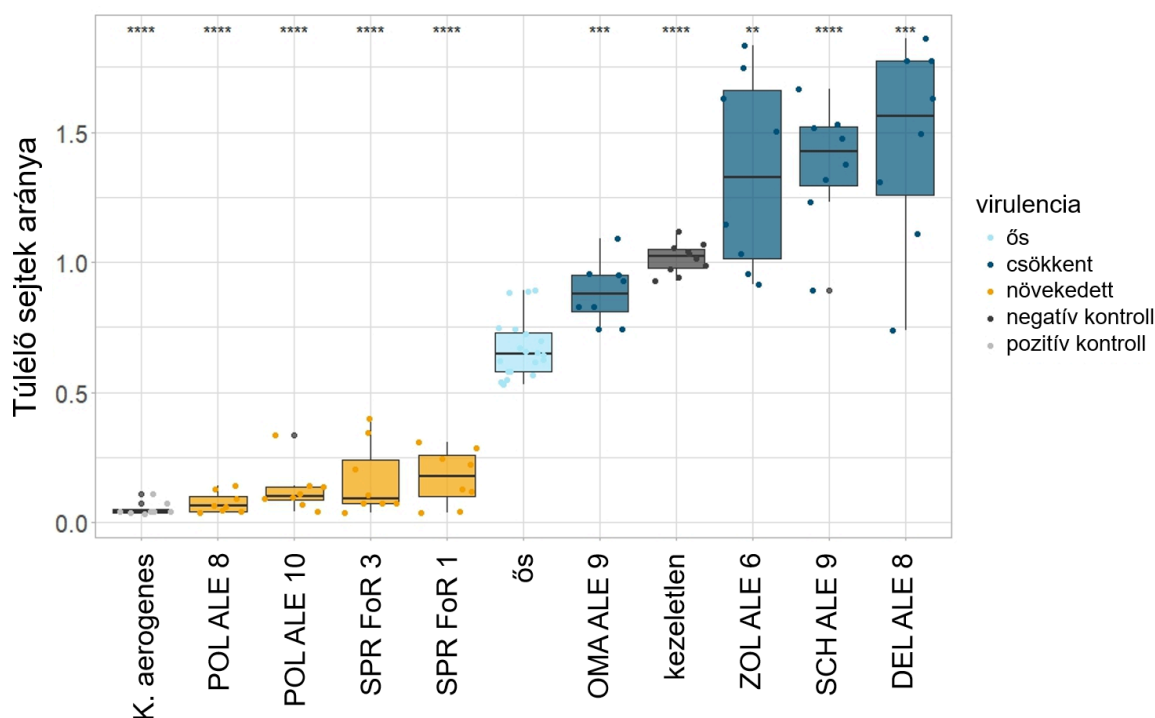


11.ábra. Az antibiotikum-rezisztens *K. pneumoniae* vonalak virulenciája, vagyis a baktériumok inváziós képessége. A sárga boxplotok a baktériumok növekedett virulenciáját, míg a kék a csökkent virulenciáját jelzi, ahogyan azt a korábban elvégzett virulencia vizsgálatok során tanulmányozták. Az szignifikáns eltéréseket csillaggal jelöltük (kétoldalas t-teszt, **** $p \leq 0,0001$). A boxplotok a mediánt, az első és harmadik kvartiliseket, míg a whiskerek az interkvartilis tartomány 1,5-szeresét jelölik. A rövidítéseket lásd az 1. táblázatban.

4.4. Caco-2 sejtek túlélési vizsgálatának eredményei

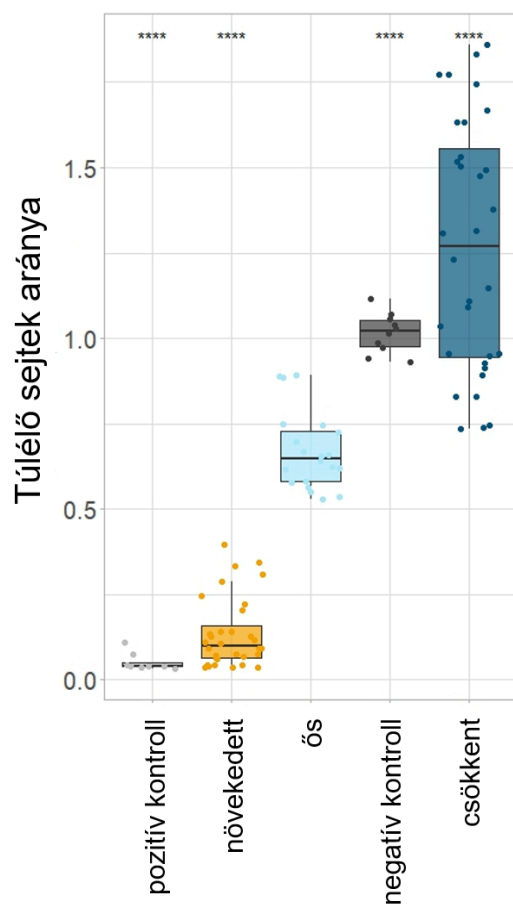
A Caco-2 sejtek túlélési vizsgálata során az antibiotikum-érzékeny ősz (*K. pneumoniae* ATCC 10031) és a nyolc megfelelő antibiotikum-rezisztens vonal citotoxicitását mértem. Ebben a kísérletben azt vizsgáltam, hogy milyen mértékben pusztítják el a rezisztens vonalak a human sejteket az őshöz képest. Pozitív kontroll a *K. aerogenes* volt, míg a negatív kontroll a kezeletlen Caco-2 sejtek. A ko-kultúrálás után az intra- és extracelluláris baktériumokat 24 órás primocin kezeléssel elimináltam és kiszámítottam a túlélő Caco-2 sejtek frakcióját. A kísérleteket legalább 8 biológiai ismétlésben végeztem.

A citotoxicitás vizsgálat során azt figyeltem meg, hogy a túlélő sejtek száma a megnövekedett virulenciájú baktériumok jelenlétében jelentősen csökkent, vagyis ezek az adaptált vonalak nagyobb mértékben pusztították el a humán sejteket, mint az antibiotikum-érzékeny ősz törzs. Mind a négy adaptált vonal esetén, amelyek SPR és POL rezisztensek, látható a magasfokú öléképesség. Ezzel szemben a csökkent virulenciájú törzsek esetében nagymértékben nőtt a túlélő sejtek száma a szenzitív ősz törzshöz képest. A legnagyobb eltérés az SCH ALE #9 vonal esetében volt. Továbbá megfigyeltem, hogy ha a Caco-2 sejteket csökkent virulenciájú vonalakkal együtt inkubálom, akkor több élő sejtet tudok azonosítani, mint a kezeletlen kontroll esetén. Ennek a jelenségnek a megértéséhez mélyrehatóbb vizsgálatokra van szükség (12. ábra).



12.ábra. Az antibiotikum-rezisztens *Klebsiella pneumoniae* vonalak virulenciájuknak megfelelő citotoxicitást mutatnak Caco-2 sejtekben. Az ábra a túlélő Caco-2 sejtek százalékos arányát mutatja a nem fertőzött kontroll sejtekhez normalizálva. A sárga boxplotok a baktériumok növekedett virulenciáját, míg a kék a csökkent virulenciáját jelzi, ahogyan azt a korábban elvégzett virulencia vizsgálatok során tanulmányozták. A szignifikáns eltéréseket csillaggal jelöltük (kétoldalas t-teszt: ****/***/**/* a $p \leq 0,0001/0,001/0,01/0,05$ értéket jelzi). A boxplotok a mediánt, az első és harmadik kvartiliseket, míg a whiskerek az interkvartilis tartomány 1,5-szeresét jelölik. A rövidítéseket lásd az 1. táblázatban.

Hasonlóképpen az inváziós kísérlethez, ebben az esetben is elemeztem csoportosítva az adaptált vonalakat, annak függvényében, hogy csökkenő vagy növekvő virulenciát mutatnak, összehasonlítva a szenzitív űs-típussal. A kapott eredmények alapján látható, hogy a megnövekedett virulenciájú baktériumok jelenlétében szignifikánsan csökkent a túlélő sejtek száma az antibiotikumra érzékeny űs törzshöz képest, vagyis nagyobb mértékben pusztítják el a humán sejteket. Ellenben a csökkent virulenciájú törzsek esetében növekedett a túlélő sejtek száma az antibiotikumra érzékeny űs törzshöz képest, kevésbé képesek ölni a Caco-2 sejteket. Eredményeim arra utalnak, hogy egyes antibiotikumokhoz való alkalmazkodás hatással van a humán sejtekkel szembeni citotoxicitásra (13. ábra).



13.ábra. Antibiotikum-rezisztens *K. pneumoniae* vonalak citotoxikus hatása Caco-2 sejtekben. Az ábra a túlélő humán sejtek százalékos arányát mutatja a nem fertőzött kontroll sejtekhez normalizálva. A sárga boxplotok a baktériumok növekedett virulenciáját, míg a kék a csökkent virulenciáját jelzi, ahogyan azt a korábban elvégzett virulencia vizsgálatok során tanulmányozták. A szignifikáns eltéréseket csillaggal jelöltük (kétoldalas t-teszt: **** $p \leq 0,0001$). A boxplotok a mediánt, az első és harmadik kvartiliseket, míg a whiskerek az interkvartilis tartomány 1,5-szeresét jelölik. A rövidítéseket lásd az 1. táblázatban.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

A baktériumok antibiotikumokkal szembeni rezisztenciája egyre nagyobb egészségügyi kihívást jelent. Az antibiotikumok mértéktelen használata miatt a rezisztens baktériumok már mindenhol megtalálhatók. E miatt a baktériumok már az új, fejlesztés alatt álló antibiotikumokkal szemben is ellenállóak lehetnek. Amellett, hogy rezisztensek, virulenciájuk is megváltozik. Ahhoz, hogy hatékony antibiotikumokat tudjunk fejleszteni, a rezisztencia vizsgálatok mellett figyelembe kell venni a baktériumok virulenciájának változását is.

Kutatásom során arra kerestem a választ, hogy a rezisztencia kialakulása hogyan változtatja meg a baktériumok virulenciáját. Ezért antibiotikum rezisztens *Klebsiella pneumoniae* törzsek hatását vizsgáltam humán sejtekre, azon belül az inváziós képességüket és citotoxicitásukat.

Az eredmények azt mutatják, hogy azok a baktériumok amelyek rezisztenciát alakítottak ki az antibiotikumokkal szemben megváltozott a virulenciájuk. A növekedett virulenciával rendelkező baktériumoknak fokozott inváziós képessége és citotoxikus hatása volt, míg a csökkent virulenciájú baktériumok esetén az invazivitás és a citotoxicitás is csökkent. Azonban mindkét esetben megfigyelhetők voltak kivételek, ami azt mutatja, hogy ezek a folyamatok antibiotikum függőek. Fontos megemlíteni, hogy a membrán targetáló antibiotikumok esetén fokozott a kockázat a virulencia, az inváziós képesség és citotoxicitás növekedésre.

Kísérleteink során a megváltozott virulenciát összefüggésbe tudtuk hozni a rezisztens törzsek inváziós képességével és citotoxicitásával, ellenben, hogy a törzsek ezt milyen molekuláris folyamatokon keresztül fejezik ki, még további kutatásokat igényel.

Munkánk hozzájárulhat ahhoz, hogy olyan antibiotikumokat fejlesszünk, melyek csökkentik a kockázatát az olyan baktériumok terjedésének, melyek amellett, hogy nagymértékű ellenálló képességgel rendelkeznek, a fertőzőképességük is nagyobb.

IRODALOMJEGYZÉK

1. O'Neill, J. (2016). Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations
2. Fernandes, P., & Martens, E. (2017). Antibiotics in late clinical development. In *Biochemical Pharmacology* (Vol. 133, pp. 152–163). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.09.025>
3. Antimicrobial resistance, 21 November 2023, World Health Organization
4. Etebu, E., & Arikekpar, I. (2017). *Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives*. <https://www.researchgate.net/publication/319881509>
5. Binaschi, M., Zunino, F., & Capranico, G. (1995). *Mechanism of Action of DNA Topoisomerase Inhibitors*.
6. Krause, K. M., Serio, A. W., Kane, T. R., & Connolly, L. E. (2016). Aminoglycosides: An overview. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(6). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a027029>
7. Papp-Wallace, K. M., Endimiani, A., Taracila, M. A., & Bonomo, R. A. (2011). Carbapenems: Past, present, and future. In *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (Vol. 55, Issue 11, pp. 4943–4960). <https://doi.org/10.1128/AAC.00296-11>
8. Epand, R. M., Walker, C., Epand, R. F., & Magarvey, N. A. (2016). Molecular mechanisms of membrane targeting antibiotics. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1858(5), 980–987. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.10.018>
9. Sanseverino, I., Navarro Cuenca, A., Loos, R., Marinov, D. & Lettieri, T. (2018). State of the art on the contribution of water to antimicrobial resistance, EUR 29592 EN, Publications Office of the European Union, Luxembourg, ISBN 978-92-79-98479-2, doi:10.2760/82376, JRC114775.

10. Blair, J. M. A., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O., & Piddock, L. J. V. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 13, Issue 1, pp. 42–51). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3380>
11. Webber, M. A., & Piddock, L. J. V. (2003). The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51(1), 9–11. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg050>
12. De Pascale, G. & Wright, G. D. (2010). Antibiotic resistance by enzyme inactivation: from mechanisms to solutions. *ChemBioChem* 11, 1325–1334
13. Fernández, L. & Hancock, R. E. W. (2012). Adaptive and mutational resistance: role of porins and efflux pumps in drug resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 25, 661–681
14. Schaenzer, A. J., & Wright, G. D. (2020). Antibiotic Resistance by Enzymatic Modification of Antibiotic Targets. In *Trends in Molecular Medicine* (Vol. 26, Issue 8, pp. 768–782). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2020.05.001>
15. Finlay, B. B., & Falkow, S. (1997). Common Themes in Microbial Pathogenicity Revisited. In *MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS* (Vol. 61, Issue 2). <https://journals.asm.org/journal/membr>
16. Wilson, D. N., Hauryliuk, V., Atkinson, G. C., & O'Neill, A. J. (2020). Target protection as a key antibiotic resistance mechanism. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 18, Issue 11, pp. 637–648). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0386-z>
17. Gilmore, M. S., Lebreton, F., & van Schaik, W. (2013). Genomic transition of enterococci from gut commensals to leading causes of multidrug-resistant hospital infection in the antibiotic era. In *Current Opinion in Microbiology* (Vol. 16, Issue 1, pp. 10–16). <https://doi.org/10.1016/j.mib.2013.01.006>
18. Sommer, M. O. A., Munck, C., Toft-Kehler, R. V., & Andersson, D. I. (2017). Prediction of antibiotic resistance: Time for a new preclinical paradigm? In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 15, Issue 11, pp. 689–696). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.75>

19. Martínez, J., Baquero, F. & Andersson, D. (2007). Predicting antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol* 5, 958–965. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1796>
20. Diard, M., & Hardt, W. D. (2017). Evolution of bacterial virulence. In *FEMS Microbiology Reviews* (Vol. 41, Issue 5, pp. 679–697). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/FEMSRE/FUX023>
21. Wu, H. J., Wang, A. H. J., & Jennings, M. P. (2008). Discovery of virulence factors of pathogenic bacteria. In *Current Opinion in Chemical Biology* (Vol. 12, Issue 1, pp. 93–101). <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.01.023>
22. Peterson, J. W. (1996). Bacterial Pathogenesis. In: Baron S, editor. *Medical Microbiology*. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston
23. Pierson, T. C., Doms, R. W., Reggiori, ; F, & Pelham, H. R. (2003). Bacterial Invasion: The Paradigms of Enteroinvasive Pathogens. In *Curr. Top. Microbiol. Immunol* (Vol. 281). <https://www.science.org>
24. Vieira, J. C., & Santos, D. (2015). Studies on the mechanisms of maturation and membrane disassembly of vacuoles containing invasive bacteria.
25. Effah, C. Y., Sun, T., Liu, S., & Wu, Y. (2020). *Klebsiella pneumoniae*: An increasing threat to public health. In *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* (Vol. 19, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12941-019-0343-8>
26. Hsu, C. R., Pan, Y. J., Liu, J. Y., Chen, C. T., Lin, T. L., & Wanga, J. T. (2015). *Klebsiella pneumoniae* translocates across the intestinal epithelium via rho GTPase-and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent cell invasion. *Infection and Immunity*, 83(2), 769–779. <https://doi.org/10.1128/IAI.02345-14>
27. Boyer, F., Fichant, G., Berthod, J., Vandenbrouck, Y., & Attree, I. (2009). Dissecting the bacterial type VI secretion system by a genome wide in silico analysis: What can be learned from available microbial genomic resources? *BMC Genomics*, 10. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-104>

28. Basler, M., Ho, B. T., & Mekalanos, J. J. (2013). Tit-for-tat: Type VI secretion system counterattack during bacterial cell-cell interactions. *Cell*, 152(4), 884–894. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.01.042>
29. Hsieh, P. F., Lu, Y. R., Lin, T. L., Lai, L. Y., & Wang, J. T. (2019). Klebsiella pneumoniae Type VI Secretion System Contributes to Bacterial Competition, Cell Invasion, Type-1 Fimbriae Expression, and in Vivo Colonization. *Journal of Infectious Diseases*, 219(4), 637–647. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy534>
30. Liu, J., Zhang, S., Pei, H., Tu, F., Liu, B., Yan, J., & Lin, X. (2022). Klebsiella pneumoniae activates the TGF- β signaling pathway to adhere to and invade intestinal epithelial cells via enhancing TLL1 expression. *International Journal of Medical Microbiology*, 312(6). <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2022.151561>
31. Bacterial Toxins and Their Modes of Action: A Review Article. (2019). *Journal of Medicine, Physiology and Biophysics*. <https://doi.org/10.7176/jmpb/55-03>
32. Jean-Marc Cavaillon. Exotoxins and endotoxins: Inducers of inflammatory cytokines
33. El-Housseiny, G. S., Hassouna, N. A., & Aboulwafa, M. M. (2010). Adherence, Invasion and Cytotoxicity of Some Bacterial Pathogens. In *Journal of American Science* (Vol. 6, Issue 10). <http://www.americanscience.orgeditor@americanscience.org260>
34. Cano, V., Moranta, D., Llobet-Brossa, E., Bengoechea, J. A., & Garmendia, J. (2009). Klebsiella pneumoniae triggers a cytotoxic effect on airway epithelial cells. *BMC Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-156>
35. Rius-Rocabert, S., Llinares Pinel, F., Pozuelo, M. J., García, A., & Nistal-Villan, E. (2019). Oncolytic bacteria: Past, present and future. In *FEMS Microbiology Letters* (Vol. 366, Issue 12). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnz136>
36. Lee, J. C., Lee, E. J., Lee, J. H., Jun, S. H., Choi, C. W., Kim, S. il, Kang, S. S., & Hyun, S. (2012). Klebsiella pneumoniae secretes outer membrane vesicles that induce the innate immune response. *FEMS Microbiology Letters*, 331(1), 17–24. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2012.02549.x>

37. Rollenske, T., Szijarto, V., Lukasiewicz, J., Guachalla, L. M., Stojkovic, K., Hartl, K., Stulik, L., Kocher, S., Lasitschka, F., Al-Saeedi, M., Schröder-Braunstein, J., von Frankenberg, M., Gaebelin, G., Hoffmann, P., Klein, S., Heeg, K., Nagy, E., Nagy, G., & Wardemann, H. (2018). Cross-specificity of protective human antibodies against *Klebsiella pneumoniae* LPS O-antigen. *Nature Immunology*, 19(6), 617–624. <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0106-2>
38. Daruka, L., Czikkely, M. S., Szili, P., Farkas, Z., Balogh, D., Grézal, G., Maharramov, E., Vu, T.-H., Sipos, L., Juhász, S., Dunai, A., Daraba, A., Számel, M., Sári, T., Stirling, T., Vásárhelyi, B. M., Ari, E., Christodoulou, C., Manczinger, M., ... Pál, C. (2023). *Antibiotics of the future are prone to resistance in Gram-negative pathogens*. <https://doi.org/10.1101/2023.07.23.550022>
39. Williams, P., Lambert, P. A., Brown, M. R. W., & Jones, R. J. (1983). The Role of the O and K Antigens in Determining the Resistance of *Klebsiella aerogenes* to Serum Killing and Phagocytosis. In *Journal of General Microbiology* (Vol. 129).
40. Reddy, S. & Austin, F. (2017). Adhesion and Invasion Assay Procedure Using Caco-2 Cells for *Listeria monocytogenes*. *Bio Protoc* 7, e2267

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom témavezetőmnek Dr. Pál Csabának, hogy a kutatócsoportjában végezhettem szakdolgozói munkámat, köszönöm a szakmai iránymutatását és segítségét. Hálás vagyok a szakmai fejlődésembe vetett hitéért.

Köszönöm Dr. Daruka Lejlának, hogy az ő keze alatt készíthettem a dolgozatomat és, hogy bevezetett a laboratóriumi munkába. Hálás vagyok az átadott magas szintű tudásért, lelkiismeretes és hozzáértő munkájáért, valamint idejéért, amit a szakdolgozói témavezetésembe fektetett.

Köszönet Dr. Juhász Szilviának és Dr. Réthi-Nagy Zsuzsannának, hogy rengeteg hasznos tudással láttak el, készségesen segítették a munkámat. Köszönöm, hogy bevezettek a humán sejtekkel történő munkába és hogy segítettek a projekthez szükséges kísérletek optimalizálásában.

Végül, de nem utolsó sorban, köszönöm a segítséget a Pál labor tagjainak, akik szívesen segítettek a munkám során.