

***A Candida albicans* morfológiai átalakulása, mint
nem általános környezeti stresszválasz**

XXXI. OTDK Biológia Szekció

Készítette: Kiss Ágnes
I. Biomérnök (MSc) hallgató

Témavezetők: Jakab Ágnes
Ph.D hallgató

Prof. Dr. Pócsi István
tanszékvezető
egyetemi tanár

Debreceni Egyetem Természettudományi Kar
Mikrobiális Biotechnológiai és Sejtbiológiai Tanszék

Debrecen 2013.

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések	3
2. Bevezető	4
2.1 A <i>Candida albicans</i> morfológiai jellemzése	5
2.2 Oxidatív stressz toleráns <i>Candida albicans</i> mutánsok	6
2.3 Élesztők környezeti stresszválasza és kereszttoleranciája.....	7
3. Célkitűzés	14
4. Anyag és módszer	16
4.1. Felhasznált törzsek.....	16
4.2. A <i>Candida albicans</i> törzsek előtenyésztése	17
4.3. A <i>Candida albicans</i> törzsek vizsgálata.....	17
4.3.1. A <i>Candida albicans</i> törzsek stresszkezelése.....	17
4.3.1.1. Oxidatív stressz vizsgálata	17
4.3.1.2. Ozmotikus stressz vizsgálata.....	17
4.3.1.3. Nehézfém kiváltotta stressz.....	18
4.3.1.4. Sejtfal, sejtmembrán és Unfolded Protein Response-t (UPR) kiváltó stressz	18
4.3.1.5. pH, hő és hideg stressz vizsgálata	18
4.3.2. A <i>Candida albicans</i> törzsek morfológiai vizsgálata	18
4.3.3. Glükóz mérése vékonyréteg kromatográfia segítségével	19
4.4. Felhasznált vegyszerek.....	19
5. Eredmények és értékelésük	20
6. Összefoglalás	29
7. Irodalom	31

1. Rövidítések

ATCC	American Type Culture Collection
ER	endoplazmatikus retikulum
ESR	Environmental Stress Response
CFW	calcofluor white
DMSO	dimetil-szulfoxid
DTT	dithiothreitol
Hog 1	high osmolarity glycerol response protein 1
MSB	menadion nátrium biszulfít
PMNL	polimorfonukleáris leukocita
SAPK	stressz aktivált protein kináz
SDA	Sabouraud dextróz agar
SDB	Sabouraud dextróz tápoldat
<i>t</i> BOOH	<i>tert</i> -butil-hidroperoxid
UPR	Unfolded Protein Response

2. Bevezető

A gombák birodalmába sorolt szervezetek – nagyfokú alkalmazkodóképességüknek köszönhetően – a Föld felszínén szinte mindenütt előfordulnak (Szentirmai, 1996) Korhadékbontó (szaprofita), élősködő (parazita) vagy együttélő (szimbionta), de mindig heterotróf életmódot folytató, gazdaságilag, iparilag és egészségügyileg igen jelentős szervezetek (Hortobágyi, 1986). A gombák országa becslések szerint 1,5 millió fajból áll, melyek az élőhelyük változatosságához alkalmazkodva nagyfokú diverzitásra tettek szert (Hawksworth és mtsai, 1995). A gombák legnagyobb és legváltozatosabb csoportját az Ascomycota törzs képviseli, tagjai a világ legkülönbözőbb élőhelyein fordulnak elő. Megtalálhatók a talajban, az érett és rothadó gyümölcsökön, valamint más szervezetekkel kölcsönhatásban. A különböző élőhelyek igen komplex rendszerek, melyek folyamatosan és hirtelen változnak, stresszt indukálva az ott élő szervezetekben. A szabadon élő ascomycota fajok azonban képesek a környezetben fellépő hőmérsékleti, ozmotikus, pH és tápanyagtartalom változásai mellett is fenntartani homeosztázisukat (Gasch, 2007).

Az ismert gombafajokból kb. 150-re tehető azon fajok száma, amelyek emberben infekciót okozhatnak. Az emberi gombás megbetegedéseket két csoportba sorolhatjuk. Megkülönböztetünk dermatomikózisokat és szisztémás mikózisokat. A dermatomikózis alatt a bőr, illetve bőrfelület (haj, köröm, szőrzet) gombás megbetegedését értjük, melyek az esetek többségében csak kozmetikai problémát okoznak. Szisztémás mikózis alatt a belső szervek megbetegedése értendő, melyek súlyosak, esetleg halálosak is lehetnek (Gergely, 2003).

Az utóbbi években megnövekedett a gombás fertőzések száma a kórházakban (Kullberg és Oude Lashof, 2002). A *Candida* fajok majdnem 80%-ban felelősek ezekért a fertőzésekért és a negyedik leggyakrabban izolált organizmusok a nozokómiális infekciók során. A több mint 100 *Candida* species közül csak mintegy 8-at tekintenek fontos emberpatogénnek. Ezek a *C. albicans*, *C. krusei*, *C. kefyr*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. lusitaniae*, *C. rugosa* (Gergely, 2003). A *Candida* genus fajai közül a *Candida albicans* okoz leggyakrabban opportunista fertőzést az emberekben (Pfaller és mtsai, 2000). A *C. albicans* obligát módon kötődik a melegvérű élőlényekhez. Az ember normál mikroflórájának tagjaként a légutak, az emésztőtraktus és a női nemi szervek nyálkahártyáján fordul elő. Ezek a mikroorganizmusok az immunrendszer legyengülésekor, a hormonrendszer vagy a normál flóra egyensúlyának felborulásakor agresszív patogénekké válhatnak, és különböző megbetegedéseket okozhatnak (Gergely, 2003; Fradin és mtsai, 2005).

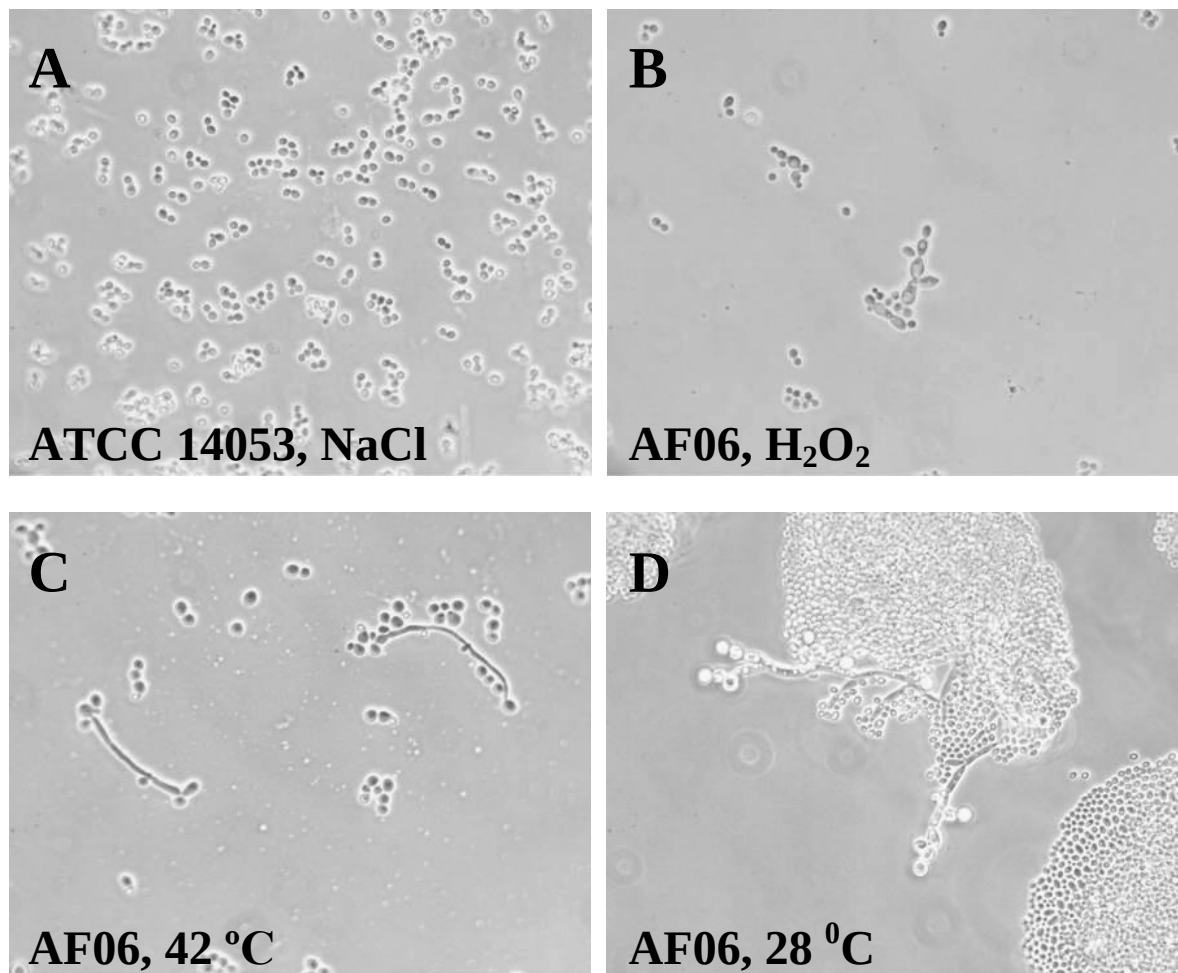
2.1. A *Candida albicans* morfológiai jellemzése

A *Candida albicans* sejtek változatos morfológiai formában jelenhetnek meg, és a különböző morfológiájú sejtek gyakran egymás mellett fordulnak elő ugyanabban a környezetben. A *C. albicans* azon képessége, hogy az élesztő és hifa formák között képes váltani, az opportunistá patogén egyik legtöbbet tárgyalt és leginkább vizsgált virulencia faktora (Odds, 1988; Shepherd, 1988).

A *C. albicans* két fő morfológiája jól ismert: az ovoid alakú, sarjadó élesztő forma, és a fonalas hifa forma. A két forma között nagyon sok átmeneti morfológia írható le, tehát az átalakulás nem egy hirtelen változásként jellemezhető. Az átmeneti morfológiákat gyakran egyszerűen pszeudohifának nevezik, de gyakorlatban különbséget teszünk a megnyúlt élesztő sejtek és a pszeudohifa között. Mikroszkópikusan vizsgálva, nehéz megkülönböztetni a pszeudohifákat és a valódi hifákat, annak ellenére, hogy a pszeudohifa képződési módja eltérő. Kialakulása során ugyanis az élesztő sejtek sarjadást követően együtt maradnak és egy keskeny, megnyúlt formát hoznak létre (Odds, 1988). Így a pszeudohifát könnyen el lehet különíteni a hifától a szeptumok megjelenése alapján (Scherwitz és mtsai, 1978; Heddon és Buck, 1980; Shepherd és mtsai, 1985; **1.B, C ábra**). A hifa élesztő sejtéből keletkezik, apikális megnyúlással, ekkor nincsenek szeptumok és a hifa teljes hosszúsága mentén párhuzamosak az oldalai. Ezen tulajdonságok mellett a megkülönböztetés egyszerű módja a szélesség mérése, mert még a pszeudohifa és a hifa nagymértékű hasonlósága esetén is, a pszeudohifa szélessége nagyobb, mint a hifáé. A hifa szélessége $\sim 0.2 \mu\text{m}$, a pszeudohifa minimum szélessége pedig $\sim 0.28 \mu\text{m}$ (Sudbery, 2001). A sarjadó gombasejtek $4\text{--}6 \mu\text{m}$ átmérőjű, gömb alakú vagy ovális képletek (**1.A ábra**). A dimorf *C. albicans* jellegzetessége emellett a diagnosztikai jelentőségű klamidospóra képzés, melyek a pszeudohifák végén képződő vastag falú, hő- és szárazságtűrő képességgel rendelkező képletek (**1.D ábra**). Igen jellemző a *C. albicansra*, hogy néhány óráig tartó, birkaszérumban történő tenyésztés után a gombasejtek jellegzetes nyúlványokat, csíratömlőket képeznek, mely mikroszkópos vizsgálattal jól látható. A morfológiai vizsgálat tehát *C. albicans* azonosítására is alkalmas lehet (Gergely, 2003).

Az a tulajdonság, hogy az opportunistá patogén képes az élesztő, hifa és pszeudohifa között váltani, a gomba virulenciájának szempontjából tekinthető fontosnak, ugyanis mind a hifa és mind a pszeudohifa invazív. A fonalas formák (pszeudohifa, hifa) segítik a szövetek közötti penetrációt a fertőzés korai szakaszaiban, míg az élesztő forma a véráramban történő

elterjedésre alkalmas. A fonalas formák fontosak lehetnek olyan szervek kolonizációja során is, mint pl. a vese (Gow és mtsai, 2002).



1. ábra A *Candida albicans* élesztő (A), pszeudohifa (B) és hifa (C) formája és klamidiospóra képzése (D).

2.2. Oxidatív stressz toleráns *Candida albicans* mutánsok

Fekete és mtsai (2007, 2008) az oxidatív stressz által előidézett változásokat vizsgálták *Candida albicans* törzsekben. Ennek érdekében a *C. albicans* ATCC 14053 (American Type Culture Collection) referencia törzsből, egyre növekvő *tert*-butil-hidroperoxid (*t*BOOH) koncentrációjú tápoldatban történő folyamatos tenyésztéssel, az AF06 oxidatív stressz toleráns mutánt hozták létre (Fekete és mtsai, 2007). Az így keletkezett AF06 mutáns törzset csökkent hifa- és pszeudohifa képzés jellemezi. A morfológiai átalakulás a gombának a

gazdaszervezet szöveteinek és szerveinek sikeres megtámadásához elengedhetetlenül szükséges. Egyéb virulencia tulajdonságait tekintve, az AF06 mutáns extracelluláris foszfolipáz termelése alacsonyabb, amely a sejtmembrán komponenseinek hatékony degradációjához szükséges; az aszparát proteáz termelése pedig meghaladja a szülői törzset, amely a szövetek közötti elterjedést segíti. Megállapították, hogy a polimorfonukleáris leukocita (PMNL) sejtek a szülői és mutáns törzset egyformán felismerik, amiből arra következtettek, hogy az oxidatív stressz toleráns *C. albicans* antigenicitása nem tér el a szülői törzsetől. A mutáns AF06 törzs csökkent képessége a morfológiai átalakulásra és a foszfolipáz termelésre együttesen azt eredményezi, hogy a mutáns törzs ötször kevésbé patogén a vizsgált egér modellszervezetben, mint a szülői törzs. A gombának az immunsejtekkel való interakciója során előnye származik az oxidatív stressz tolerancia meglétéből, azonban hátrányos, amikor a véredényekből kilépve a szerveket támadja. Emellett azonban a mutáns törzs megnövelt oxidatív stressz toleranciája nincs hatással a sejtek méretére, felszínére és struktúrájára sem. A *C. albicans* AF06 mutáns megváltozott fiziológiája (folyamatosan felborult redox egyensúly, magas peroxid szint, gyorsított lipidperoxidáció) miatt folyamatosan indukált az antioxidatív védelmi rendszere.

Fekete és mtsai későbbi vizsgálataiban (2008) *C. albicans* klinikai izolátumokat (4774, 8387, 10934, 19890, 20072) felhasználva *t*BOOH toleráns mutánsokat hoztak létre (4774T, 8387T, 10934T, 19890T, 20072T), szintén a szülői törzsek egyre növekvő *t*BOOH koncentrációjú tápoldatban történő folyamatos tenyésztésével, így ezek antioxidatív védelmi rendszere is folyamatosan indukált. A létrehozott törzseket Sabouraud dextróz agar (SDA) táptalajon és Sabouraud dextróz broth (SDB) tápoldatban egyaránt vizsgálták. Az AF06 törzshöz hasonlóan, ezekben a mutánsokban is csökkent az extracelluláris foszfolipáz termelés és késleltetett a növekedésük mind az SDA felszínén, mind a folyékony SDB tápoldatban. Fontos, hogy ezek a mutánsok nem veszítették el teljesen hifázó képességüket, az SDB tápoldatban növekedésük utolérte a szülői törzsekét.

2.3. Élesztők környezeti stresszválasza és kereszttoleranciája

A különböző mikroorganizmusoknak természetes környezetükben a legváltozatosabb stresszhatásokkal kell szembenézniük. Számos tanulmány végzett genomexpressziós mintázatra vonatkozó vizsgálatokat élesztőkben, hogy megállapíthassák, mely gének vesznek részt a stresszválaszban (Gasch és mtsai, 2000; Enjalbert és mtsai, 2003; Gasch, 2007). A

kísérletekben fény derült arra, hogy a genom egy igen jelentős hányada reagál a stresszre, mely élettani folyamatot környezeti stresszválasznak (ESR) nevezzük.

Az ESR-t elsőként a pékélesztőként ismert *Saccharomyces cerevisiae* esetén vizsgálták. Az élesztőt hősokknak, oxidatív stressznek, ozmotikus stressznek, tápanyag limitációnak, DNS károsításnak és extrém pH-nak tették ki. Az általános stresszválaszban mintegy 900 gén vesz részt, ezek közül 300 gén aktiválódik és 600 gén represszálódik (Causton és mtsai 2001). Az ESR a *Schizosaccharomyces pombe* esetén is jelen van, habár a két faj fejlődési útja 500 millió éve vált külön. Az ESR meglepte azonban bizonytalan *C. albicans* esetében, annak ellenére, hogy a *S. cerevisiae*-től csupán 200 millió éve vált el (Gasch, 2007). Enjalbert és mtsai (2003) kísérleteiben ozmotikus és oxidatív stressz kezelésnek tették ki a *C. albicans*-t, majd DNS chip technológiával vizsgálták a génexpressziót. A teszt eredményeként ~ 100 gén expresszálódott, de ez a géncsoport nem volt olyan egységes, mint a *S. cerevisiae* esetén. A kisszámú géncsoport szabályozása is eltérő, hiszen a Hog1 stressz-aktivált protein kináz (SAPK) által szabályozva aktiválódik. Végsősoron elmondható, hogy az opportunistá patogén *C. albicans* a vizsgált körülmények között aktivál egy stresszválaszt, de az eltér a *S. cerevisiae* és *Sch. pombe* esetében leírtaktól (Enjalbert és mtsai, 2003).

Azok a gombasejtek, amelyek már adaptálódtak az enyhébb stresszhez, toleránssá válhatnak ugyanazon stresszel szemben akkor is, ha az erősebb, esetleg letális dóziszú, valamint a kereszttolerancia felléphet más, látszólag különböző típusú stresszekkel szemben is (Estruch, 2000). A stressz által kiváltott növekedés csökkenés alapvető fontosságú folyamat annak érdekében, hogy a gomba minden hozzáférhető forrását a stressz elleni védekezésre fordítsa, és felkészüljön a közelgő stresszhelyzetekre (Castrillo és mtsai, 2007; Berry és Gasch, 2008; Brauer és mtsai, 2008; Lu és mtsai, 2009; Berry és mtsai, 2011; Slavov és mtsai, 2011, 2012; Zakrewska és mtsai, 2011). Az irodalmi adatok a kereszttolerancia létezését túlnyomórészt szintén a pékélesztőként ismert *S. cerevisiae* esetén írják le. Számos és eltérő kísérleti adat található a szakirodalomban, amely a kereszttolerancia jelenségét vizsgálja különböző élesztők esetén (**1. táblázat**). Az opportunistá humán patogén *C. albicans*-t vizsgálva, Jamieson és mtsai (2006) a gombát alacsony koncentrációjú szuperoxid generáló ágenseknek, H₂O₂-nek és menadionnak tették ki. Megállapították, hogy az ezekhez való adaptáció eredményeként, ha ugyanezen ágensek letális dóziséval kezelték a sejtet, azokra szintén toleránssá vált. Enjalbert és mtsai (2003) azonban nem figyeltek meg kereszttoleranciát transzkriptom vizsgálataik során, ami megerősítette a feltételezésüket, miszerint a gombának nincs általános stresszválasza. Smith és mtsai (2004) azonban a Hog1 stressz aktivált protein kináz vizsgálata során alkalmazott stressz kondíciók alatt (0,3 mol⁻¹

NaCl) észlelték a kereszttolerancia jelenlétét. Ezek alapján megállapították a *C. albicans* kereszttoleranciájának létezését, de csak abban az esetben, ha a Hog1 a stressz által aktivált állapotban van. Elméletüket bebizonyítására Enjalbert és mtsai (2003) által alkalmazott stresszhatásoknak tették ki a gombát, kis dózisú H_2O_2 kezelést követően. Ahogy korábban Jamieson és mtsai (1996) megállapították, kis dózisú (0.4 mM) H_2O_2 kezelés után a nagy dózisú H_2O_2 -vel szemben is ellenállóvá vált a gomba. Ezen túlmenően Smith és mtsai (2004) azt találták, hogy az előzetes ozmotikus kezelés ($0,3 \text{ mol}^{-1} \text{ NaCl}$), amely aktiválja a Hog1 protein kinázt, megvédi a sejtet a 100 mM H_2O_2 kezeléssel szemben. Az előzetes hőstressz azonban, amely nem aktiválja a Hog1-et, nem vált ki kereszttoleranciát *C. albicans* esetén (**1. táblázat**).

Habár az ESR és a kereszttolerancia közötti kapcsolat ésszerűnek tűnik, Berry és Gasch (2008) és Berry és mtsai (2011) szerint az ESR elegendő, hogy az élesztő megbirkózzon az egyedi stresszhatásokkal, de nem kielégítő magyarázat a kereszttoleranciára *S. cerevisiae*-ben. Amellett, hogy látszólagos különbség van a kereszttolerancia és az ESR méretében és szabályozásában, másik nagy eltérés a *C. albicans* és a *S. cerevisiae* között a figyelemreméltó morfológiai plaszticitás, amely magába foglalja az élesztő→hifa átalakulást (Whiteway és Nantel, 2006), ami egy kulcselem a gazdaszervezetben való elterjedés során ennél az opportunistá patogénnél (Mavor és mtsai, 2005). Arra következtethetnénk, hogy a *C. albicans* a környezeti stresszre főképpen a morfológiai változással válaszol az ESR használata helyett (Gasch, 2007; Enjalbert és mtsai, 2006). Az eddigiek során még nem vizsgálták a kereszttolerancia és a környezeti stressz hatására kialakult morfológiai változás közötti korreláció létezését vagy nem létezését.

Előkísérleteinkben a mutánsok segítségével választ kaptunk azon kérdéseinkre, miszerint a megnövekedett oxidatív stressz tolerancia előidézi-e a kereszttoleranciát más stresszhatások esetén, ami az ESR jelenlétére utal. A szülői és a mutáns törzsek összességének adott stressz hatására bekövetkezett növekedés változásának vizsgálatával kapott eredményeink azt mutatták, hogy az oxidatív stressz toleráns *C. albicans* mutáns törzsek növekedés változása szignifikánsan kisebb a *C. albicans* szülői törzseknél. Tehát a megnövelt az oxidatív stressz toleranciával rendelkező *C. albicans* mutáns törzsek a szülői törzsekkel összehasonlítva, általánosságban jobban tűrték az ozmotikus, nehézfém, sejtfal, sejtmembrán, UPR-t generáló, hő, hideg, és pH (savas és lúgos) stresszt kiváltó ágensek által okozott stresszt. Ebből látható, hogy a mutáns törzsek oxidatív stressz toleranciája megnövelte a sejtek stressztűrését az alkalmazott stresszorok mindegyikénél. Ez a meglévő keresztvédelem az ESR jelenlétére utal, annak ellenére, hogy az ESR géneknek még csak kis részét azonosították ebben a gombában.

Így a TDK dolgozatban a célunk azon feltevés megválaszolása volt, hogy a stressz hatásra kialakult morfológiai változások összefüggésben vannak-e a stressz generáló ágensek között fennálló kereszttoleranciával és így az ESR-al *C. albicans* esetén.

1. táblázat A szakirodalomban fellelhető kereszttolerancia vizsgálatok különböző élesztők esetén (+ = van kereszttolerancia, - = nincs kereszttolerancia, LN = folyékony nitrogén, HP = hidrogén-peroxid, MD = menadion, HHP = magas hidrosztatikus nyomás).

Előzetes kezelés	Letális stressz	Irodalom	Vizsgált élesztő	Kereszttolerancia
oxidatív stressz (0.4 mM HP; 0.5 mM MD)	oxidatív stressz (0- 100 mM HP)	Jamieson és mtsai (1996)	<i>C. albicans</i>	+
oxidatív stressz (0.4 mM HP; 0.5 mM MD)	plumbagin (0- 0.7 mM)			+
hőstressz (23 → 37 °C)	oxidatív stressz (1.6 mM HP)	Enjalbert és mtsai (2003)	<i>C. albicans</i>	+
oxidatív stressz (0.4 mM HP)	hőstressz (37 °C)			-
ozmotikus stressz (0.3 M NaCl)	hőstressz (37 °C)			-
hőstressz (37 °C)	oxidatív stressz (25-100 mM HP)	Smith és mtsai (2004)	<i>C. albicans</i>	-
ozmotikus stressz (0.3 M NaCl)	oxidatív stressz (25-100 mM HP)			+
oxidatív stressz (0.4 mM HP)	oxidatív stressz (25-100 mM HP)			+
hőstressz (38 °C)	bleomycin (15 µg/ml)	Keszenman és mtsai (2005)	<i>S. cerevisiae</i>	+
ozmotikus stressz (0.7 M NaCl)	hőstressz (47 °C)	Trollmo és mtsai (1988)	<i>S. cerevisiae</i>	+
oxidatív stressz (1 mM MD)	oxidatív stressz (1- 5 mM HP)	Jamieson (1992)	<i>S. cerevisiae</i>	+
nehézfém stressz (0.1 mM Fe (III))	nehézfém stressz (2.5 mM Cr (III))	Fujs és mtsai (2007)	<i>S. cerevisiae</i>	+
oxidatív stressz (0.5 mM MD)	plumbagin (7 µM)	Castro és mtsai (2008)	<i>S. cerevisiae</i>	+
plumbagin (0.5 µM)	plumbagin (7 µM)			+
plumbagin (0.5 µM)	oxidatív stressz (20 mM MD)			-
ozmotikus stressz (0.3 M NaCl)	ozmotikus stressz (3 M NaCl)	Schüller és mtsai (1994)	<i>S. cerevisiae</i>	+
hőstressz (37 °C)	ozmotikus stressz (3 M NaCl)			+

1. táblázat A szakirodalomban fellelhető kereszttolerancia vizsgálatok különböző élesztők esetén (+ = van kereszttolerancia, - = nincs kereszttolerancia, LN = folyékony nitrogén, HP = hidrogén-peroxid, MD = menadion, HHP = magas hidrosztatikus nyomás).

Előzetes kezelés	Letális stressz	Irodalom	Vizsgált élesztő	Kereszttolerancia
hőstressz (37 °C)	fagyasztás-olvasztás stressz (-20 °C)	Park és mtsai (1997)	<i>S. cerevisiae</i>	+
oxidatív stressz (0.1 mM HP)				+
metabolikus stressz (5 µg/ml cikloheximid)				+
ozmotikus stressz (0.7 M NaCl)				+
oxidatív stressz (0.4 mM HP)	nehézfém stressz (0.5- 6 µM HgCl ₂)	Westwater és mtsai (2002)	<i>S. cerevisiae</i>	+
nehézfém stressz (0.3 mM CdCl ₂)	nehézfém stressz (0.5- 6 µM HgCl ₂)			+
oxidatív stressz (1 mM MD)	nehézfém stressz (0.5- 2 µM HgCl ₂)			+
oxidatív stressz (0.2 mM HP)	oxidatív stressz (2 mM HP)	Collinson and Dawes (1992)	<i>S. cerevisiae</i>	+
oxidatív stressz (0.2 mM HP)	hőstressz (52 °C)			-
hőstressz (37 °C)	oxidatív stressz (2 mM HP)			+
etanol (6%)+ pH 4.5	hőstressz (52 °C)	Coote és mtsai (1991)	<i>S. cerevisiae</i>	+
szorbinsav (9 mM) + pH 4.5	hőstressz (52 °C)			+
hőstressz (37 °C)	oxidatív stressz (4 mM MD)	O'Brien és mtsai (1993)	<i>S. cerevisiae</i>	+
oxidatív stressz (0.2 mM HP)	oxidatív stressz (4 mM MD)			+
oxidatív stressz (0.2 mM MD)	hőstressz (49 °C)			-
hőstressz (37 °C)	hőstressz (52 °C)	Lewis és mtsai (1995)	<i>S. cerevisiae</i>	+
	fagyasztás-olvasztás stressz (LN-25 °C)			+
	ozmotikus stressz (1.5 mM NaCl)			+
ozmotikus stressz (0.3 M NaCl)	hőstressz (52 °C)			+
	fagyasztás-olvasztás stressz (LN-25 °C)			+
	ozmotikus stressz (1.5 mM NaCl)			+

1. táblázat A szakirodalomban fellelhető kereszttolerancia vizsgálatok különböző élesztők esetén (+ = van kereszttolerancia, - = nincs kereszttolerancia, LN = folyékony nitrogén, HP = hidrogén-peroxid, MD = menadion, HHP = magas hidrosztatikus nyomás).

Előzetes kezelés	Letális stressz	Irodalom	Vizsgált élesztő	Kereszttolerancia
hőstressz (37 °C) + cikloheximid (50 µg)	hőstressz (52 °C)	Lewis és mtsai (1995)		(↓)
	fagyasztás-olvasztás stressz (LN-25 °C)			-
	ozmotikus stressz (1.5 mM NaCl)			(↓)
ozmotikus stressz (0.3 M NaCl) + cikloheximid (20 µg)	hőstressz (52 °C)			(↓)
	fagyasztás-olvasztás stressz (LN-25 °C)			-
	ozmotikus stressz (1.5 mM NaCl)			(↓)
oxidatív stressz (0.4 mM HP)	nyomás (220 MPa HHP)	Palhano és mtsai (2004)	<i>S. cerevisiae</i>	+
etanol stress (6 %)				+
hideg stressz (10 °C)				+
hőstressz (40 °C)	oxidatív stressz (5 mM HP)	Pereira és mtsai (2001)	<i>S. cerevisiae</i>	+
	hőstressz (51 °C)			+
	etanol stress (10 %)			+
hőstressz (39 °C)	hőstressz (48 °C), pH stressz (327 mM ecetsav), oxidatív stressz (10 mM HP)	Zakrzewska és mtsai (2011)	<i>S. cerevisiae</i>	+
hideg stressz (10 °C)	hőstressz, pH stressz, oxidatív stressz			+ (- = hideg-hőstressz)
pH stressz (1.2 mM szorbinsav)	hőstressz, pH stressz, oxidatív stressz			+
oxidatív stressz (0.15 mM HP)	hőstressz, pH stressz, oxidatív stressz			+

3. Célkitűzés

Dolgozatom témája a *tert*-butil-hidroperoxid (*tBOOH*) toleráns *C. albicans* törzsek vizsgálata és annak kiderítésére, hogy a megnövekedett oxidatív stressztolerancia eredményeként az általunk alkalmazott különböző stresszt kiváltó ágensek hatására létrejött morfológiai tranzíció összefüggésben van-e a környezeti stresszválasszal (ESR) az opportunistá patogénben.

A mikroorganizmusoknak szembe kell nézniük a környezetükben fellépő stresszhatásokkal. A genom jelentős hányada reagál a stresszre, ennek az élettani folyamatnak az elnevezése az ESR (Gasch és mtsai, 2000; Enjalbert és mtsai, 2003; Gasch, 2007). A *C. albicans* ESR-ra vonatkozóan eltérő irodalmi adatokat találhatunk. A transzkriptom szintű vizsgálatok kimutatták, hogy nagyon kevés azon gének száma, melyek az általános stresszekre indukálódnak vagy represszálódnak (Enjalbert és mtsai, 2006). A *Saccharomyces cerevisiae*ben az általános stresszválasz megléte előidézi a keresztvédelmet, azaz egy korábban elszenvedett stresszhatás eredményeként, ha sejteket egy másik típusú, akár erősebb vagy letális stressznek tesszük ki, azzal szemben is ellenállóvá válnak. Enjalbert és mtsai (2006) csak gyenge kereszttoleranciát találtak, amikor a *C. albicans*t oxidatív stressz kezelés után hő sokknak tették ki, és egyáltalán nem figyeltek meg, amikor a sejtek erős hő sokknak voltak kitéve az enyhe ozmotikus stresszhez való adaptáció után. Smith és mtsai (2004) abban az esetben pedig semmilyen kereszttoleranciát nem figyeltek meg, amikor a sejteket H₂O₂-dal kezelték hő stressz után. Megállapítható tehát, hogy kereszttolerancia akkor lép fel az opportunistá patogénben, ha a Hog1 protein kinázt az alkalmazott stressz aktiválja (Smith és mtsai, 2004). Az oxidatív stressz toleráns *C. albicans* törzsek esetén, a tanszéken elvégzett korábbi kísérletek során szintén megfigyeltük a kereszttolerancia jelenségét, tehát az ESR jelenlétét.

A *C. albicans* az emberi szervezetben dimorf gombaként viselkedik, képes tehát arra, hogy az élesztő→hifa morfológiai átalakulással a gazdaszervezetben kolonizáljon. Ezt az átalakulást a gomba környezetében bekövetkezett olyan változások is indukálhatják, mint a hőmérséklet, pH megváltozása vagy tápanyaglimitáció (Ernst, 2000). Az általunk alkalmazott stresszhatások mindegyikénél megvizsgáltuk a kialakult morfológiai formákat, így megállapítható van-e összefüggés az előzetes kísérletek során a stressz generáló ágensek között felfedezett kereszttolerancia jelenségével, ezen keresztül pedig az ESR-rel.

A kísérleteinkhez *C. albicans* ATCC 14053 szülői, AF06 *tBOOH* toleráns mutáns, valamint emberi szervezetből származó klinikai izolátumok vad és oxidatív stressz toleráns

mutáns törzseket használtunk fel, amelyeket fokozatosan növekedő koncentrációjú *tBOOH*-t tartalmazó tápoldatokban való tenyésztéssel hoztak létre Fekete és mtsai (2007, 2008). Ezek a törzsek így toleránssá váltak az oxidatív stresszel szemben és antioxidáns védelmi rendszerük folyamatosan indukált. Kísérletünkben a *C. albicans* mindazon stressz hatásoknak kitettük, amelyekkel a gazdaszervezetben, illetve a szervezeten kívüli helyeken egyaránt találkozhat. Ennek érdekében a szülői és mutáns *C. albicans* törzseket oxidatív, ozmotikus, nehézfém, sejtfal, sejtmembrán, Unfolded Protein Response-t (UPR) generáló, továbbá pH, hideg és hő stresszt kiváltó ágensekkel kezeltük. A kísérletek folyamán megvizsgáltuk az egyes tenyészetekben kialakult morfológiai formákat, valamint egyes törzsekben a glükóz fogyasztást is nyomon követtük. A kísérletek során az opportunistá humán patogén *C. albicans* a következő stressz kezeléseket tettük ki:

- I. Oxidatív stressz (*tBOOH*, H_2O_2 , MSB, NaOCl)
- II. Ozmotikus stressz (NaCl, KCl, Szorbitol, Fludioxonil)
- III. Nehézfém stressz ($K_2Cr_2O_7$, $Cd(CH_3COO)_2$, $AgNO_3$)
- IV. Sejtfal stressz (Kongóvíz, Calcofluor white (CFW))
- V. Sejtmembrán stressz (Ketokonazol)
- VI. Unfolded Protein Response- t (UPR) kiváltó stressz (Dithiothreitol (DTT))
- VII. Savanyodás (pH 2.0)
- VIII. Lúgosodás (pH 10.0)
- IX. Hideg stressz ($15^{\circ}C$)
- X. Hőstressz ($42^{\circ}C$)

TDK dolgozatomban a következő kérdésekre kerestük a választ:

- (1) A kísérletek során alkalmazott stresszorok estében a *C. albicans* törzsek milyen morfológiai változáson mennek keresztül?
- (2) A *C. albicans* törzsek stressz hatására kialakult morfológiai változásai a stacioner fázisba történő lépés eredménye-e?
- (3) A *C. albicans* morfológiai átalakulása kapcsolatban van-e az általános stresszválasszal?

4. Anyag és módszer

4.1. Felhasznált törzsek

Kísérleteink során az ATCC 14053 (American Type Culture Collection) referencia törzset, a 4774, 8387, 10934, 19890, 20072 számú klinikai izolátumokat (**2. táblázat**), valamint az ezekből előállított *t*BOOH toleráns mutáns törzseket (AF06, 4774T, 8387T, 10934T, 19890T, 20072T) vizsgáltuk. A *C. albicans* klinikai izolátumok a DE-OEC Orvosi és Mikrobiológia Intézet törzsgyűjteményéből származnak. Az izolátumok különböző életkorú, nemű és betegségű személyekből származó véletlenszerű minták voltak (Fekete és mtsai, 2007, 2008). A *C. albicans* törzseket Sabouraud táptalajon (SDA; 2% glükóz, 1% mikológiai pepton, 2% agar, pH=5,6) tartottuk fenn.

2. táblázat *Candida albicans* klinikai izolátumok

Törzsek sorszáma	Beteg kora és neme	Diagnózis	Mintavételi hely
4774	42 éves nő	Keringési elégtelenség	Vizelet
8387	10 éves lány	Langerhans sejtek hisztocitózisa	Szájüreg
10934	45 éves nő	Végbélrák	Kanül
19890	59 éves nő	Trombocitopéniás trombotikus purpura	Sebváladék
20072	34 éves férfi	Pancreatitis	Hasüregi drain

4.2. A *Candida albicans* törzsek előtenyésztése

A morfológiai vizsgálatokhoz használt törzsek előtenyésztése Sabouraud dextróz tápoldatban (SDB; 2% glükóz, 1% mikológiai pepton, pH=5.6) történt. A törzseket 5 ml SDB tápoldatban 28 °C-on, 18 órán keresztül rázó inkubátorban (2.3 Hz) tenyésztettük elő. Az így előkészített kultúrákat használtuk fel a különböző stresszorokat alkalmazó kísérletekhez.

4.3. A *Candida albicans* törzsek vizsgálata

A sejteket az 4.2. pontnak megfelelően előtenyésztettük. A stressz generáló ágenst tartalmazó 20-20ml SDB tápoldatba az optikai denzitást 640 nm-en 0,1-re állítottuk be (OD_{640}), majd a tenyészeteket 12 órán át 2.3 Hz frekvenciával ráztuk. Ezután mintát vettünk az egyes lombikokból és élesztő (É), hifa (H) és pszeudohifa (PH) morfológiai formákat kerestünk fáziskontraszt mikroszkóppal (Gyetzai és mtsai, 2006). A morfológiai formák azonosítása Sudbery és mtsai (2004) módszere szerint történt. Az ATCC 14053, AF06, 19890 és a 19890T törzsek esetén 3, 6, 9 és 12 óra elteltével is nyomon követtük a sejt morfológiát (Sudbery és mtsai, 2004) és glükóz felhasználást (Erdei és mtsai, 2011).

4.3.1. A *Candida albicans* törzsek stressz kezelése

4.3.1.1. Oxidatív stressz vizsgálata

A törzseket az 4.2. pontnak megfelelően előtenyésztettük, és oxidatív stresszt kiváltó ágensekkel kezeltük a következő koncentrációkban: 1 mmol L⁻¹ tBOOH, 2 mmol L⁻¹ H₂O₂, 1,2 mmol L⁻¹ MSB és 0,08 mmol L⁻¹ NaOCl.

4.3.1.2. Ozmotikus stressz vizsgálata

Az ozmotikus stressz vizsgálatokhoz felhasznált anyagok és koncentrációjuk a következők voltak: 0,75 mol L⁻¹ NaCl, 1 mol L⁻¹ KCl, 1 mol L⁻¹ szorbitol, 10 µmol L⁻¹ fludioxonil. A fludioxonilt 100%-os szobahőmérsékletű dimetil-szulfoxidban (DMSO) oldottuk fel, és így adtuk hozzá megfelelő mennyiségben az SDB tápoldathoz.

A fludioxonil antifungális szer és egyben ozmotikus stressz mimetikum is, ugyanis az ozmotikus stresszt kiváltó ágensekkel megegyezően a Hog1 útvonalat indukálja, és növeli a sejtek glicerinné akkumulációját (Kojima és mtsai, 2006; Noguchi és mtsai, 2007).

4.3.1.3 Nehézfém kiváltotta stressz

A sejteket az 4.2. és 4.3.-s pontokban leírtak szerint tenyésztettük elő, és készítettük el a tápoldatokat. Az alkalmazott nehézfémek és koncentrációik $0,3 \text{ mmol L}^{-1} \text{ AgNO}_3$, $64 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1} \text{ Cd}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ és $0,5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ voltak.

4.3.1.4 Sejtfal, sejtmembrán és Unfolded Protein Response-t (UPR) kiváltó stressz

A sejtfal stresszt kongóvörös és calcofluor white (CFW) segítségével váltottuk ki. A festékeket a következő koncentrációban használtuk: $64 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ kongóvörös, $125 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ CFW. Az Unfolded Protein Response (UPR, kigombolyodott fehérje válasz) kiváltásához dithiothreitol (DTT) alkalmaztunk 5 mmol L^{-1} koncentrációban, desztillált vízben feloldva. A sejtmembrán stressz kiváltására $10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ koncentrációjú ketokonazol használtunk, melyet mielőtt az SDB tápoldathoz adtunk, metanolban oldottunk fel.

A CFW és a kongóvörös festékek sejtfal integritás megzavarására alkalmazhatóak. Míg a CFW a gomba sejtfal cellulózához és kitinjéhez kötődik hozzá, addig a kongóvörös hatása gombatenyészetekben sokrétű lehet: hathat a kitin szintázokra, vagy a növekedő csúcsok falára, kötődhet a glükán oldalláncok csoportjaihoz, ezáltal meggátolva a kitin mikrofibrillumokká kristályosodását és a kitin-glükán keresztkötések kialakulását (Vannini és mtsai, 1983; Roncero és Durán, 1985). Ha az endoplazmatikus retikulumban (ER) hibás fehérjék halmozódnak fel, akkor a sejt UPR-t indukál, amely az ER specifikus chaperonok akkumulációját eredményezi. A DTT gátolja a fehérjék diszulfid hídjainak kialakulását, azaz hibás fehérjék felhalmozódását fogja eredményezni az ER-ban így indukálva az UPR-t (Pollard és mtsai, 1998). A ketokonazol a gombasejt membrán permeabilitási zavarát okozza, azáltal, hogy a sejtmembrán ergoszterin bioszintézisét gátolja (Gergely, 1999).

4.3.1.5. pH, hő és hideg stressz vizsgálata

A pH vizsgálathoz az SDB tápoldatot előzetesen beállítottuk a megfelelő kémhatására. A kísérleteket lúgos (pH 10.0) és savas kémhatáson (pH 4.0) végeztük $28 \text{ }^\circ\text{C}$ -on.

A hőstressz vizsgálatokor szintén 1 ml sejtszuszpenziót adtunk 20 ml SDB tápoldathoz. A vizsgálatot $42 \text{ }^\circ\text{C}$, hideg stressz esetén $20 \text{ }^\circ\text{C}$ hőmérsékleten végeztük.

4.3.2. A *Candida albicans* törzsek morfológiai vizsgálata

A *C. albicans* ATCC 14053 szülői és AF06 mutáns, valamint a 4774, 8387, 10934, 19890 és 20072 számú klinikai izolátumokat és mutánsaikat (4774T, 8387T, 10934T, 19890T,

20072T) oxidatív, ozmotikus, nehézfém, sejtfal, sejtmembrán, Unfolded Protein Response-t kiváltó, pH, hő és hideg stressz kezelésnek tettük ki. Minden vizsgálat esetén készítettünk kontroll tenyészetet, amelynél semmilyen stresszt kiváltó ágenst nem alkalmaztunk. A *C. albicans* tenyészetekben 12 óra elteltével, míg az ATCC 14053, AF06, 19890, 19890T törzseknél 3, 6, 9 óránál is vizsgáltuk a morfológiai változásokat. A pszeudohifát a hifától a szeptumok megjelenése alapján különítettük el (Scherwitz és mtsai, 1978; Heddon és Buck, 1980; Shepherd és mtsai, 1985). A pszeudohifa és a hifa nagymértékű hasonlósága esetén a megkülönböztetés egyszerű módja a szélesség mérése, mert a pszeudohifa szélessége nagyobb, mint a hifáé. A hifa szélessége $\sim 0.2 \mu\text{m}$, a pszeudohifa minimum szélessége pedig $\sim 0.28 \mu\text{m}$ (Sudbery, 2001). A sarjadó gombasejteket pedig gömb alakú vagy ovális képletekként figyelhetjük meg (Gergely, 2003). A vizsgálatokat fáziskontraszt mikroszkóppal 40X-es nagyításon, valamint CFW festést követően UV fluoreszcens mikroszkóppal végeztük. A képeket Euromex Holland (objektív 40X0.65 fázis DM) és OLYMUS BX40 (objektív DApo 100 UV 1.30 olaj 160/017) segítségével rögzítettük.

4.3.3. Glükóz mérése vékonyréteg kromatográfia segítségével

Az ATCC 14053, AF06, 19890, 19890T törzseket 12 órán keresztül inkubáltuk a 4.3.1. pontban felsorolt körülmények között. A tenyészetekből 3, 6, 9, 12 óra elteltével mintát vettünk. A fermentléből 0,5 μl -t Hamilton fecskendő segítségével HPTLC szilika gél 60 (20x20 cm) lemezre vittünk fel. A lemezeket az alábbi közegben futtattuk meg: 30 ml diklórmétán, 25 ml metanol, 6 ml víz. Az előhívást 10 %-os kénsavas abszolút etanollal végeztük el. Száradás után a lemez 120 °C- on 5 percig hőlégsterilizátorban volt. Fényképezést követően a kiértékelés Dr. Lázár István egyetemi docens (DE-TTK Szervetlen- és Analitikai Kémia Tanszék) által kifejlesztett CpAtlas 1.0 program segítségével történt (<http://sites.google.com/site/lazaristvan99/>). A kalibrációs görbét 1,25 g/l, 2,5 g/l, 5 g/l, 10 g/l és 20 g/l glükóz standardok felhasználásával készítettük el (Erdei és mtsai, 2011).

4.4. Felhasznált vegyszerek

A kísérletekben felhasznált vegyszerek a Sigma–Aldrich Kft. (Budapest, Magyarország) és a Spektrum 3D Kft. analitikai tisztaságú termékei voltak.

5. Eredmények és értékelésük

A dolgozat célja annak megállapítása volt, hogy a különböző stresszek által kiváltott morfológiai átalakulás kapcsolatban van-e az általános stressz toleranciával. Az oxidatív, ozmotikus, nehézfém, sejtfal, sejtmembrán, Unfolded Protein Response-t (UPR) generáló, továbbá pH (sav és bázis), hideg és hő stresszt kiváltó ágensekkel kezelt *C. albicans* 4774, 8387, 10934, 20072 klinikai izolátumok és oxidatív stressztoleráns mutánsaik (4774T, 8387T, 10934T, 20072T) esetében 12 órás tenyésztést követően, az ATCC 14053, AF06, 19890, 19890T esetén pedig 3 óránként fáziskontraszt mikroszkóp alatt vizsgáltuk a kialakult jellemző morfológiai formákat (**2-4. ábra; 3, 4. táblázat**). A hifák és pszeudohifák megkülönböztetése szélességük alapján történt. A hifák szélessége 2.1–2.9 μm , a pszeudohifáké $> 3.0 \mu\text{m}$. Emellett az utóbbi négy törzsnél a glükózfogyást is nyomon követtük (**5, 6. táblázat**).

A stressz hatásoknak kitett *C. albicans* kultúrák fiziológiáját és morfológiáját az alacsony glükózfogyási ráta (**5, 6. táblázat**) és a relatív ritka élesztő→pszeudohifa/hifa (É→PH/H) morfológiai váltások jellemezték (**2-4. ábra, 3, 4. táblázat**).

Az alkalmazott stresszorok közül, csak a hőstresszt indukáló 42 °C-on figyeltük meg a glükóz teljes felhasználását, ami a stacioner fázis elérését jelzi 9h elteltével az ATCC 14053, AF06; míg a 19890T törzsnél 12h elteltével. Jelentős glükóz fogyaszt tapasztaltunk az ATCC 14053 és AF06 törzseknél oxidatív stresszt kiváló NaOCl, ozmotikus stresszt kiváló szorbitol és pH stresszt indukáló pH 10.0 esetén, illetve az AF06 törzsnél pH 4.0 értéken. A 19890 és 19890T törzs vizsgálatakor ozmotikus stresszt indukáló szorbitol és pH 10.0-nél figyeltünk meg magasabb glükóz felhasználási rátát (**5. 6. táblázat**).

A megfigyelt morfológiai változások normál esetben lassúak és 6-12 óra elteltével figyelhetők meg, kivéve hősokk esetén, ahol a hifa kialakulása kivételesen gyors és 3 órás inkubációt követően már megfigyelhető volt. Ahogy a **4. táblázatban** összefoglaltuk, a vizsgált *C. albicans* törzsek kizárólag élesztő formában növekedtek abban az esetben, ha nem volt stresszhatás, és ahogy arra számítottunk, különböző típusú környezeti stresszek váltották ki az É→PH/H morfológiai átalakulást a vad és mutáns törzsek esetén is.

A **4. táblázatban** látható, hogy a 42 °C által kiváltott É→H átalakulás minden tesztelt törzs esetén végbement a tBOOH toleranciájuktól függetlenül, és hogy a H₂O₂ és K₂Cr₂O₇ kitettség sok tenyészetben eredményezett É→PH transzformációt. Elmondható tehát, hogy a 42 °C, H₂O₂ és K₂Cr₂O₇ stresszkiváltó ágensek alakítottak ki legnagyobb arányban a fonalas morfológiát.

Az ATCC 14053 referencia törzs, az ebből előállított AF06 oxidatív stressztoleráns mutáns törzs, 4774, 8387 és 10934 klinikai izolátumok esetében ugyanazok a stresszorok váltották ki a fonalas morfológia megjelenését. A nehézfém stresszorok közül a $K_2Cr_2O_7$, az oxidatív stresszt kiváltó ágensek közül pedig a H_2O_2 alkalmazásakor figyelhető meg pszeudohifák kialakulása. A 8387T törzsnél csak a hőstressz idézi elő a hifák kialakulását, minden más stresszor esetében élesztő morfológiát láthatunk. A 4774T törzs esetén a sejtmembrán stresszt kiváltó ketokonazol hatására alakult ki pszeudohifa (**4. táblázat, 2. ábra**).

A 10934 sorszámú klinikai izolátum esetén az oxidatív stresszt kiváltó H_2O_2 és a nehézfém stresszt okozó $K_2Cr_2O_7$ alkalmazásakor alakult ki pszeudohifás forma. A 10934T oxidatív stressztoleráns mutáns törzsnél a szorbitol által kiváltott ozmotikus stressz, valamint a $K_2Cr_2O_7$ és pH 4.0 hatására fejlődik ki pszeudohifa (**4. táblázat**).

A 19890 klinikai izolátum az oxidatív stresszt kiváltó NaOCl; az ozmotikus stresszt generáló KCl; a nehézfém stresszt indukáló $K_2Cr_2O_7$ tapasztaltuk a pszeudohifa megjelenését. A 19890T számú mutáns törzs az említett stresszorok mellett még nehézfém stressz esetén alkalmazott $Cd(CH_3COO)_2$ és $K_2Cr_2O_7$ ágensek, sejtfal stresszt indukáló kongóvörös, pH10 és 20 °C esetén is kialakul a pszeudohifa. Emellett ozmotikus stresszt generáló NaCl alkalmazásakor hifa morfológiát tapasztaltunk. Szintén megfigyelhető mind a szülői, mind a mutáns törzs esetén a hőstresszt indukáló 42 °C-on a hifák megjelenése (**3. ábra, 4. táblázat**).

A 20072-es szülői és a 20072T mutáns törzsek is egymástól eltérő módon válaszoltak a különböző stresszhatásokra. A 20072 szülői törzsnél pszeudohifát generált az oxidatív stresszt kiváltó NaOCl ágens, a nehézfém stresszt indukáló $K_2Cr_2O_7$ és a sejtmembrán stresszt okozó ketokonazol. A 20072T sorszámú *tBOOH* toleráns mutáns törzs nehézfém stresszt indukáló $Cd(CH_3COO)_2$, hideg stressz kezeléskor használt 20 °C és sejtfal stresszt kiváltó ketokonazol alkalmazásakor tapasztaltuk az élesztő → pszeudohifa morfológiai átkapcsolást (**4. táblázat**).

A szerzett *tBOOH* tolerancia nem gátolta (pl. 8387 és 8387T törzsek) és nem is serkentette (pl. 19890 és 19890T törzsek) az É→PH/H átalakulását az alkalmazott számos stressz körülmény alatt, habár a legtöbb törzs és stressz esetén, amelyet teszteltünk az élesztő volt az egyetlen megfigyelhető morfológiai forma.

A fonalas morfológiai formák (pszeudohifa és hifa) előfordulásának gyakorisága nem különbözött szignifikánsan a *tBOOH* toleráns mutáns és vad törzsek esetében. A morfológia váltások százalékos aránya 17,09% mind a szülői, mind a mutáns törzseket figyelembe véve, lebontva a vad és oxidatív stressztoleráns törzsekre ez az érték a következőképpen alakul:

17,50%-ban történt morfológiai váltás a szülői törzsek esetében és 16,67%-ban a mutáns törzsek esetében (**3. táblázat**). Fontos megjegyezni, hogy a fonalas sejt morfológia (H, PH) csak kevert formában (H+É, PH+É) figyelhető meg a tanulmányozott tenyészetekben (**4. táblázat**).

A morfológiai átalakulások tehát erősen függenek az alkalmazott stressztől, és a fajon belül is eltérnek, így nem függenek a sejtek oxidatív stressz toleranciájától. Megállapítható, hogy a *C. albicans* a környezeti stresszre válaszolhat a morfológiai átalakulással, de ez stressz körülmény és törzsfüggő, azaz minden bizonnyal nincs a kereszttoleranciával összefüggésben és így nem az ESR indikátora.

3. táblázat A szülői és mutáns *Candida albicans* törzsek stresszt kiváltó ágensek hatására kialakult morfológiai formáinak százalékos eloszlása

Morfológia/Törzsek aránya (%)	Összes tesztelt törzs	Szülői	<i>t</i> BOOH toleráns mutáns
Élesztő (É)	100	100	100
Pszudohifa (PH)	11,67	11,67	11,67
Hifa (H)	5,42	5	5,83

4. táblázat A *Candida albicans* szülői és mutáns törzsek morfológiája az alkalmazott stresszt kiváltó ágensek hatására (É – élesztő, PH – pseudohifa, H – hifa).

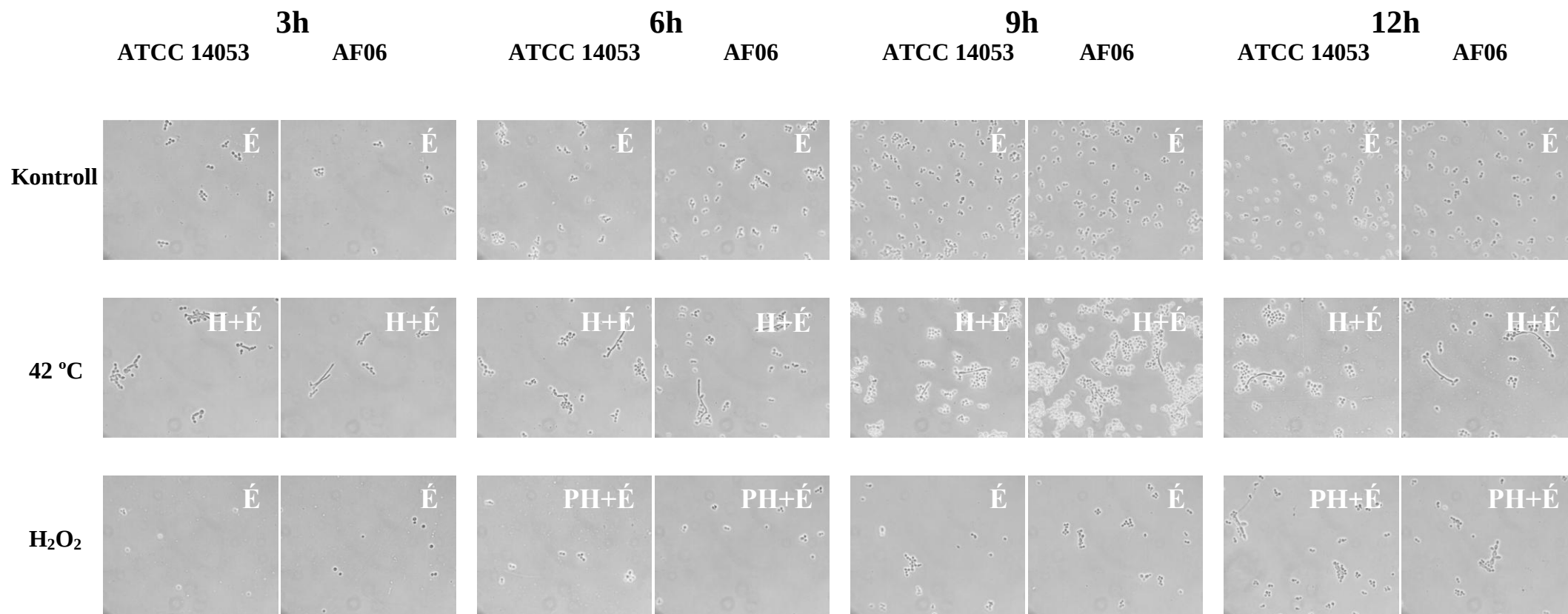
Stressz/Törzs	ATCC 14053	AF06	4774	4774T	8387	8387T	10934	10934T	19890	19890T	20072	20072T
Kontroll	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É
tBOOH	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É
H ₂ O ₂	PH+É	PH+É	PH+É	É	PH+É	É	PH+É	É	É	É	É	É
MSB	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É
NaOCl	É	É	É	É	É	É	É	É	PH+É	É	PH+É	É
KCl	É	É	É	É	É	É	É	É	PH+É	É	É	É
NaCl	É	É	É	É	É	É	É	É	É	H+É	É	É
Szorbitol	É	É	É	É	É	É	É	PH+É	É	É	É	É
Fludioxonil	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É
AgNO ₃	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É
Cd(CH ₃ COO) ₂	É	É	É	É	É	É	É	É	É	PH+É	É	PH+É
K ₂ Cr ₂ O ₇	PH+É	PH+É	PH+É	É	PH+É	É	PH+É	PH+É	PH+É	PH+É	PH+É	É
CFW	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É
Kongóvíörös	É	É	É	É	É	É	É	É	É	PH+É	É	É
Ketokonazol	É	É	É	PH+É	É	É	É	É	É	É	PH+É	PH+É
DTT	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É
pH 4.0	É	É	É	É	É	É	É	PH+É	É	É	É	É
pH 10.0	É	É	É	É	É	É	É	É	É	PH+É	É	É
20°C	É	É	É	É	É	É	É	É	É	PH+É	É	PH+É
42°C	H+É	H+É	H+É	H+É	H+É	H+É	H+É	H+É	H+É	H+É	H+É	H+É

5. táblázat A maradék glükóz koncentráció (zöld, mmol l⁻¹) és a morfológia (piros) változása az időben a különböző stresszhatásoknak kitett *Candida albicans* törzsek (ATCC 14053, AF06) esetén (É – élesztő, PH – pseudohifa, H – hifa). A kezdeti glükóz koncentráció 20 mmol l⁻¹.

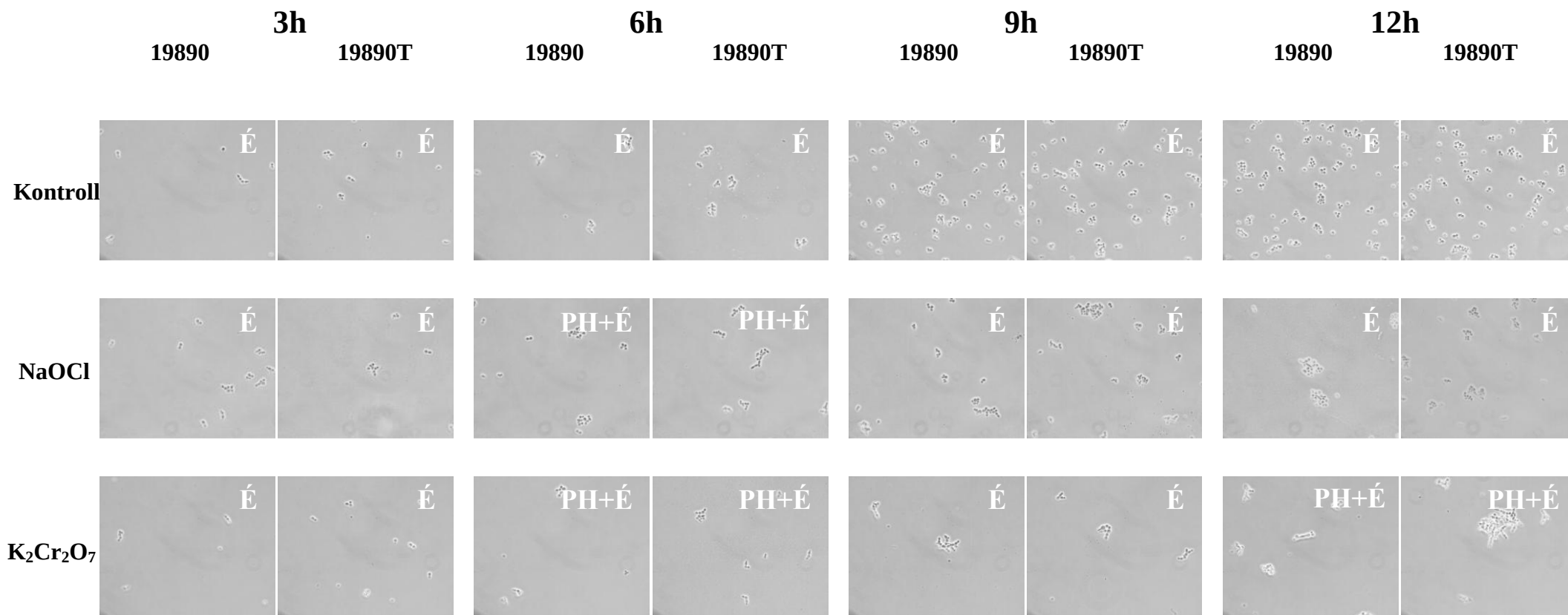
Stressz/Törzs	ATCC 14053					AF06			
Kitettség ideje	3h	6h	9h	12h		3h	6h	9h	12h
Kontroll	18.0, É	16.2, É	13.3, É	4.8, É		15.8, É	14.37, É	11.63, É	7.46, É
tBOOH	18.596, É	17.146, É	15.021, É	12.628, É		16.055, É	14.209, É	12.664, É	11.547, É
H ₂ O ₂	18.937, É	17.559, É	14.833, PH+É	9.467, PH+É		19.053, É	16.036, É	13.085, PH+É	6.712, PH+É
MSB	18.947, É	18.254, É	17.425, É	14.899, É		16.082, É	15.47, É	12.081, É	9.279, É
NaOCl	15.284, É	14.335, É	9.151, É	1.945, É		13.001, É	9.971, É	8.09, É	3.994, É
KCl	14.244, É	14.214, É	13.992, É	13.474, É		15.924, É	14.841, É	14.0, É	13.919, É
NaCl	18.791, É	15.354, É	13.665, É	10.575, É		18.549, É	14.729, É	12.427, É	10.112, É
Szorbitol	10.615, É	8.171, É	7.64, É	2.175, É		10.206, É	9.311, É	7.713, É	4.367, É
Fludioxonil	18.095, É	16.501, É	14.885, É	11.64, É		15.16, É	14.846, É	13.629, É	9.798, É
AgNO ₃	18.007, É	17.532, É	12.528, É	10.569, É		18.182, É	17.0, É	11.89, É	9.967, É
Cd(CH ₃ COO) ₂ x2H ₂ O	15.425, É	12.645, É	11.47, É	11.199, É		18.936, É	14.542, É	14.056, É	13.189, É
K ₂ Cr ₂ O ₇	16.005, É	15.552, É	12.955, PH+É	10.477, PH+É		15.325, É	14.948, É	11.078, PH+É	9.566, PH+É
CFW	19.249, É	18.398, É	17.692, É	8.471, É		19.04, É	18.116, É	17.159, É	9.876, É
Kongóvíörös	18.628, É	16.773, É	16.216, É	14.323, É		17.697, É	16.556, É	15.762, É	13.588, É
Ketokonazol	17.04, É	16.742, É	15.465, É	13.367, É		16.809, É	15.381, É	14.632, É	11.871, É
DTT	14.845, É	13.699, É	12.327, É	10.251, É		16.19, É	15.45, É	14.43, É	13.583, É
pH 4.0	17.144, É	17.038, É	14.188, É	8.149, É		18.556, É	17.853, É	14.862, É	4.597, É
pH 10.0	13.73, É	12.32, É	9.682, É	4.47, É		14.802, É	13.466, É	9.788, É	1.985, É
20 °C	18.619, É	18.407, É	17.179, É	15.996, É		18.952, É	18.117, É	16.776, É	14.714, É
42 °C	17.637, H+É	10.565, H+É	<1.25 H+É	<1.25, H+É		19.705, H+É	10.584, H+É	< 1.25, H+É	< 1.25, H+É

6. táblázat A maradék glükóz koncentráció (zöld, mmol l⁻¹) és a morfológia (piros) változása az időben a különböző stresszhatásoknak kitett *Candida albicans* törzsek (19890, 19890T) esetén (É – élesztő, PH – pseudohifa, H – hifa). A kezdeti glükóz koncentráció 20 mmol l⁻¹.

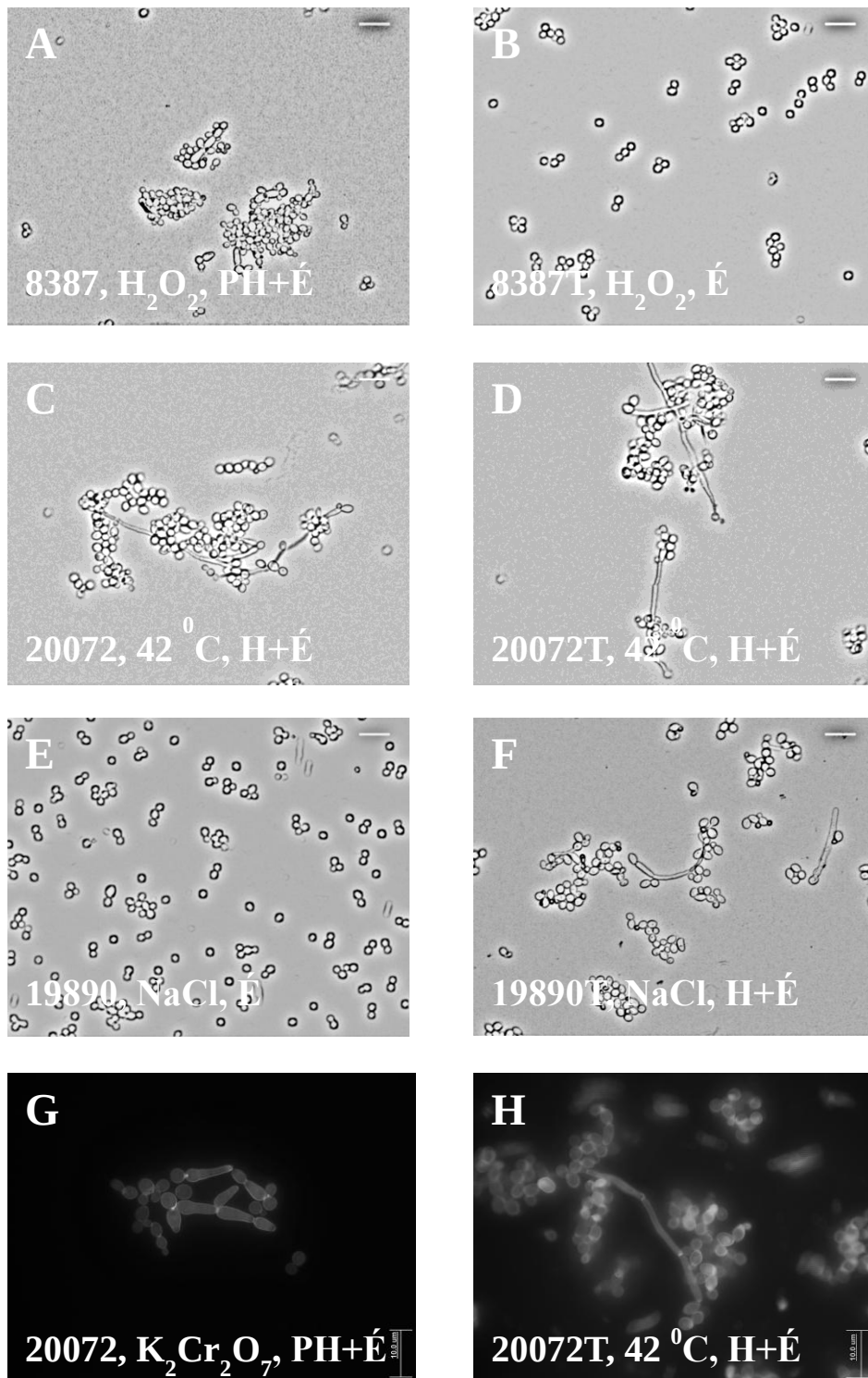
Stressz/Törzs	19890					19890T			
Kitettség ideje	3h	6h	9h	12h		3h	6h	9h	12h
Kontroll	17.858, É	16.371, É	13.34, É	10.196, É		17.371, É	15.54, É	13.83, É	5.65, É
tBOOH	16.652, É	15.911, É	15.453, É	15.324, É		18.339, É	17.768, É	16.802, É	15.78, É
H ₂ O ₂	17.99, É	15.24, É	14.21, É	13.11, É		16.58, É	15.3, É	13.82, É	12.22, É
MSB	17.469, É	14.401, É	13.972, É	12.49, É		17.557, É	16.519, É	12.367, É	11.287, É
NaOCl	18.592, É	17.33, É	14.1, PH+É	9.665, PH+É		18.395, É	16.172, É	14.96, É	9.771, É
KCl	16.34, É	14.79, É	14.45, É	13.046, PH+É		16.03, É	14.75, É	13.74, É	12.21, É
NaCl	16.732, É	14.854, É	13.13, É	12.76, É		16.175, É	14.04, É	12.622, H+É	12.26, PH+É
Szorbitol	7.37, É	6.924, É	6.57, É	5.32, É		6.064, É	5.395, É	5.195, É	3.35, É
Fludioxonil	19.006, É	15.793, É	13.679, É	12.343, É		19.771, É	15.862, É	10.674, É	6.974, É
AgNO ₃	18.789, É	16.207, É	13.998, É	12.391, É		17.806, É	15.361, É	13.359, É	11.47, É
Cd(CH ₃ COO) ₂ x2H ₂ O	14.01, É	13.29, É	12.33, É	11.72, É		18.04, É	17.205, É	15.514, PH+É	14.973, PH+É
K ₂ Cr ₂ O ₇	19.01, É	18.24, É	17.24, PH+É	15.33, PH+É		18.05, É	16.446, É	14.455, PH+É	13.501, PH+É
CFW	18.788, É	17.49, É	15.756, É	14.504, É		19.19, É	16.86, É	13.64, É	7.24, É
Kongóvíörös	16.407, É	15.57, É	13.833, É	12.95, É		13.87, É	12.4, É	12.073, É	9.155, PH+É
Ketokonazol	18.197, É	14.472, É	13.154, É	11.993, É		16.141, É	14.025, É	12.549, É	11.872, É
DTT	12.23, É	10.91, É	8.9, É	8.63, É		18.246, É	17.266, É	16.54, É	13.105, É
pH 4.0	19.116, É	15.925, É	15.18, É	14.02, É		19.2, É	15.187, É	13.31, É	6.29, É
pH 10.0	11.13, É	8.2, É	7.85, É	7.14, É		10.77, É	7.61, É	6.52, PH+É	5.56, PH+É
20 °C	19.961, É	18.828, É	16.919, É	15.209, É		19.102, É	17.859, É	16.446, PH+É	15.123, PH+É
42 °C	18.496, H+É	15.246, H+É	13.525, H+É	11.062, H+É		15.736, H+É	14.047, H+É	4.45, H+É	<1.25, H+É



2. ábra A *Candida albicans* ATCC 14053 és AF06 morfológiája stresszmentes körülmények között, valamint hőstresszt indukáló 42 °C és oxidatív stresszt kiváltó H₂O₂ kezelés esetén (É – élesztő, PH – pseudohifa, H – hifa).



3. ábra A *Candida albicans* 19890 és 19890T morfológiája stresszmentes körülmények között, valamint oxidatív stresszt kiváló NaOCl és nehézfém stresszt kiváltó K₂Cr₂O₇ kezelés esetén (É – élesztő, PH – pszeudohifa, H – hifa).



4. ábra A stressznek kitett *Candida albicans* törzsek tipikus morfológiai formái fáziskontraszt mikroszkóp (A – F; scale bar: 20 µm) és UV fluoreszcens mikroszkóp (G és H; scale bar: 10 µm;) alatt (É – élesztő, PH – pseudohifa, H – hifa).

6. Összefoglalás

A *Candida albicans* az emberi szervezetben tápanyag limitációnak, pH és hőmérséklet ingadozásnak, ozmotikus stressznek, toxinok jelenlétének, az immunrendszer támadásainak van kitéve. Ezért kifejlesztett egy védelmi mechanizmust, mellyel állandóan ellenőrzi a környezetét, hogy alkalmazkodni tudjon a környezeti stresszhatásokhoz. Ezt az egyedülálló védelmi rendszert nevezzük környezeti stresszválasznak (ESR; Gasch, 2007). A dimorf gomba élesztő és hifa formában egyaránt megtalálható szervezetünkben, valamint átmeneti formaként megfigyelhető a pseudohifa (Sudbery és mtsai, 2004). A morfológiai váltás a gomba szervezetben történő kolonizációhoz szükséges (Mavor és mtsai, 2005, Gasch 2007).

Korábbi tanszéken elvégzett kísérletekhez *tBOOH* toleráns *C. albicans* törzseket használtunk fel a kereszttolerancia és az ESR jelenlétének bizonyítására. Az előzetes eredményeink szerint az oxidatív stressz toleráns *C. albicans* mutánsok esetén kialakul a kereszttolerancia, ami az ESR jelenlétére utal. Az általunk alkalmazott stresszorok és ugyanezen *tBOOH* toleráns *C. albicans* törzsek felhasználásával vizsgáltuk a különböző stresszhatásokra kialakult morfológiákat, amellyel választ kaphatunk a kérdésre, miszerint a morfológiai váltás összefüggésben van-e a kereszttolerancia jelenségével, tehát az ESR-rel.

Ennek érdekében *C. albicans* szülői, illetve oxidatív stressz toleráns mutáns törzseket oxidatív, ozmotikus, nehézfém, sejtfal, sejtmembrán, UPR-t generáló, hő, hideg és pH stressz kezelésnek tettük ki, majd vizsgáltuk a kialakult morfológiát. A stresszorok alkalmazásakor a *C. albicans* törzseket alacsony glükózfogyási rátával jellemezhetőek. A stresszmentes tenyészetekben kizárólag élesztő sejteket figyeltünk meg, a stresszorok alkalmazása pedig eltérő esetekben váltott ki É→PH/H morfológiai változást. A tesztelt stresszkörülmények közül, a 42 °C-os hőstressz, valamint a $K_2Cr_2O_7$ és H_2O_2 kezelések váltották ki leggyakrabban a fonalas morfológiát (H, PH). Látható, hogy a morfológiai átalakulások erősen függenek az alkalmazott stressztől, és a fajon belül is eltérnek, nem függenek a sejtek oxidatív stressz toleranciájától.

A szerzett *tBOOH* tolerancia nem gátolta és nem is serkentette az É→PH/H átalakulást számos alkalmazott stressz körülmény alatt, ugyanis a fonalas morfológiai formák (PH, H) előfordulásának gyakorisága nem különbözött szignifikánsan a *tBOOH* toleráns mutáns és vad törzseknél. A morfológia váltások százalékos aránya 17,50% a szülői és 16,67% a mutáns törzsek esetében. Fontos megjegyezni, hogy a fonalas sejt morfológia (H, PH) csak kevert formában (H+É, PH+É) figyelhető meg a tanulmányozott tenyészetekben.

A morfológiai átalakulások tehát erősen függenek az alkalmazott stressztől, és a fajon belül is eltérnek, így nem függenek a sejtek oxidatív stressz toleranciájától.

Gasch (2007) és Enjalbert és mtsai (2006) megállapítása miszerint a gomba környezeti stresszre morfológiai változással válaszol az ESR használata helyett, nem helytálló. A dolgozatban összefoglalt eredményinkből ugyanis megállapítható, hogy a *C. albicans* a környezeti stresszre válaszolhat morfológiai átalakulással, de ez stressz körülmény és törzsfüggő, azaz minden bizonnyal nincs a kereszttoleranciával összefüggésben és így nem az ESR indikátora.

7. Irodalom

Berry, D.B., Gasch, A.P., 2008. Stress-activated genomic expression changes serve a preparative role for impending stress in yeast. *Mol. Biol. Cell*, **19**, 4580-4587.

Berry, D.B., Guan, Q., Hose, J., Haroon, S. *et al.*, 2011. Multiple means to the same end: the genetic basis of acquired stress resistance in yeast. *PLoS Genet.*, **7**, e1002353.

Brauer, M.J., Huttenhower, C., Airoidi, E.M., Rosenstein, R. *et al.*, 2008. Coordination of growth rate, cell cycle, stress response, and metabolic activity in yeast. *Mol. Biol. Cell*, **19**, 352-367.

Castrillo, J.I., Zeef, L.A., Hoyle, D.C., Zhang, N. *et al.*, 2007. Growth control of the eukaryote cell: a systems biology in yeast. *J. Biol.*, **6**, 4.

Castro, F.A., Mariani, D., Panek, A.D., Eleutherio, E.C.A., Pereira, M.D., 2008. Cytotoxicity mechanism of two naphthoquinones (menadione and plumbagin) in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS ONE*, **3**, e3999.

Causton, H.C., Ren, B., Koh, S.S., Harbison, C.T. *et al.*, 2001. Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. *Mol. Biol. Cell*, **12**, 323-337.

Collinson, L.P., Dawes, I.W., 1992. Inducibility of the response of yeast cells to peroxide stress. *J. Gen. Microbiol.*, **138**, 329-335.

Coote, P.J., Cole, M.B., Jones, M.V., 1991. Induction of increased thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae* may be triggered by a mechanism involving intracellular pH. *J. Gen. Microbiol.*, **137**, 1701-1708.

Enjalbert, B., Nantel, A., Whiteway, M., 2003. Stress-induced gene expression in *Candida albicans*: absence of a general stress response. *Mol. Biol. Cell*, **14**, 1460-1467.

Enjalbert, B., Smith, D.A., Cornell, M.J., Alam, I. *et al.*, 2006. Role of the Hog1 stress-activated protein kinase in the global transcriptional response to stress in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Mol. Biol. Cell*, **17**, 1018-1032.

Erdei, E., Molnar, M., Gyemant, G., Antal, K. *et al.*, 2011. Trehalose overproduction affects the stress tolerance of *Kluyveromyces marxianus* ambiguously. *Bioresour. Technol.*, **102**, 7232-7235.

Ernst J.F., 2000. Transcription factors in *Candida albicans* – environmental control of morphogenesis. *Microbiology* **146**(8), 1763-1774.

Estruch, F., 2000. Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS Microbiol. Rev.*, **24**, 469-486.

Fekete, A., Emri, T., Gyetvai, A., Gazdag, Z. *et al.*, 2007. Development of oxidative stress tolerance resulted in reduced ability to undergo morphologic transitions and decreased pathogenicity in a t-butylhydroperoxide-tolerant mutant of *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res.*, **7**, 834-847.

Fekete, A., Pocsi, I., Emri, T., Gyetvai, A. *et al.*, 2008. Physiological and morphological characterization of tert-butylhydroperoxide tolerant *Candida albicans* mutants. *J. Basic Microbiol.*, **48**, 480-487.

Flattery-O'Brian, J., Collinson, L.P., Dawes, I.W., 1993. *Saccharomyces cerevisiae* has an inducible response to menadione which differs that to hydrogen peroxide. *J. Gen. Microbiol.*, **139**, 501-507.

Fradin, C., De Groot, P., MacCallum, D., Schaller, M. *et al.*, 2005. Granulocytes govern the transcriptional response, morphology and proliferation of *Candida albicans* in human blood. *Mol. Microbiol.*, **56**, 397-415.

Fujs, S., Ekert, M., Scancar, J., Raspor, P., 2007. Induced crossprotection responses against Cr(III) and Fe(III) ions in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Basic Microbiol.*, **47**, 301-308.

Gasch, A.P., Spellman, P.T., Kao, C.M., Carmel-Harel, O. *et al.*, 2000. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol. Biol. Cell*, **11**, 4241-4257.

Gasch, A.P., 2007. Comparative genomics of the environmental stress responses in ascomycete fungi. *Yeast*, **24**, 961-976.

Gergely L., 2003. Orvosi mikrobiológia. Semmelweis Kiadó, Budapest 471-507.

Gow, N.A.R., 2002. *Candida* and Candidiasis. (Calderone, R., ed.) pp. 145-148, American Society for Microbiology, Washington

Gyetvai, A., Emri, T., Takacs, K., Dergez, T. *et al.*, 2006. Lovastatin possesses a fungistatic effect against *Candida albicans*, but does not trigger apoptosis in this opportunistic human pathogen. *FEMS Yeast Res.*, **6**, 1140-1148.

Hawksworth D.L., Kirk P.M., Sutton B.C., Pegler D.N., 1995. *Ainsworth and Bigsby Dictionary of the Fungi*, 8th edn. CAB International: Oxford, UK

Heddon, D.M., Buck, J.D., 1980. A re-emphasis – germ tubes diagnostic for *Candida albicans* have no constrictions. *Mycopathologia*, **70**, 95-110

Hortobágyi, T., 1986. *Agrobotanika*. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest, 295.

Jamieson, D.J., 1992. *Saccharomyces cerevisiae* has distinct adaptive responses to both hydrogen peroxide and menadione. *J. Bacteriol.*, **174**, 6678–6681.

Jamieson, D.J., Stephen, D.W., Terriere, E.C., 1996. Analysis of the adaptive oxidative stress response of *Candida albicans*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **138**, 83-8.

Keszenman, D.J., Candreva, E.C., Sanchez, A.G., Nunes, E., 2005. RAD6 gene is involved in heat shock induction of bleomycin resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Environ. Mol. Mutagen*, **45**, 36-43.

Kojima, K., Bahn, Y.S., Heitman, J., 2006. Calcineurin, Mpk1 and Hog1 MAPK pathways independently control fludioxonil antifungal sensitivity in *Cryptococcus neoformans*. Microbiology. **152**, 591-604

Kullberg, B.J., Oude Lashof, A.M., 2002. Epidemiology of opportunistic invasive mycoses. Eur. J. Med. Res., **7**, 183-191.

Lewis, J.G., Learmonth, R.P., Watson, K., 1995. Induction of heat, freezing and salt tolerance by heat and salt shock in *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiology, **141**, 687-694.

Lu, C., Brauer, M.J., Botstein, D., 2009. Slow growth induces heat-shock resistance in normal and respiratory-deficient yeast. Mol. Biol. Cell, **20**, 891-903.

Mavor, A.L., Thewes, S., Hube, B., 2005. Systemic fungal infections caused by *Candida* species: epidemiology, infection process and virulence attributes. Curr. Drug Targets, **6**, 863-874.

Noguchi, R., Banno, S., Ichikawa, R., Fukumori, F., Ichiishi, A., Kimura, M., Yamaguchi, I. and Fujimura, M., 2007. Identification of OS-2 MAP kinase-dependent genes induced in response to osmotic stress, antifungal agent fludioxonil, and heat shock in *Neurospora crassa*. Fungal Genet Biol **44**, 208-218

Odds, F.C., 1988. *Candida and Candidosis*, 2nd ed., Bailliere Tindall, London.

Palhano, F.L., Orlando, M.T.D., Fernandes, P.M.B., 2004. Induction of baroresistance by hydrogen peroxide, ethanol and cold-shock in *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiol. Lett., **233**, 139-145.

Park, J.I., Grant, C.M., Attfield, P.V., Dawes, I.W., 1997. The freezethaw stress response of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is growth phase specific and is controlled by nutritional state via the RAS-cyclic AMP signal transduction pathway. Appl. Environ. Microbiol., **63**, 3818-3824.

Pereira, M.D., Eleutherio, E.C.A., Panek, A.D., 2001. Acquisition of tolerance against oxidative damage in *Saccharomyces cerevisiae*. BMC Microbiol., **1**, 11.

Pfaller, M.A., Jones, R.N., Doern, G.V., Sader, H.S., Messer, S.A., Houston, A., *et al.*, 2000. Bloodstream infections due to *Candida* species: SENTRY antimicrobial surveillance program in North America and Latin America, 1997-1988. Antimicrob Agents Chemother **44**, 747-751.

Pollard, M.G., Travers, K.J., Weissman, J.S., 1998. Ero1p: a novel and ubiquitous protein with an essential role in oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum. Mol Cell. **1**, 171-182

Roncero, C., Durán, A., 1985. Effect of Calcofluor white and Congo red on fungal cell wall morphogenesis: in vivo activation of chitin polymerization. J Bacteriol. **163**, 1180-1185.

Schuller, C., Brewster, J.L., Alexander, M.R., Gustin, M.C., Ruis, H., 1994. The HOG pathway controls osmotic regulation of transcription via the stress response element (STRE) of the *Saccharomyces cerevisiae* CTT1 gene. EMBO J., **13**, 4382-4389.

Shepherd M.G., Poulter, R.T.M., Sullivan, P.A., 1985. *Candida albicans*: biology, genetics and pathogenicity. Annual Review of Microbiology, **39**, 579-614.

Shepherd M.G., 1988. Morphogenic transformation of fungi. In Current Topics in Medical Mycology, vol. 2, pp. 278-304. Edited by M.R. McGinnis. New York: Springer-Verlag.

Slavov, N., Macinskas, J., Caudy, A., Botstein, D., 2011. Metabolic cycling without cell division cycling in respiring yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **108**, 19090-19095.

Slavov, N., Airoidi, E.M., van Oudenaarden, A., Botstein, D., 2012. A conserved cell growth cycle can account for the environmental stress responses of divergent eukaryotes. Mol. Biol. Cell, **23**, 1986-1997.

Smith, D.A., Nicholls, S., Morgan, B.A., Brown, A.J.P., Quinn, J., 2004. A conserved stress-activated protein kinase regulates a core stress response in the human pathogen *Candida albicans*. *Mol. Biol. Cell*, **15**, 4179-4190.

Sudbery, P.E., 2001. The germ tubes of *Candida albicans* hyphae and pseudohyphae show different patterns of septic ring localisation. *Mol. Microbiol.*, **41**, 19-31.

Sudbery, P., Gow, N., Berman, J., 2004. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol.*, **12**, 317-324.

Scherwitz C., Martin R., Ueberberg H., 1978. Ultrastructural investigations of the formation of *Candida albicans* germ tubes and septa. *Sabouraudia*, **16**, 115-124.

Szentirmai A., 1996. A mikrobiológia alapjai. Kossuth Egyetemi Kiadó, Debrecen, 387-389.

Trollmo, C., Andre, L., Blomberg, A., Adler, L., 1988. Physiological overlap between osmotolerance and thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **56**, 321-326.

Vannini, G. L., Poli, F., Donini, A., Pancaldi, S., 1983. Effects of Congo red on wall synthesis and morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Sci. Lett.* **31**, 9-17

Westwater, J., McLaren, N.F., Dormer, U.H., Jamieson, D.J., 2002. The adaptive response of *Saccharomyces cerevisiae* to mercury exposure. *Yeast*, **19**, 233-239.

Whiteway, M., Nantel, A., 2006. Genomic analysis of cellular morphology in *Candida albicans*. In: Brown, A.J.P. (ed.), *The Mycota XIII*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 147-159.

Zakrzewska, A., van Eikenhorst, G., Burggraaff, J.E.C., Vis, D.J. *et al.*, 2011. Genome-wide analysis of yeast stress survival and tolerance acquisition to analyze the central trade-off between growth rate and cellular robustness. *Mol. Biol. Cell*, **22**, 4435-4446.

A TDK alapjául szolgáló tudományos közlemény, poszter:

- (1) Jakab, Á., Karányi, Zs., **Kiss, Á.** & Pócsi, I. (2012) Increased oxidative stress tolerance results in general stress tolerance in *Candida albicans* independently of stress-elicited morphological transitions. *Journal of Basic Microbiology* (közlésre benyújtva).
- (2) Jakab, Á., Karányi, Zs., **Kiss, Á.**, Pócsi, I., Pócsi, I. (2012) Morphological transitions represent no alternative to environmental stress response in *Candida albicans*. *Mikológiai közlemények Clusiana* 51, 96-97. V Hungarian Conference of Mycology, Budapest, Hungary.

Köszönetnyilvánítás

Köszönetem szeretném kifejezni Prof. Dr. Pócsi István tanszékvezető egyetemi tanárnak, hogy a Debreceni Egyetem Természettudományi és Technológiai Kar Mikrobiális Biotechnológiai és Sejtbiológiai Tanszéken lehetővé tette TDK dolgozatom elkészítését és témavezetőként szakmai útmutatást adott.

Köszönettel tartozom Jakab Ágnes Ph.D hallgatónak (DE TTK Mikrobiális Biotechnológiai és Sejtbiológiai Tanszék), aki a labormunkák során, az adatok kiértékelésében, valamint a dolgozat elkészítésében is segítséget és támogatást nyújtott.

Köszönetet szeretnék mondani Pócsi Imre laboránsnak a dolgozatom elkészítéséhez szükséges labormunka során adott szakmai segítségéért és hasznos tanácsaiért.

Szeretném köszönetemet kifejezni Pálfalviné Dr. Fekete Andreának (DE OEC Belgyógyászati Intézet III. számú Belgyógyászati Klinika) az általa előállított *C. albicans* mutáns törzsekért.

Végül pedig köszönet illeti tanszékünk összes dolgozóját segítőkészségükért.

Nyilatkozat a pályázó egyéni hozzájárulásáról a pályaműben leírt eredményekhez

Alulírott..... jelen nyilatkozat aláírásával kijelentem, hogy a „*A Candida albicans* morfológiai átalakulása, mint nem általános környezeti stresszválasz” című TDK dolgozat önálló munkám, a dolgozat készítése során betartottam a szerzői jogról szóló 1999. évi LXXVI. tv. szabályait, valamint a Debreceni Egyetem által előírt, a dolgozat készítésére vonatkozó szabályokat, különösen a hivatkozások és idézések tekintetében.

Kijelentem továbbá, hogy a dolgozat készítése során az önálló munka tekintetében a témavezetőket nem tévesztettem meg. Meg nem engedett segítséget nem vettem igénybe, a dolgozatot szakdolgozatként vagy diplomamunkaként nem nyújtottam be.

Jelen nyilatkozat aláírásával tudomásul veszem, hogy amennyiben bizonyítható, hogy a dolgozatot nem magam készítettem, vagy a dolgozattal kapcsolatban szerzői jogsértés ténye merül fel, viselem a szerzői jogsértés miatt fellépő (polgári jog, szabálysértési jog, büntetőjogi) jogkövetkezményeket.

Debrecen, év hó nap

.....

Aláírás

Alulírott témavezető kijelentem, hogy az ezúton benyújtott dolgozat az én szakmai irányításommal, a jelölttel folytatott rendszeres szakmai konzultáció mellett készült, a hallgató önálló munkáját tükrözi.

Debrecen, év hó nap

.....

Témavezető aláírása

.....

Témavezető aláírása