

XXXI. OTDK Biológia szekció

***Candida parapsilosis* CDR1-2 drog efflux pumpa duplamutánsának fiziológiai jellemzése**

Papp Csaba Gergő
Biológia MSc szak, II. évfolyam

Szegedi Tudományegyetem

Témavezető: Dr. Gácsér Attila

2013, Szeged

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETŐ.....	3
1.1. A Candida genus és a Candida parapsilosis jelentősége.....	3
1.2. A Candida parapsilosis előfordulásai a klinikumban.....	5
1.3. Candida fajok antibiotikum rezisztencia mechanizmusai.....	10
2. CÉLKITŰZÉSEK.....	12
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	13
3.1. Anyagok.....	13
3.1.1. Felhasznált törzsek.....	13
3.1.2. Felhasznált sejtvonalak.....	13
3.1.3. Táptalajok és tápoldatok.....	13
3.1.4. Candida parapsilosis mutánsok létrehozásához használt anyagok.....	14
3.1.5. Gomba eliminációs kísérlet során felhasznált anyagok és eszközök.....	16
3.1.6. Törzsek növekedési vizsgálatához használt anyagok.....	16
3.2. Módszerek.....	17
3.2.1. Candida parapsilosis CDR1-2 duplamutánsok létrehozása során alkalmazott módszerek.....	17
3.2.2. Törzsek antimikotikum érzékenységének megállapítása.....	19
3.2.3. Makrofágok gomba eliminációs hatékonyságának meghatározása.....	19
3.2.4. Törzseink in vivo túlélésének vizsgálata A/J egerek használatával.....	20
3.1.6. Törzsek növekedésének vizsgálata a pH, oxidatív és ozmotikus stresszorok függvényében.....	20
4. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK.....	21
4.1. Candida parapsilosis CDR1-2 duplamutánsok létrehozása.....	21
4.2. C. parapsilosis vad típus és CDR1-2 duplamutáns antimikotikum érzékenysége.....	23
4.3. J774.2 egér eredetű makrofág sejtvonal gombaölési hatékonysága törzseinkkel szemben.....	24
4.3. Törzseink in vivo túlélése A/J egerekben.....	25
4.4. Mutánsok növekedése különböző környezeti stresszorok jelenlétében.....	26
5. ÖSSZEFOGLALÁS.....	29
6. IRODALOM.....	31
8. NYILATKOZAT.....	34

1. BEVEZETŐ

1.1. A *Candida* genus és a *Candida parapsilosis* jelentősége

Az 1980-as évek óta a gombák egyre nagyobb számban okoznak emberi megbetegedéseket. Ez hatványozottan igaz az immunrendszerében károsodott és kórházak intenzív osztályain fekvő betegekre (1, 2). Évről-évre egyre több gombák által okozott megbetegedés történik. Ezen megbetegedésekben főként *Candida*, *Aspergillus* és *Cryptococcus* fajok játszik a fő szerepet, ezek közül is a *Candida* nemzetség tagjai okoznak kiemelkedően magas számú megbetegedést magas halálozási aránnyal. Figyelemre méltó, hogy a *Cryptococcus* nemzetség tagjai által okozott megbetegedések száma csak 7,3 eset/millió fő/évvel marad le a *Candidák* által okozott megbetegedések számától, azonban a 12,7%-os mortalitás meg sem közelíti a *Candida* fajok 33,9%-os halálozási arányát. A *Candida* nemzetség jelentőségére utal továbbá, hogy a különböző patogén Zygomycoták által okozott megbetegedések 30%-os halálozási aránya a *Candida* fajok 33,9%-os halálozási aránya közelében van, azonban a 1,7 eset/millió fő/éves megbetegedési szám elhanyagolható a *Candidák* által okozott 72,8 eset/millió fő/éves megbetegedési számhoz képest (1. táblázat) (2).

1. táblázat: Opportunista mikózisok képviselői (2)		
Organizmus(ok)	Esetek	
	száma/millió/év	Eset/halálozás aránya (%)
Élesztők		
<i>Candida</i> fajok	72,8	33,9
<i>Cryptococcus</i> fajok	65,5	12,7
Penész gombák		
<i>Aspergillus</i> fajok	12,4	23,3
Zygomycoták	1,7	30

A különböző *Candida* fajok azonban nem mind okoznak betegségeket és a megbetegedéseket okozó fajok sem ugyanolyan gyakorisággal felelősek ezekért a fertőzésekért. Néhány évvel ezelőtt a *Candida* fertőzéssel diagnosztizált páciensek 70-80%-ából a *C. albicans* volt kimutatható. Az elmúlt két évtized során azonban más nem-*albicans* *Candida* fajok is növekvő mértékben kimutathatóak voltak a *Candidával* fertőzött betegekből. Ilyen fajok a *C. glabrata*, *C. parapsilosis* és *C. tropicalis*. Ezek közül a *C. parapsilosis* a negyedik (más felmérések szerint, második vagy harmadik) leggyakoribb okozója a candidiázisos eseteknek a *C. albicans* mögött. A *C. albicans* által okozott invazív candidiázisos (IC) esetek részaránya az összes IC esetekhez képest 1997-től 2003-

ig csökkenő tendenciát mutat, míg más nem-*albicans* fajok - mint a *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* - részaránya növekszik, ahogy azt az ARTEMIS DISK Surveillance Program adatai is mutatják (1, 3) (2. táblázat).

2. táblázat: IC esetek fajok szerinti megoszlása						
Fajok	Az összes eset %-a					
	1997-1998	1999	2000	2001	2002	2003
<i>C. albicans</i>	73,3	69,8	68,1	65,4	61,4	62,3
<i>C. glabrata</i>	11	9,7	9,5	11,1	10,7	12
<i>C. tropicalis</i>	4,6	5,3	7,2	7,5	7,4	7,5
<i>C. parapsilosis</i>	4,2	4,9	5,6	6,9	6,6	7,3
<i>C. krusei</i>	1,7	2,2	3,2	2,5	2,6	2,7
<i>C. guilliermondii</i>	0,5	0,8	0,8	0,7	1	0,8
<i>C. lusitaniae</i>	0,5	0,5	0,5	0,6	0,5	0,6
<i>C. kefyr</i>	0,2	0,4	0,5	0,4	0,4	0,5
<i>C. rugosa</i>	0,03	0,03	0,2	0,7	0,6	0,4
<i>C. famata</i>	0,08	0,2	0,5	0,2	0,4	0,3
<i>C. inconspicua</i>			0,08	0,1	0,2	0,3
<i>C. norvegensis</i>			0,08	0,1	0,07	0,1
<i>C. dubliniensis</i>			0,01	0,08	0,1	0,05
<i>C. lipolytica</i>			0,06	0,06	0,06	0,08
<i>C. zeylanoides</i>			0,03	0,08	0,02	0,04
<i>C. pelliculosa</i>				0,06	0,05	0,04
<i>Candida</i> spp.*	3,9	6	3,7	3,3	7,9	4,9
Összes eset	22533	20998	11698	21804	24680	33002
* eltérő eredménnyel azonosított <i>Candida</i> fajok						

A *C. parapsilosis* nem obligát humán patogén, és nem csak kizárólag emberi bőrfelületről izolálható, hanem például házi állatokról, rovarokról, talajból, sőt még tengeri környezetből is. A *C. parapsilosis* normális esetben kommenzalista, az egészséges humán mikrobiális flóra része és kézzel az egyik legnagyobb gyakorisággal izolálható gomba.

Amíg a *C. albicans* és a *C. tropicalis* által okozott invazív megbetegedések korai kolonizáció továbbterjedéséből alakulnak ki és e gombák transzmissziója vertikálisan történik - például anyáról gyermekre a születés körüli időszakban -, addig a *C. parapsilosis*-nak nincs szüksége korai kolonizálódásra és a transzmissziója is főként horizontálisan történik fertőzött felületekről, mint pl. egészségügyben használatos eszközökről vagy folyadékokból, illetve egészségügyi dolgozók kezéről, művégtagokról és katéterekről. Ez a fő oka annak, hogy a *C. parapsilosis* által okozott invazív megbetegedések főként immunológiailag legyengült személyek (AIDS-ben szenvedő betegek, leukémiás betegek, kemoterápiás kezelésben részesülő páciensek, stb.), kórházak intenzív osztályán fekvő betegek – különösen, központi vénás katéterrel ellátottak – és alacsony születési súlyú újszülöttek körében figyelhetők meg (2). A legfőbb vektorok az egészségügyi dolgozók, akiknek a kezén nagy gyakorisággal fordul elő a *C. parapsilosis*, mint az egészséges bőr normális mikrobiótája. Több tanulmány is rámutat arra, hogy a *C. parapsilosis* az egészségügyben dolgozók kezéről legnagyobb gyakorisággal izolálható élesztőgomba. Egy 2005-ben készült publikáció szerint Brazíliában a Pranái Egyetemi Kórházban 21 NICU dolgozóból 13 alkalmazott volt pozitív valamilyen élesztőre, amiből 7 pozitív volt *C. parapsilosis*-ra (4). Ezek a kockázati tényezők okozzák, hogy a nosocomiális betegségek jelentős részéért a *C. parapsilosis* tehető felelőssé.

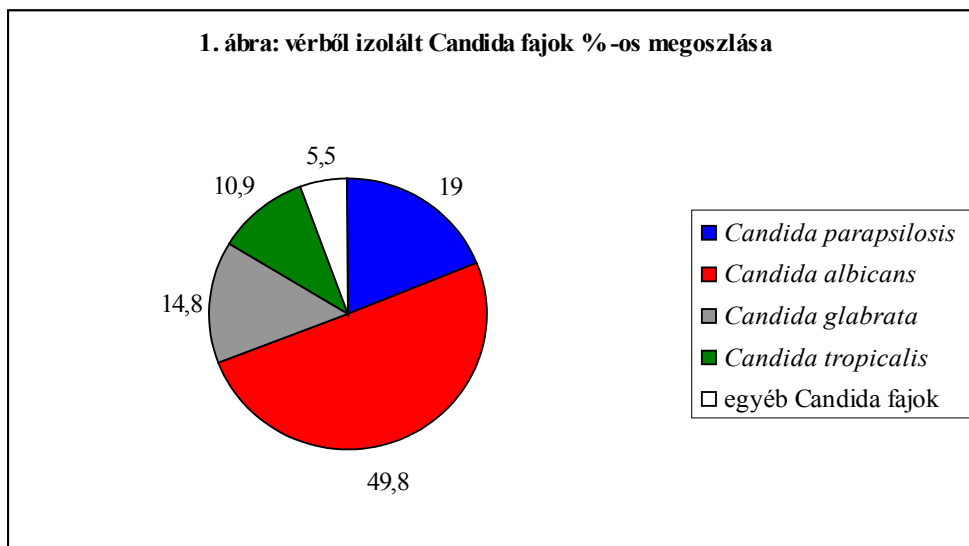
1.2. A *Candida parapsilosis* előfordulásai a klinikumban

A *C. parapsilosis* opportunistá patogén, ami többféle megbetegedésért felelős a szájpenésztől kezdve az invazív betegségekig – mint a fungémia, endocarditis, peritonitis, meningitis, arthritis – melyek mindegyike előfordul valamilyen mélyebb beavatkozáshoz és mesterséges szervpótló eszközök használatához kötődően.

Fungémia

A *C. parapsilosis* egyes felmérések szerint a második leggyakrabban vérből izolálható *Candida* faj a *C. albicans* után. A *C. parapsilosis* okozta fungémia szövet burjánzáshoz vezethet, aminek következtében mélyebben fekvő fertőzések alakulhatnak ki

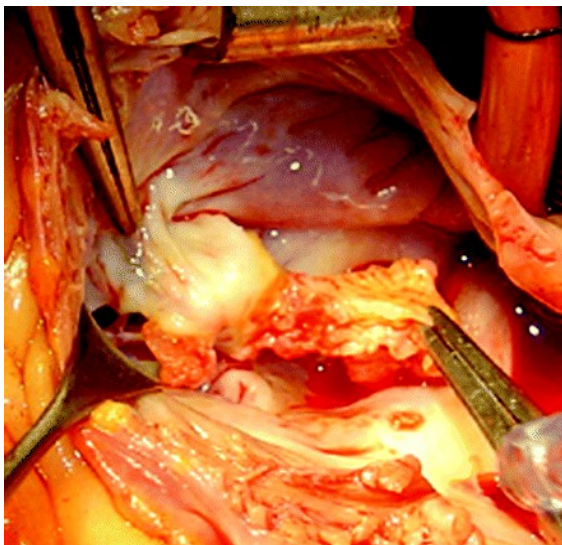
és halálozási rátája 4 és 45% között mozoghat. A fungémiás megbetegedések kitörése fertőzött források több páciens általi használatához köthető. Korai tanulmányok a *C. parapsilosis* fertőzéseket fertőzött albumin és intravascularis vérnyomásmérők használatából eredeztetik. Fontos kockázati tényező a keresztfertőzés egészségügyi dolgozók és a páciensek érintkezése során, ez az oka a legtöbb kitörő nosocomialis fertőzésnek (2) (1. ábra).



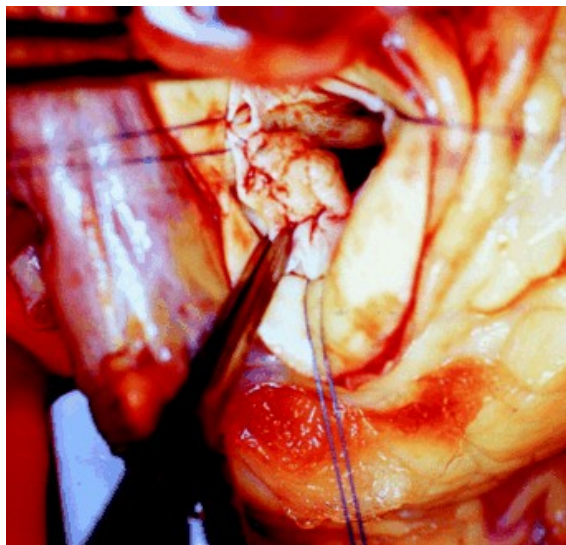
Endocarditis (szívbelhártya gyulladás)

A gombák által okozott endocarditis 1,3-6% át jelenti az összes fertőzés okozta endocarditisnek. Ezeknek az eseteknek 94,1%-áért valamilyen *Candida* faj tehető felelőssé, melyek közül a *C. parapsilosis* 17%-os részarányával a második leggyakoribb ágens a *C. albicans* mögött. Jelenleg a leginkább hajlamosító tényezők a *C. parapsilosis* okozta endocarditisre jelentőségük sorrendjében: mesterséges szívbillentyű beültetése (57,4%), intravénás droghasználat (20%), vénán keresztüli mesterséges táplálás (6,9%), abdominális sebészeti beavatkozás (6,9%), immunszuppresszáltság (6,4%), széles-spektrumú antibiotikum kezelés (5,6%), és korábbi szívbillentyű betegségek (4,8%) (5) (2. ábra: 1. kép). A szív szöveteinek legnagyobb gyakorisággal fertőződő része az aorta félhold alakú billentyű (56,9%) (6) (2. ábra: 2. kép), ezt követi a bal pitvart a bal kamrától elválasztó kéthegyű billentyű vagy mitrális billentyű (29,1%) (6), majd a jobb pitvart a

jobb kamrától elválasztó háromhegyű billentyű (4,1%) (5) (2. ábra: 1. kép), a kamrafala (2,8%) és a tüdőverőér billentyűi (1,4%) (2, 3).



1. kép



2. kép

2. ábra: a háromhegyű billentyűt (1. kép) (5) és az aorta billentyűjét (2. kép) (6) érintő *C. parapsilosis* vegetáció

Meningitis (agyhártyagyulladás)

A központi idegrendszer gombák általi fertőzése életveszélyes kockázatot jelent. A meningitises megbetegedések kialakítására számos gomba képes. A betegség tünetei közé sorolható a fejfájás, a fényérzékenység, a nyakszirti izmok rigiditása, láz és delírium.

A *Candida* fajok kimondottan akut neutrofil meningitist okoznak. Több invazív candidiasisban elhunyt felnőtt beteg boncolási tanulmánya rámutatott, hogy e betegeknek csak kevesebb, mint 15%-a volt érintett valamilyen *Candida* faj által okozott meningeális megbetegedésben. Másrészt, kimutatott, hogy az invazív candidiasisban elhunyt csecsemők 64% érintett volt központi idegrendszeri fertőzésben. A *C. parapsilosis* okozta meningitis nem túl gyakori jelenség: a *Candida* fajok által okozott meningitises megbetegedések 1966 és 1994 közt 116 esetben voltak a *C. albicans*nak tulajdoníthatók, ami az esetek 90,1%-át jelenti, mindaddig a *C. parapsilosis* okozta meningitis csak 2 esetben fordult elő, ami pedig csak 1,6%-ot jelent (2).

Peritonitis (hashártya gyulladás)

A gombák okozta peritonitises megbetegedések száma igen magas, a halálozási rátája eléri a 44%-ot. Ezek a megbetegedések 3-10%-ban, olyan pácienseknél fordulnak elő, akik végső-stádiumú vesebetegségük miatt folyamatos ambuláns hasüregi dialízisben (continuous ambulatory peritoneal dialysis, továbbiakban CAPD) részesülnek (2). A *C. parapsilosis* mára uralkodó patogén ágensé vált a gombák okozta peritoneális fertőzések körében. E faj képes arra, hogy magas glükóz koncentrációjú közegben könnyedén megtapadjon különböző mesterséges felületeken, mint például a műanyag katéterek felületén. Éppen ezért a dializáló folyadék magas glükóz tartalma és a hasüregi katéter behelyezése miatt a legelterjedtebb peritonitist okozó gomba azoknak a körében, akik CAPD kezelést kapnak (3). A leglényegesebb hajlamosító tényező az, ha a beteg korábban bakteriális peritonitisben szenvedett és ezt antibiotikumokkal kezelték, ami feltételezések szerint a gomba túlnövekedéséhez vezet. *C. parapsilosis* fertőzésből eredő peritonitishez köthető tünetek a zavaros dializátum, hasi fájdalom, láz és bélelzáródás (2).

A *C. parapsilosis* okozta peritonitis jóval gyakrabban okoz komplikációkat, mint bármelyik más peritonitist okozó *Candida* faj, ugyanis tályogképződést von maga után, és még a hasüregi katéter eltávolítása után is hashártya gyulladást okoz (2). A komplikációk kockázata még magasabb, ha a beteg *C. parapsilosis* okozta hashártya gyulladás mellett monoterápiás flukonazol kezelésben részesül, mintha a gyulladást más *Candida* faj okozná az előbb említett antifungális kezelés mellett. Ilyen esetekben fokozottan intenzív szisztémás antifungális kezelés szükséges (2, 3).

Arthritis (izületi gyulladás)

A gombák az izületi gyulladásoknak nem gyakori okozói, a mégis előforduló esetek legtöbbszörében azonban a *Candida* genus valamely tagja a kiváltó ágens. Az esetek többsége az izület direkt inokulációja miatt következik be, kiváltképpen idősebb ápolotknál. Ennek ellenére, ritkábban az is előfordul, hogy szétterjedő candidiasis szövődményeként alakul ki az izületi gyulladás, ez főként immunszuppresszált egyénekre jellemző. Sajnos esetükben a betegség lefolyásának prognózisa rosszabb, mint azon betegekben, ahol az arthritis kialakulása direkt inokuláció miatt következett be.

Az esetek többsége olyan izületi területeken detektálható, ahol mesterséges izületet helyeztek el vagy ahol valamilyen beavatkozást végeztek izületi panaszok miatt (2, 7) (3. ábra).



3. ábra: MRI-felvétel egy *C. parapsilosis* arthritisen szenvedő egyén jobb térdéről (7)

Endophthalmitis és keratitis (belső szem- és szaruhártya-gyulladás)

A *C. parapsilosis* miatti endophthalmitis főként műtét utáni fertőzésekkel adódóan alakul ki. Bizonyos esetekben cataract eltávolítás után, lencse beültetését követően és kortikoszteroid tartalmú szemcsepp használata során alakul ki endophthalmitis. *C. parapsilosis* okozta endophthalmitis az ötödik leggyakoribb gomba okozta endophthalmitis megbetegedés, a *C. parapsilosis* a *Candidák* okozta endophthalmitises esetek 21%-áért felelős (2, 3).

Candida fertőzésekben érintett keratitises megbetegedések igen ritkák (3). Tünete a szem vörössége, fényérzékenység, fájdalom, csökkenő látásélesség, sárgás-fehéres szivárgás és szemszárazság (2).

Vulvovaginitis (hüvelygyulladás)

A nyálkahártyák *C. parapsilosis* általi fertőzése elsősorban a hüvelyre jellemző. A *Candidák* okozta vaginitisben érintettek 80-90%-a *C. albicans* által fertőződött személy (2, 3). Annak ellenére, hogy növekvő tendencia figyelhető meg a *C. parapsilosis* okozta vaginitis esetek számában, ezek száma jelenleg nem túl magas (3). A *C. parapsilosis* olyan

tünetekért felelős, mint a viszketés, égető érzet és vaginális folyás, azonban bizonyos esetekben nem jelentkeznek tünetek.

Húgyúti fertőzések

Candida fajok okozta húgyúti fertőzések előfordulási gyakorisága igen változó. Például 6281 patogén mikroba törzset izoláltak kórházban ápoltakból az olaszországi Bresciában 2002 és 2005 között, azonban ebből csak 56 (0,9%) volt valamilyen *Candida* faj. Más tanulmányok viszont egészen más eredményekről számolnak be: a betegek húgyúti fertőzései közt 15-20%-os gyakorisággal fordult elő valamely *Candida* faj.

Fontos megjegyezni, hogy a húgyutakat érintő fertőzések nem okoznak szétterjedő betegségeket, hanem inkább az alsóbb húgyutakban képeznek kolóniát.

A *C. parapsilosis* igen kis gyakorisággal okoz húgyúti fertőzéseket, az esetek számában a *C. albicans*, *C. tropicalis* és a *C. pseudotropicalis* mögé szorul (2, 3).

1.3. *Candida* fajok antibiotikum rezisztencia mechanizmusai

*Candidiasis*sal kapcsolatos megbetegedésekben általánosan alkalmazott kezelési módszer azolok (pl.: flukonazol, ketokonazol, itrakonazol, voriconazol), echinokandinok (pl.: caspofungin), valamint súlyosabb esetekben amphotericin B használata.

Napjainkban egyre általánosabb jelenség a *Candida* fajok rezisztenciája a flukonazolra, de gyakran azonosítanak caspofungin és amphotericin B rezisztens törzseket is humán megbetegedésekből.

A kialakuló drog-rezisztenciának több lehetséges mechanizmusa is ismert. Egyik ilyen az antifungális szer célpont enzimjének génjében létrejövő pontmutáció, mely révén az adott enzim csökkent érzékenységet mutat a droggal szemben. Hasonlóan a célenzimmel kapcsolatos, rezisztencia kialakulásáért felelős mechanizmus, amikor az adott fehérje expressziója olyan mértékben megnövekszik, hogy a gomba sejtbe bejutott antimikotikum mennyisége nem képes gátolni az enzim működését. Ezekből némileg eltérő, rezisztenciát okozó esemény a különböző efflux pumpák megjelenése a gomba sejt membránjában. Ilyen transzporter fehérjék közé tartoznak az ATP-kötő kazetta (ATP-binding cassette, ABC) motívummal rendelkező transzmembrán fehérjék, valamint a fő facilitátor szupercsalád (major facilitator superfamily, MFS) bizonyos tagjai. Mind az ABC-transzporterek és az MFS-transzporterek széles szubsztrát specifitással rendelkeznek, így felelősek lehetnek akár multidrog rezisztencia kialakulásáért is. Az ABC-

transzporterek működéséhez ATP kötése és hidrolízise szükséges, az MFS-fehérjék ellenben nem igényelnek ATP-t szubsztrátjaik transzportjához. Ezen transzporterek működésének pontos biokémiai mechanizmusa eleddig ismeretlen (8).

*Candida albicans*ban a legfontosabb drog effluxért felelős ABC-transzportereket kódoló candida drog rezisztencia (candida drug resistance, CDR) 1- és 2 géneket több esetben is azonosították, mint azol és amphotericin B rezisztenciáért felelős géneket. CaCDR1 és CaCDR2 génekkel homológ géneket nem-*Candida albicans* *Candida* (NCAC) fajokban is azonosítottak, például a CgCDR1-2 gének *C. glabrataban* szintén hozzájárulnak flukonazol rezisztencia, valamint csökkent echinokandin érzékenység kialakulásához. *Candida parapsilosis*ban a CPAG_05103, CPAG_05104 Broad számmal ellátott gének (továbbiakban: CpCDR1 és CpCDR2) tartalmazznak CDR-domaineket. Azonban amíg *C. albicans*ban és *C. glabrataban* a CDR-transzporterek szerepe jól ismert, addig *C. parapsilosis*ban a CpCDR1-2 génről képződő transzporterek jelentősége nem tisztázott (9, 10).

2. CÉLKITŰZÉSEK

A CDR gének szerepe *Candida albicans*ban, *C. glabrata*ban és több más *Candida* fajban jól ismert. *C. parapsilosis* genomjában is találhatók olyan gének, melyek CDR-domainokat kódolnak, azonban a CDR-transzporterek szerepe jóval kevésbé tisztázott *C. parapsilosis*ban, mint a korábban említett fajokban. A *C. parapsilosis*ban a CDR-gének közül a CPAG_05103, CPAG_05104 számúak egymással szomszédosak és a DNS negatív szálán találhatóak, e két gént *CpCDR1*- és *CpCDR2*-ként említjük a továbbiakban.

Munkánk során célul tűztük ki:

1. *CpCDR1* és *CpCDR2* homozigóta duplamutáns létrehozását *Candida parapsilosis* GA1-es törzséből kiindulva.
2. A létrehozott *CpCDR1-2* duplamutáns érzékenységeinek meghatározása flukonazol, caspofungin és amphotericin B antifungális szerekre.
3. J774.2 monocita sejtvonal gombaölési hatékonyságának vizsgálata a duplamutánssal szemben. Valamint a duplamutáns túlélőképességének ellenőrzése *in vivo* kísérletben A/J egerek használatával.
4. A mutáns törzs stressz toleranciájának elemzése különböző oxidatív és ozmotikus stresszorok használatával.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Anyagok

3.1.1. Felhasznált törzsek

1 táblázat: Használt és általunk létrehozott <i>C. parapsilosis</i> törzsek		
Törzs	Genotípus	Referencia
WT GA1	<i>CpCDR1-CpCDR2/ CpCDR1-CpCDR2</i>	11
He ^R	<i>CpCDR1-CpCDR2/Δcpcdr1-Δcpcdr2::SAT1-FLIP</i>	jelen dolgozat
He ^S	<i>CpCDR1-CpCDR2/ Δcpcdr1-Δcpcdr2::FRT</i>	jelen dolgozat
Ko ^R	<i>Δcpcdr1-Δcpcdr2/ Δcpcdr1-Δcpcdr2::SAT1-FLIP</i>	jelen dolgozat
Ko ^S	<i>Δcpcdr1-Δcpcdr2/ Δcpcdr1-Δcpcdr2::FRT</i>	jelen dolgozat

3.1.2. Felhasznált sejtvonalak

J774.2 makrofág sejtvonal

Ezt a rágszáló sejtvonalat nőstény *BALB/c* gentoípusú egér tumoros sejtcsoportjából izolálták. Ezeket az egereket monoklonális antitestek termeltetésére használják. Érdekeségük, hogy életük késői szakaszában hajlamosak tumorok képzésére (<http://en.wikipedia.org/wiki/BALB/c>), az egyik ilyen tumorból izolálták a szóban forgó sejtvonalat. Tenyésztésének sajátossága, hogy szaporítása során a tenyésztőedény aljához tapad.

3.1.3. Táptalajok és tápoldatok

YPD tápoldat

Összetétel 100 ml YPD-re:

1 g glükóz (Spektrum 3D)

1 g pepton (Reanal Rt.)

0,5 g élesztő kivonat (Diagnostica MERCK)

1 ml penicillin-sztreptomicin („penstrep”) oldat (10000 unit penicillin és 10 mg sztreptomicin/ ml 0,9 % NaCl-oldatban, Sigma-Aldrich, Németország)

YPD táptalaj

Összetétel 100 ml YPD-re:

1 g glükóz (Spektrum 3D)

1 g pepton (Reanal Rt.)

0,5 g élesztő kivonat (Diagnostica MERCK)

2,5 g agar

1 ml penicillin-sztreptomycin („penstrep”) oldat (10000 unit penicillin és 10 mg sztreptomycin/ ml 0,9 % NaCl-oldatban, Sigma-Aldrich, Németország)

J774.2 makrofág sejtek tenyésztése: DMEM / FBS / penstrep médiumban.

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Lonza, UK, Cat. N°: BE12-604F)

10 v/v% sterilre szűrt és hőinaktivált FBS (Fetal Bovine Serum, Lonza, UK)

1 v/v% penstrep

3.1.4. *Candida parapsilosis* mutánsok létrehozásához használt anyagok

Lízis puffer (totál DNS izolálás)

1%(w/v) SDS

50 mM EDTA

100 mM Tris (pH8)

TE oldat (transzformálás)

10 mM Tris-HCL

1 mM EDTA

pH 7,5

TE-lítium acetát esetén +0,1 M lítium acetát

Southern-blot

Denaturáló oldat 500 ml-re nézve

10 g NaOH

43,8 g NaCl

Neutralizációs oldat 500 ml-re

125 ml 2M Tris (pH7,5)

43,5 g NaCl

1 ml 0,5M EDTA (pH8)

20x SSC oldat 1 l-re számolva

88,23 g Na-citrát (0,3 M-os oldat)

175,32 g NaCl (3 M-os oldat)

Hibridizációs puffer

5x SSC

0,1% N-lauryl-sarcosine

0,02% SDS

1% Blocking reagens

1. mosó 50 ml-re nézve

5 ml 20x SSC

0,5 ml 10% SDS

2. mosó 50 ml-re nézve

2,5 ml 20x-os2-es mosó oldat

10x-es 1-es puffer

0,1 M maleinsav

0,15 M NaCl

pH 7,5

2-es puffer

1% blocking reagens 1x 1. pufferben oldva

3. puffer

0,1 M Tris-HCl

0,1 M NaCl

50 mM MgCl₂

3.1.5. Gomba eliminációs kísérlet során felhasznált anyagok és eszközök

A J774.2 makrofágok tenyésztéséhez használt tápoldatok: DMEM. (összetétel: ld. feljebb)

PBS 1 liter 10X-es töménységű oldatra:

80 g NaCl

2 g KCl

14,4 g Na₂HPO₄

2,4 g KH₂PO₄

3.1.6. Törzsek növekedési vizsgálatához használt anyagok

Növekedés pH-függvényében

YPD táptalaj pH8 20 ml (McIlvaine szerint):

0,2 g glükóz

0,2 g pepton

0,1 g élesztő kivonat

0,5 g agar

19,45 ml Na₂HPO₄

0,55 ml citromsav

(200 µl Penstrep)

A továbbiakban a McIlvaine puffer összetevői változnak:

pH 7

16,47 ml Na₂HPO₄

3,53 ml citromsav

pH 6

12,63 ml Na₂HPO₄

7,37 ml citromsav

pH 5

10,3 ml Na₂HPO₄

9,70 ml citromsav

pH4

7,71 ml Na₂HPO₄

12,29 ml citromsav

(+0,5% agar)

Növekedés H₂O₂/NaCl/KCl jelenlétében

YPD táptalaj 20 ml:

0,2 g glükóz

0,2 g pepton

0,1 g élesztő kivonat

0,5 g agar

+ 10 mM H₂O₂ / 20 mM H₂O₂ / 1,5 M NaCl / 2 M NaCl / 1,5 M KCl / 2 M KCl

3.2. Módszerek

3.2.1. *Candida parapsilosis* CDR1-2 duplamutánsok létrehozása során alkalmazott módszerek

Totál DNS izolálás

A 2 ml-es tenyészet 5 perces centrifugálása (5000 rpm) után kapott pelletet 500 µl lízis pufferben felszuszpendáljuk, majd az Eppendorf-csövet üveggyönggyel 1ml-ig feltöltjük. Három perc automatikus vortexet követően, az így kapott szuszpenzióhoz további 275 µl 7 M NH₄-acetátot adunk, majd a sejtek hőkezelése után (65°C, 5 perc) azokat 5 percig jégen tároljuk.

A jeges kezelés leteltével 500 µl kloroform-izoamilalkoholt adunk az elegyhez, vortexelünk, majd centrifugálunk (10 perc, 13000 rpm). Az így kapott felső vizes fázist másik Eppendorfcsőben összegyűjtjük, 500 µl izopropanolt adunk hozzá és jégen állni hagyjuk. A jeges kezelés után újabb centrifugálás következik (10 perc, 13000 rpm), majd 70%-os alkohollal mossuk az elegyet. Ennek centrifugálása után a pelletet beszárítjuk, majd 100 µl RNázos bidesztilláltvízben felvesszük, és ellenőrzésként 1 µl-t 0,8%-os agaróz gélen futtatunk.

Transzformálás

C. parapsilosis sejteket 50 ml YPD folyadéktenyészetben 30°C-on overnight tenyésztünk. Centrifugálással összegyűjtjük (3000 g, 5 perc) őket, majd TE oldatban 1x

mossuk. A sejtpelletet 30 ml TE-lítium acetát oldatban szuszpendáljuk, és 45 percig 30°C-on rázatjuk. A tenyészethez ezután 750 µl 1M DTT-t adunk, majd további 15 percig 30°C-on rázatjuk. Az inkubálás után steril vizet adunk a tenyészethez, és a szuszpenzió centrifugálása után a pelletet jéghideg vízzel 2x mossuk. A második jéghideg vizes mosás után a sejteket 1M-os szorbitol oldattal 1x mossuk, majd a maradék felülúszóban a sejteket felsuszpendáljuk, és felhasználásig jégen tartjuk. Elektroporálás során 40 µl kompetens sejtet Eppendorf-csőben a transzformálandó DNS fragmentummal összekeverünk (1-5 µg DNS), majd előhűtött küvettába pipetázunk. (Az elektroporáció paraméterei: 1,5 KV, 25 mikroF, 200 ohm). Az elektroporáció után a küvettákat jégre tesszük, majd a sejtekhez jéghideg YPD 1M szorbitol tápoldatot adunk. A sejteket jégen állni hagyjuk, majd YPD 1M szorbitolt tartalmazó csőben 3 órán át 30°C-on inkubáljuk. Az inkubálás után a sejteket szelektív táptalajra szélesztjük, és 30°C-on inkubáljuk.

Southern-blot

A 4 napos eljárás során számunkra lényeges specifikus DNS szakaszokat mutatunk ki.

Az 1. napon totál DNS izolálását követően összemérjük a blottoláshoz szükséges emésztési reakciót, ami tartalmazza a DNS-t, puffert (Tango puffer, Fermentas), szükséges specifikus enzim mennyiségeket, valamint steril desztillált vizet. Az emésztési reakció összeállítása után 1 napon keresztül 30°C-on inkubálunk.

A 2. napon az emésztett DNS-t kell kicsapnunk. Izopropanolos kezelés után az oldatot centrifugáljuk (10 perc, 13000 rpm). Ezt követi a 70%-os alkoholos mosás, újabb centrifugálással (10 perc, 13000 rpm). A pelletet beszárítjuk, steril desztillált vízben felvesszük, majd 0,8%-os agaróz gélen futtatjuk. Futtatás után a gél 10 percre etídium-bromidot tartalmazó edénybe tesszük, majd fotózást követően denaturáló oldatba rakjuk és 30 percig rázatjuk. A DNS denaturációt követően a gél 2x 20 percre neutralizációs oldatba visszük. A pH visszaállítása után blottoló edényben összeállítjuk a blottoló piramist. A kapilláris blottolást overnight végezzük.

A 3. napon, a blottoló piramis szétszedését követően a Hybond N filteren lévő DNS fragmentumokat UV-fény segítségével rögzítjük, majd hibridizációs csőbe tesszük, és hibridizációs pufferrel 1 órán keresztül 65°C-on hibridizációs sütőben forgatva inkubáljuk. A jelölt próba hozzáadása után a hibridizációs csövet ismét a hibridizációs sütőbe helyezzük 65°C-ra és egy éjszakán keresztül inkubáljuk.

A detektálást a 4. napon kezdjük meg. A csőben lévő jelölt anyagot leöntjük, majd a filtert 2x5 percig az 1. mosó oldatban szobahőmérsékleten mossuk, amit 2x15 perc 2. mosót tartalmazó oldatos mosás követ 65°C-on. A többi lépés ismét szobahőmérsékleten zajlik. A 2. mosóval történő átmosás után 1. és 2. pufferrel történik az átöblítés. Ezeket követően a filterre 2. puffer+ antitest konjugátumot tartalmazó oldatot öntünk, és 30 percen át sütőben inkubálunk, majd 2x15 percig szobahőmérsékleten sütőben forgatva 1. pufferben inkubáljuk a filtert. Az 1. puffert 3-ra cseréljük, és 1 percig forgatjuk, végül pedig a filtert zacskóba helyezzük és hozzáadjuk az előzőleg összemért 3. puffer + 200 µl color substrate keveréket. A filtert sötét helyen tároljuk a detektálható jelek megjelenéséig.

3.2.2. Törzsek antimikotikum érzékenységének megállapítása

A vad típusú valamint a *CDRI-2* mutáns törzsek antibiotikum érzékenységének megállapítása Broth-mikrodilúciós módszerrel történt a National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) M27-A harmadik kiadású protokolljának megfelelően (16).

3.2.3. Makrofágok gomba eliminációs hatékonyságának meghatározása

A killing vizsgálat során ismert számú gazdasejtet fertőzünk ismert számú (5x több) mikrobával. Kontrollként a fertőzéshez használt mennyiségű mikrobával oltunk be gazdasejtet nem tartalmazó, a gazdasejt tenyésztéséhez használt tápoldatot. A makrofágokat tartalmazó és a kontroll tenyészetekben ugyanakkora térfogatú, és ugyanolyan típusú tápoldatot használunk.

A gazdasejtek fertőzése után 3 órával a letapadt sejteket sejtkaparó segítségével felkapartuk, majd injekciós tű és fecskendő segítségével a tenyésztőedény mintahelyeiben lévő tápoldat-sejt szuszpenziót többszöri átszívással kezeltük, hogy az összetapadt gomba sejtek, valamint a makrofágok által fagocitált de még élő sejtek kiszabaduljanak. Az így kezelt szuszpenziót hígítottuk (150 telep/csésze), majd YPD-Penstrep táptalajra szélesztettük. 2 nap múlva a megjelenő telepet megszámláltuk. Kísérleteinket 3 párhuzamosban végeztük.

A fagocitózis hatásfokát (százalékát) a következő képlet alapján számoltuk ki: a fagocitált *Candida* sejtek számát (*Candida* telepek átlagos száma a kontrollban – *Candida* telepek átlagos száma a gazda sejtekkel ko-kultúrában) elosztjuk az összes *Candida* sejtek számával (*Candida* telepek átlagos száma a kontrollban).

3.2.4. Törzseink *in vivo* túlélésének vizsgálata A/J egerek használatával

A kísérlethez 6-8 hetes A/J egereket fertőztünk 3×10^7 vad típusú vagy mutáns sejttel 100 μ l PBS-ben. Az egereket 2-4 nappal a fertőzést követően feláldoztuk és a máj, vesék és lép homogenizálásából származó szuszpenziót YPD táptalajra kiszélesztve meghatároztuk a különböző törzseink telepeinek számát, melyből a túlélőképességre következtethettünk.

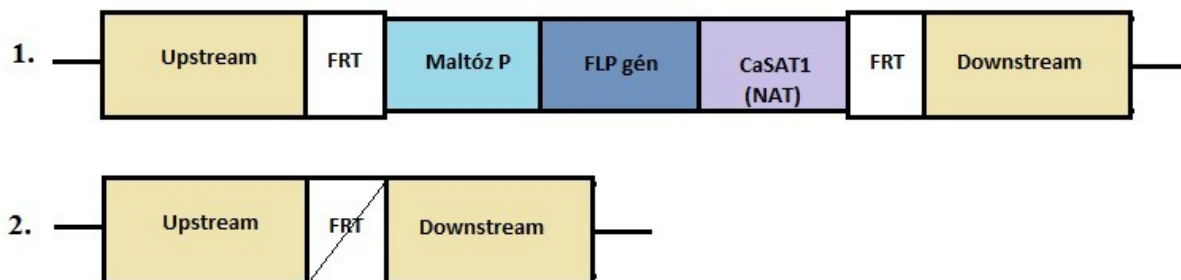
3.1.6. Törzsek növekedésének vizsgálata a pH, oxidatív és ozmotikus stresszorok függvényében

A törzseinkből 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 sejt/ml szuszpenziókat készítettünk. Majd az így kapott szuszpenziókból 10-10 μ l-t cseppentettünk a különböző pH-jú és a különböző koncentrációjú H_2O_2 -t, NaCl-t vagy KCl-t tartalmazó YPD-csészéinkre, melyeket az „Anyagok” résznél leírtaknak megfelelően készítettünk el. A csészék beszáradása után a lemezeket 30°C-on valamint 37°C-on inkubáltuk 48 órán keresztül.

4. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

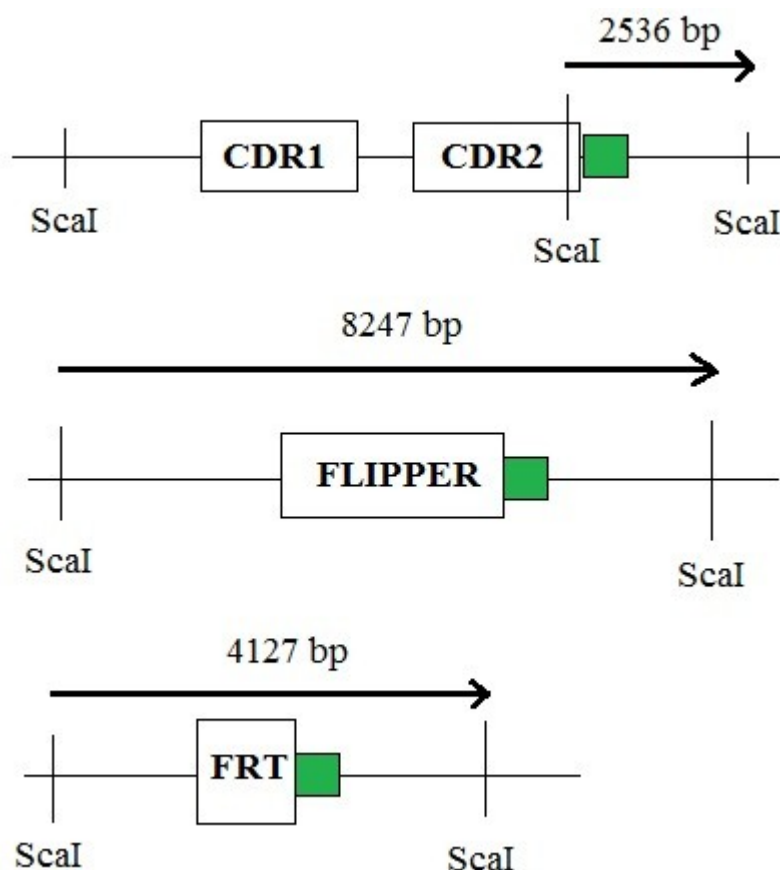
4.1. *Candida parapsilosis* CDR1-2 duplamutánsok létrehozása

A Cdr1p-t és Cdr2p-t kódoló gének a CPAG_05103, CPAG_05104 egymás mellett helyezkednek el a genomban, így egy lépésben megoldható a *CDR1-2* heterozigóta és homozigóta duplamutáns létrehozása. A deléciós konstrukció alapja a pSFS2 plazmid, ami tartalmazza a targetált gén upstream és downstream szekvenciáját, valamint a flipper (FLP) kazettát (4. ábra). Ezt a konstrukciót kihalásztuk a plazmidból, majd elektroporációval a gombasejtekbe transzformáljuk, és NAT rezisztenciára szelektáljuk a transzformánsokat (a flipper kazetta tartalmazza a NAT rezisztenciáért felelős *CaSAT1* gént). A transzformánsokat „Master Plate”-re gyűjtjük, majd folyadékban tenyésztjük, totál DNS-t izolálunk, restriktációs emésztést végzünk és Southern blot hibridizációval ellenőrizzük a kazetta cél-lókuszbba történő beépülését, valamint az esetleges ektopikus integrációk bekövetkeztét. A megfelelő, egykópiás lókuszingegrációt hordozó és ektopikus integrációktól mentes transzformánsokat maltózt tartalmazó minimál tápoldatban 1 napig tenyésztjük, így a maltóz promóter által indukált FLP kazetta kiugrása lehetővé válik. A folyamatot az *FLP* helyspecifikus rekombinááz irányítja, amely a kazetta részét képező *FRT* (flanking recognition target) szekvenciákat ismeri fel és ezek mentén valósítja meg a rekombinációt. A tenyésztést követően sejtszámlálás után 200-200 sejtet szélesztünk permisszív koncentrációjú NAT tartalmú YPD táptalajra, hogy lehetőségünk legyen NAT szenzitív telepek izolálására. A szenzitív telepeket „Master Plate”-re gyűjtjük, majd Southern hibridizációval ellenőrizzük a szenzitív törzsekben az FLP kazetta kiugrását a genomból. Mivel a *C. parapsilosis* genom diploid, az így létrehozott mutánsok csak heterozigóták, ezért további transzformálások, szelektálások és ellenőrzések szükségesek a homozigóta mutáns létrehozásához.



4. ábra: Az ábrán a transzformáló flipper kazetta felépítése látható 1. indukálható maltóz promóter, flippáz (*FLP*) illetve, NAT rezisztenciát meghatározó gén *CaSAT1* és FRT szekvenciákkal, 2. valamint azok nélkül.

A flipper kazetta, a sejtekbe történő transzformációt követően, a homológ régiók segítségével integrálódik a gazda sejtek genomjába. Az így kapott transzformánsokból a kazetta a következőképpen kerül kivágódásra az ugrasztás során: maltóz jelenlétében a Flipper kazettában jelen lévő maltóz promóter indukálódik, aminek következtében a flippáz enzimet kódoló gén aktiválódik, és az FRT szekvenciák hasításra kerülnek. Ezáltal a gazdasejt genomjából a kazetta kirekombinálódik, ellenben az FRT régiók hasítása során megmaradt szekvencia részletek visszamaradnak (fragmentum méretbeli különbségek ld. 5. ábra).



5. ábra: *C. parapsilosis* wt, *CDR1-2* gének helyére beépült flipper kazetta, és a *CDR1-2* deléciós mutáns *ScaI*-es hasítását követő fragmentum méreteit mutatja. Zöld négyzet: Downstream jelölt próba

A *CDR1-2* gének helyére beépült flipper kazettát tartalmazó sejtek genomias DNS-ének *ScaI*-es emésztését követően a három emésztési hely közül az egyik eltűnik, ennek következtében jelentősen nagyobb fragmentum méretet kapunk, míg ugrasztás során a nem teljes kirekombinálódás következtében genomban maradt FRT miatt változik a fragmentum hossz az eredetihez képest.

4.2. *C. parapsilosis* vad típus és *CDR1-2* duplamutáns antimikotikum érzékenysége

A *C. parapsilosis* fertőzések kezelése leggyakrabban azol vagy echinokandin típusú antimikotikumokkal, bizonyos súlyosabb esetekben amphotericin B-vel történik. Munkánk során a mutáns törzsek létrehozása után, először meghatároztuk törzseink MIC (minimal inhibitory concentration) értékeit flukonazolra, caspofunginra és amphotericin B-re. Eredményinket a 6. ábrán található táblázatokban foglaltam össze.

Flukonazol (µg/ml)			AmphotericinB (µg/ml)		
Törzs	24h	48h	Törzs	24h	48h
ATCC22019	1	2	ATCC22019	0,5	0,5
ATCC6258	16	32	ATCC6258	1	1
WT	0.5 (S)	0.5 (S)	WT	0,25	0,25
CDR1-2KO	0.25 (S)	0.25 (S)	CDR1-2KO	0.25	0.25
CDR1-2 He/S	0.5 (S)	0.5 (S)	CDR1-2 He/S	0.25	0.25

Caspofungin (µg/ml)

Törzs	24h	48h
ATCC22019	1	4
ATCC6258	1	1
WT	4 (NS)	4 (NS)
CDR1-2KO	2 (S)	2 (S)
CDR1-2 He/S	4 (NS)	4 (NS)

6. ábra: *C. parapsilosis* vad típus, heterozigóta mutáns és *CDR1-2* deléciós törzsek, valamint a referencia törzsek antimikotikum érzékenysége

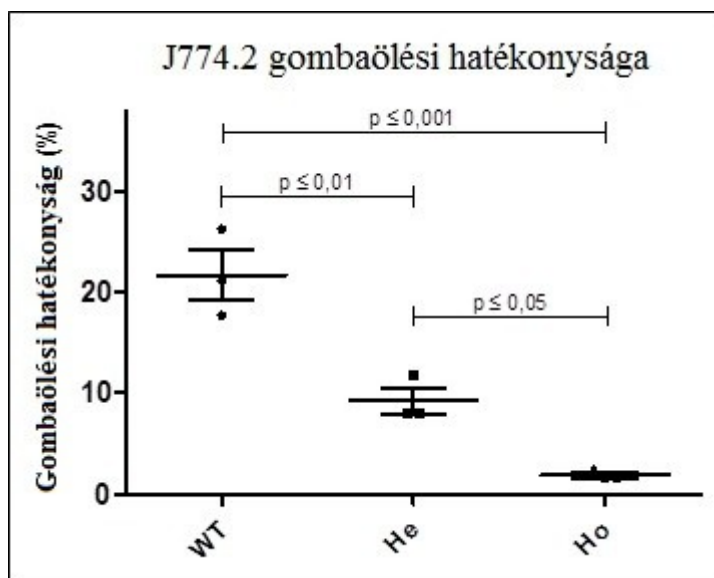
Az amphotericin B mind a 3 vizsgált törzsünkre egyforma mértékben hatott (0,25 µg/ml). Míg a flukonazol és a caspofungin esetében a vad típus és a heterozigóta mutáns MIC értékei egyformán 0,5 µg/ml-nek és 4 µg/ml-nek adódtak, e drogokra a deléciós mutáns MIC értéke egy hígítási lépcsővel alacsonyabb volt, mint a vad típusnál vagy a heterozigóta mutánsnál (0,25 µg/ml, 2 µg/ml). Az M27-A protokollhoz mellékelt táblázat alapján a caspofungin esetében a vad típus és a heterozigóta mutáns érzékenysége a nem érzékeny kategóriába esett (NS-non susceptible), míg a *CDR1* és *CDR2* gének elvesztése a deléciós mutáns érzékeny kategóriába sorolásához vezet.

4.3. J774.2 egér eredetű makrofág sejtvonal gombaölési hatékonysága törzseinkkel szemben

A gazda-patogén kölcsönhatások vizsgálatához széleskörben elterjedt modellrendszer a J774.2 egér makrofágszerű monolayer. További előnye a modellrendszernek a sejtek könnyű szaporíthatósága ezáltal a rendszer nagyobb számú

izolátum vizsgálatára alkalmas. Munkánk során célul tűztük ki törzseink gazda sejtekkel történő interakciójának összehasonlítását különös tekintettel a gomba-ölő képességre. Minden törzs esetében 3 egymástól független ún. biológiai párhuzamost alkalmazva végeztünk fertőzési kísérleteket, majd ezután minden ko-kultúra esetében 3 ún. statisztikai párhuzamos alkalmazásával határoztuk meg a gomba-ölés hatékonyságát. Eredményeinket a 7. ábra foglalja össze.

Megállapítottuk, hogy a sejtvonal mindhárom faj izolátumait képes bizonyos százalékban eliminálni. Az ölési hatékonyság *C. parapsilosis* vad típus esetében 18-38% (átlagosan: 26,27%), heterozigóta mutáns esetében 8-17% (átlagosan: 11,81%) valamint a deléciós mutáns esetében 1-4% (átlagosan: 2,52%). A különböző törzsek adatainak átlagait tekintve megállapítottuk, hogy a J774.2 sejtvonal a három törzset különböző mértékben volt képes eliminálni, statisztikailag szignifikáns különbségeket állapítottunk meg mind a három törzssel szemben mutatott ölési hatékonyságban.



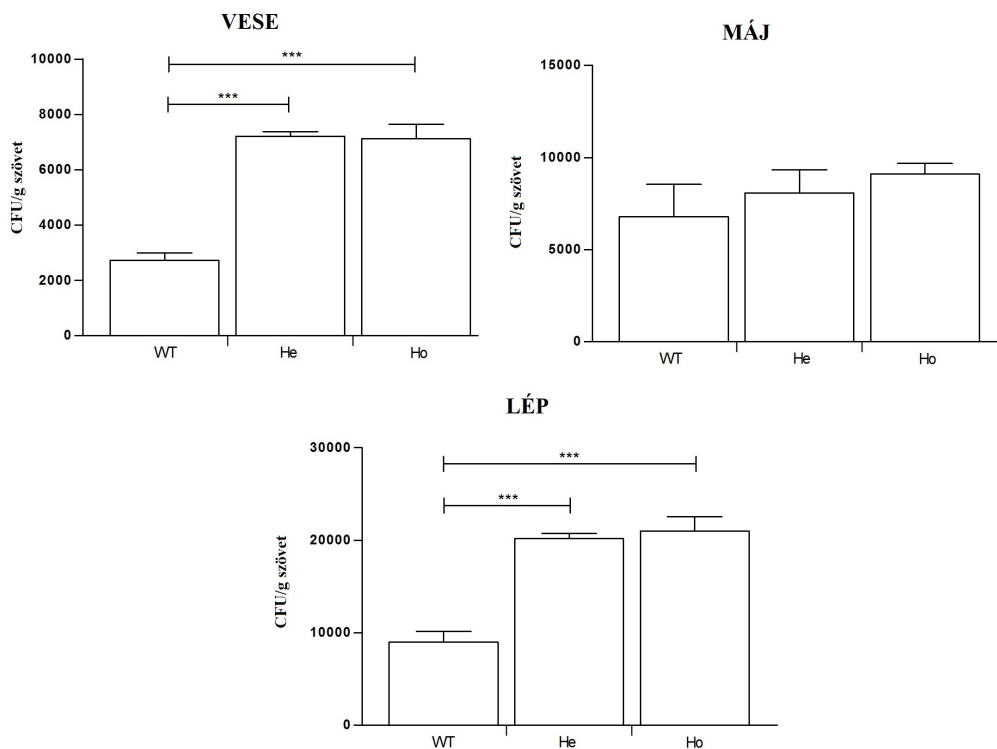
7. ábra: J774.2 sejtvonal gombaölési hatékonysága

4.3. Törzseink *in vivo* túlélése A/J egerekben

Az *in vitro* fertőzések hasznosak, de megerősítésükhöz szükségesek *in vivo* kísérletek is. Erre különböző egér törzseket használnak. *Candida* fertőzések modellezésére az A/J egértörzs a legalkalmasabb. Az egerek fertőzése történhet intraperitoneálisan (IP) vagy intravénásan (IV), az IV fertőzések előnye, hogy alkalmasabb rendszer szisztémás fertőzések modellezésére. A fertőzés után a gomba sejtek elsősorban a májban, a lépben és a vesékben halmozódnak fel, így a fertőzést követő 2. napon a kísérletben résztvevő

egereket CO₂-vel túlaltatjuk az előbb említett szervekből homogenizátumot készítünk és az így nyert szuszpenziót YPD csészékre szélesztve a felnövő telepek száma alapján, következtetünk a törzseink túlélési képességére.

A kapott eredmények összefoglalása a 8. ábrán látható.



8. ábra: Élősejtek száma az egerek különböző szerveiben 3 törzsünk esetén a második napon

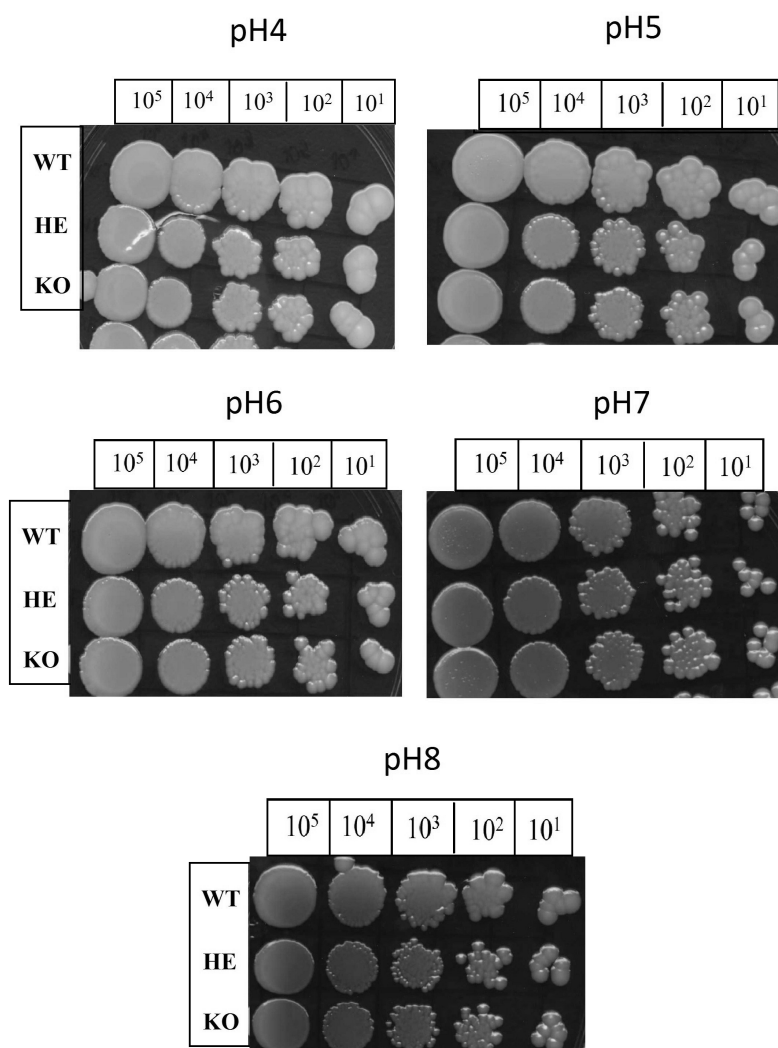
Az ábráról is kiderül, hogy az egerek májában mind a 3 törzsünk azonos mértékben volt képes túlélni. A lépben és a vesékben a heterozigóta és a deléciós mutáns törzsek sejtjeiből jelentősen több élt túl, mint a vad típus sejtjeiből. Érdekes módon a heterozigóta mutáns és a deléciós mutáns törzsek között nem volt különbség az *in vivo* túlélésben a második napon. A negyedik napra az egerek szervezetében nem volt detektálható gomba egyik törzs esetében sem.

4.4. Mutánsok növekedése különböző környezeti stresszorok jelenlétében

A környezet kémhatása a *Candida* fajok virulenciájának egyik meghatározó faktora. Mivel ezen patogén gomba fajok az alacsony pH-t preferálják, ezért túlzottan savas környezetben over-expresszálódnak. Az emberi szervezetben acidózis kialakításában

szerepet játszhat a tartósan magas vércukor szint, továbbá az alkohol, valamint következménye lehet antibiotikus kezelésnek is.

Vizsgálataink során ellenőriztük törzseink növekedési képességét 4-8-as pH értékű YPD táptalajokon. A 9. ábra alapján is jól látható, hogy a vad típusú és a *CDRI-2* mutánsok egyik pH értékű táptalajon sem mutatnak eltérő fenotípust, tehát a két *CDR* gén elvesztése nem befolyásolja a gomba életképességét a pH függvényében.

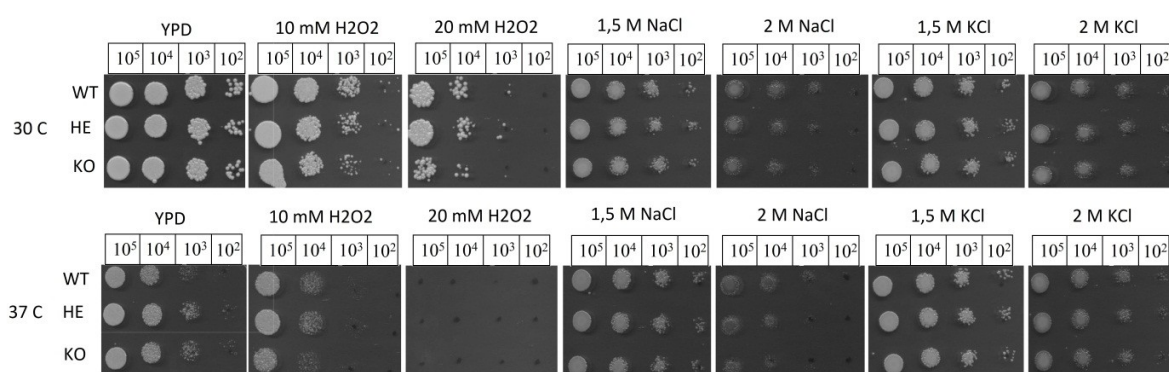


9. ábra: *C. parapsilosis* vad típus, *CDRI-2* heterozigóta és deléciós mutánsok növekedése különböző pH-jú táptalajon

A gomba sejtek ellen a fagocitáló sejtek elsősorban oxidatív vegyületek fagolizozómába juttatásával lépnek fel. Ennek modellezésére 10 mM valamint 20 mM H_2O_2 -vel kiegészített YPD táptalajon vizsgáltuk a törzsek növekedési képességét.

Ahogy az a 10. ábra alapján látható a vad típusú és a *CDRI-2* mutánsok egyformán növekedtek a H₂O₂-t tartalmazó táptalajokon, ez azt jelenti, hogy a *CDRI-2* gén elvesztése nincs jelentős hatással az oxidatív stressz tolerálására.

Az ozmotikus stresszel szembeni ellenállóság ellenőrzésére YPD táptalajainkat 1,5 M valamint 2 M nátrium-kloriddal vagy kálium-kloriddal egészítettük ki. Látható, hogy sem a NaCl-t, sem a KCl-t tartalmazó táptalajon nem volt különbség törzseink növekedései között, tehát a *CDRI-2* gén elvesztése nem volt kimutatható hatással az ozmotikus stresszel szemben mutatott toleranciára.



10. ábra: Különböző stresszorok hatása *C. parapsilosis* vad típus, *CDRI-2* heterozigóta és deléciós mutáns törzsek növekedésére

5. ÖSSZEFOGLALÁS

Munkánk során sikeresen létrehoztuk *C. parapsilosis* vad típusú GA1 törzséből kiindulva a *C. parapsilosis* *CDR1-2* heterozigóta és homozigóta mutánsokat az erre a célra összeépített pSFS2CDR1-2 plazmid konstrukció segítségével.

Korábbi tanulmányok arra utaltak, hogy a *CDR* géneknek jelentős szerep jut más *Candida* fajoknál a drogrezisztencia kialakításában, az által, hogy ATP hidrolizálásával, széles szubsztrát specifitással képesek különböző molekulák sejten kívülre juttatására. Az említett tanulmányokban mutatták ki *CDR* gének fokozott működését több rezisztens *Candida* törzsben.

Mutáns törzseink flukonazollal és caspofunginnal történő tesztelése kiderítette, hogy a *CDR1-2* gének elvesztése *Candida parapsilosis*ban csökkent MIC-értékeket okoz az előbb említett antimikotikumokkal szemben, hasonló MIC-érték esést nem tapasztaltunk az amphotericin B esetében, ahol törzseink azonos mértékben voltak érzékenyek.

Gombaeliminációs kísérleteket is végrehajtottunk J774.2 egér makrofág sejtvonal használatával *in vitro* körülmények között. Megállapítottuk, hogy a J774.2 sejtek legerőteljesebben a vad típusú törzs sejtjeit pusztították el, míg ennél kisebb (körülbelül 50%) mértékben volt képes a *CDR1-2* heterozigóta törzs sejtjeinek ölésére, érdekes módon a legellenállóbb a *CDR1-2* homozigóta deléciós mutáns törzs sejtjei voltak, ahol alig volt megfigyelhető (átlagosan 1-2%-os) a J774.2 sejtek gombaeliminációs aktivitása.

Mutánsaink túlélő képességét *in vivo* egérfertőzési kísérletekben A/J egér törzs igénybevételével. Eredményeink a *CDR1-2* heterozigóta és homozigóta mutánsoknál jelentősen nagyobb élősejt számot mutattak az állatok veséjében és lépében a vad típushoz képes, mint az egerek májában.

Elemeztük továbbá törzseink stressztűrő képességét oxidatív és hiperozmotikus környezetben, melyhez H₂O₂-dal illetve NaCl-dal és KCl-dal kiegészített YPD táptalajt használtunk, valamint a különböző pH-n való növekedési tulajdonságait. Kísérleteinkből kiderült, hogy a törzseink azonos mértékben voltak képesek növekedni a különböző táptalajokon.

A J774.2-vel valamint A/J egértörzsszel végzett kísérleteink eredményeinek hátterében meghúzódó mechanizmus egyelőre ismeretlen, megválaszolására jelenleg is folynak kísérleteink. Feltételezésünk szerint a gazda patogén ölő mechanizmusainak hatékonyabb kivédése állhat a szokatlan fenotípus mögött. Ennek vizsgálata rendkívül

izgalmas kérdésekre adhat választ annak tekintetében, hogy a gazda különböző védelmi mechanizmusainak milyen támadási pontjai lehetnek. Hipotézisünk szerint a mutánsok membrán struktúrája változhatott, amely specifikus mikroba ölő folyamatok fő célpontja lehet. Ennek vizsgálatára olyan kísérleteket tervezünk, ahol specifikusan membránra ható anyagokkal szembeni érzékenységet vizsgálunk. Tervezzük továbbá a sejtek transzmissziós elektronmikroszkópos analízisét, illetve egyéb humán sejtekkel történő interakciójának vizsgálatát.

6. IRODALOM

1. Pfaller M A, Diekema D J, (2007) Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. Clin. Microbiol. Rev. 20: 133–163
2. Trofa D, Gacser A, Nosanchuk JD (2008) *Candida parapsilosis*, an emerging fungalpathogen. Clin Microbiol Rev. 21: 606–625.
3. Eveline C van Asbeck, Karl V Clemons, David A Stevens, (2009) *Candida parapsilosis*: a review of its epidemiology, pathogenesis, clinical aspects, typing and antimicrobial susceptibility. Critical Reviews in Microbiology, 35 (4): 283–309
4. Bonassoli L, Bertoli M, Svidzinski T, High frequency of *Candida parapsilosis* on the hands of healthy hosts Journal of Hospital Infection, Volume 59, Issue 2, Pages 159-162
5. Ahmet Umit Gullu, Murat Akcar, Ahmet Arnaz, Mehmet Kizilay, (2008) *Candida parapsilosis* tricuspid native valve endocarditis: 3-year follow-up after surgical treatment. Interact CardioVasc Thorac Surg, 7: 513-514
6. Chung-Dann Kan, Chwan-Yau Luo, Pao-Yen Lin, Yu-Jen Yang, (2002) Native-valve endocarditis due to *Candida parapsilosis* Interactive Cardiovascular and Thoracic Surgery, 1: 66-68
7. Chang-Hun Lee, Jae-Min Oh, Seong-Rheol Oh, Minwook Yoo, Myeung-Su Lee, (2010) *Candida* Arthritis after Arthroscopic Arthroplasty in a Patient without Predisposing Factors. Open Rheumatol J. 4: 7–9.
8. Prasad R, Kapoor K, (2005) Multidrug resistance in yeast *Candida*. Int Rev Cytol. 242: 215-48.
9. Sanglard D, Ischer F, Calabrese D, Majcherczyk PA & Bille J (1999) The ATP binding cassette transporter gene CgCDR1 from *Candida glabrata* is involved in the resistance

- of clinical isolates to azole antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother.* 43: 2753-2765.
10. Giovanna P, Dimitrios P, Giovanni DD, Fabio R & Rosaria CM (2012) Ambroxol influences voriconazole resistance of *Candida parapsilosis* biofilm. *FEMS Yeast Res.* 12 (4): 430-438
 11. Gacser A, Salomon S & Schafer W (2005) Direct transformation of a clinical isolate of *Candida parapsilosis* using a dominant selection marker. *FEMS Microbiol Lett.* 245: 117-121
 12. [Nguyen KT](#), [Ta P](#), [Hoang BT](#), [Cheng S](#), Hao B, [Nguyen MH](#), [Clancy CJ](#), (2009) Anidulafungin is fungicidal and exerts a variety of postantifungal effects against *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, and *C. krusei* isolates. [Antimicrob Agents Chemother.](#) 53 (8): 3347-3352
 13. Jonathan Lam, Marc Herant, Micah Dembo, Volkmar Heinrich. (2009) Baseline Mechanical Characterization of J774 Macrophages. *Biophys J.* 96 (1): 248–254.
 14. Clark T A, Slavinski S A, Morgan J, Lott T, Arthington-Skaggs B A, Brandt M E, Webb R M, Currier M, Flowers R H, Fridkin S K, Hajjeh R A, (2004) Epidemiologic and molecular characterization of an outbreak of *Candida parapsilosis* bloodstream infections in a community hospital. *J. Clin. Microbiol.* 42: 4468–4472
 15. Nguyen LN, Trofa D, Nosanchuk JD (2009) Fatty Acid Synthase Impacts the Pathobiology of *Candida parapsilosis* In Vitro and during Mammalian Infection. *PLoS ONE* 4 (12): e8421.
 16. Wayne, PA: CLSI; (2008) Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; third informational supplement. Document M27-A3.

7. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Elsősorban szeretnék köszönetet mondani Prof. Dr. Vágvölgyi Csaba tanszékvezető egyetemi tanárnak és Dr. Gácsér Attila tudományos munkatársnak, hogy helyet illetve témát biztosítottak számomra. Hasonló köszönet illeti MD Joshua D. Nosanchukot a New Yorki Albert Einstein College of Medicine professzorát. Külön köszönettel tartozok Németh Tibor PhD hallgatónak, aki megtanított a munkámhoz szükséges alapvető módszerek használatára, türelemmel volt felém, és hasznos tanácsokkal látott el a munka összetettebb folyamataiban, melyek nagyban segítették e dolgozat elkészültét.

Továbbá szeretnék köszönetet mondani a 310-es labor munkatársainak, név szerint: Dr. Hamari Zsuzsannának, Dávid Edinának, Grózer Zsuzsannának, Horváth Péternek, Tóth Adélnak, Szenzenstein Juditnak, Tóth Renátának, Csonka Katalinnak, Papp Henriettának hogy munkámhoz megfelelő légkört biztosítottak és hogy segítségemre voltak munkám során.

Köszönök mindent az SZTE-TTIK Mikrobiológia Tanszék valamennyi dolgozójának.

8. NYILATKOZAT

„Nyilatkozat a pályázó egyéni hozzájárulásáról a pályaműben leírt eredményekhez”

Alulírott Papp Csaba Gergő a dolgozatban leírt munkafolyamatok közül a:

- CDR1-2* gének deléciós mutagenéziséhez szükséges műveleteket úgyis, mint:
 - indító szekvenciák tervezése
 - genomi DNS izolálás
 - PCR reakciók
 - Candida parapsilosis* GA1 törzs transzformálása
 - transzformánsokból genomi DNS izolálás
 - genomi DNS restrikciós emésztése
 - Southern hibridizáció
- törzsek MIC értékeinek meghatározását flukonazolra, caspofunginra és amphotericin B-re
- J774.2 makrofágok gomba eliminációjának vizsgálatát
- törzseink túlélési képességének vizsgálatát A/J egér törzs használatával
- törzseink érzékenységeinek meghatározását pH, oxidatív és ozmotikus stresszorokra

végeztem el.

.....
aláírás

Szeged, 2012. december 09.