

**AZ ANTIFUNGÁLIS REZISZTENCIA ÉS A  
VIRULENCIA ÖSSZEFÜGGÉSÉNEK VIZSGÁLATA  
*CANDIDA PARAPSILOSIS*-BAN**

**DOKTORI ÉRTEKEZÉS**

**PAPP CSABA GERGŐ**

**TÉMAVEZETŐ: PROF. DR. GÁCSER ATTILA  
EGYETEMI TANÁR**

**BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA**



**SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM  
TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS INFORMATIKAI KAR  
MIKROBIOLÓGIAI TANSZÉK  
SZEGED**

**2018**

## Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke .....	3
2. Bevezetés .....	5
3. Irodalmi áttekintés .....	7
3.1. A gombafertőzések jelentősége .....	7
3.2. A <i>Candida</i> fajok epidemiológiája .....	9
3.3. A <i>Candida</i> parapsilosis jelentősége .....	10
3.4. A <i>Candida</i> sejtek antifungális terápia szempontjából lényeges sajátosságai .....	11
3.4.1. Gomba membrán és ergoszterol szintézis .....	11
3.4.2. Gomba sejtfa.....	14
3.5. Legfontosabb antifungális szerek és hatásmechanizmusuk.....	17
3.5.1. Amfotericin B .....	18
3.5.2. Triazolok.....	20
3.5.3. Echinokandinok .....	21
3.5.4. Az antifungális terápia gyakorlata .....	21
3.6. A <i>Candida</i> nemzetség antifungális szerekkel szemben mutatott rezisztencia mechanizmusai .....	23
3.6.1. Amfotericin B rezisztencia mechanizmusok .....	24
3.6.2. Triazol rezisztencia mechanizmusok .....	25
3.6.3. Echinokandin rezisztencia mechanizmusok .....	26
4. Célkitűzések .....	29
5. Anyagok és módszerek .....	30
5.1. Anyagok.....	30
5.1.1. Felhasznált törzsek .....	30
5.1.2. Alkalmazott primer sejtek és sejtvonalak .....	31
5.1.3. Táptalajok, tápoldatok, egyéb oldatok.....	31
5.1.4. <i>C. parapsilosis</i> <i>CDR1-2</i> KO mutáns létrehozásához használt anyagok.....	33
5.1.5. Abiotikus stressz vizsgálatához használt táptalajok .....	36
5.1.6. Genom szekvenálás során felhasznált kitek .....	38
5.1.7. Fagocitózis kísérlet során alkalmazott anyagok .....	39
5.1.8. <i>In vivo</i> kísérletekben alkalmazott állatok .....	39
5.2. Módszerek .....	39
5.2.1. <i>C. parapsilosis</i> GA1 törzs transzformálása .....	39
5.2.2. Southern hibridizáció.....	40
5.2.3. <i>C. parapsilosis</i> törzsek antifungális érzékenységének meghatározása .....	40
5.2.4. Echinokandin- és azol evolvált törzsek létrehozása .....	41
5.2.5. Abiotikus stressztolerancia vizsgálata .....	42
5.2.6. Humán PBMC izolálás és PBMC-DM differenciáltatás .....	42
5.2.7. Azol evolvált törzsekkel szembeni fagocitózis hatékonyság vizsgálata.....	43
5.2.8. Gomba eliminációs hatékonyság vizsgálat a <i>C. parapsilosis</i> <i>cdr1-2</i> KO törzssel szemben .....	43
5.2.9. <i>Galleria mellonella</i> , nagy viaszmosoly lárva fertőzése .....	44
5.2.10. <i>In vivo</i> egér fertőzési modell .....	44
5.2.11. Etikai engedély .....	45
5.2.12. Ergoszterol és köztitermékeinek meghatározása LC-MS használatával .....	45
5.2.13. Sejtfa összetétel vizsgálata .....	45
5.2.14. Felszíni kitin és $\beta$ -1,3-glükán fél-quantitatív meghatározása fluoreszcens festéssel.....	46
5.2.15. Teljes genom szekvenálás analízise.....	46

5.2.16. Bioinformatikai eljárások .....	47
5.2.17. Statisztikai analízis .....	47
6. Eredmények.....	48
6.1. <i>C. parapsilosis cdr1-2</i> deléció duplamutáns jellemzése.....	48
6.1.1. <i>C. parapsilosis cdr1-2</i> KO mutáns létrehozása .....	48
6.1.2. <i>C. parapsilosis cdr1-2</i> KO mutáns törzs antifungális szerekekkel szembeni érzékenysége.....	49
6.1.3. Gazdasejtek gomba eliminációs hatékonysága a <i>C. parapsilosis cdr1-2</i> KO mutánsal szemben .....	50
6.1.4. <i>C. parapsilosis cdr1-2</i> KO mutáns virulencia vizsgálata <i>in vivo</i> egér modellben .....	51
6.2. Echinokandin evolvált <i>C. parapsilosis</i> törzsek jellemzése .....	52
6.2.1. Echinokandin evolvált <i>C. parapsilosis</i> törzsek érzékenysége antifungális szerekekkel szemben .....	52
6.2.2. Echinokandin evolvált <i>C. parapsilosis</i> abiotikus stressztolerancia vizsgálata..	54
6.2.3. <i>In vivo</i> virulencia vizsgálat <i>Galleria mellonella</i> és egér fertőzési modell segítségével.....	56
6.2.4. Echinokandin evolvált törzsekkel szembeni fagocitózis hatékonyság.....	58
6.2.5. Echinokandin evolvált törzsek sejtfalet összetétele és belső sejtfalet komponensek felszíni megjelenése.....	59
6.2.6. Genomszekvenálást követő aminosav változások meghatározása az echinokandin evolvált törzsek Fks1 fehérje szekvenciáiban, illetve az Fks1 protein topológiájának előrejelzése.....	61
6.3. Triazol evolvált <i>C. parapsilosis</i> törzsek jellemzése .....	63
6.3.1. Triazol evolvált <i>C. parapsilosis</i> törzsek érzékenysége antifungális szerekekkel szemben .....	64
6.3.2. Triazol evolvált <i>C. parapsilosis</i> abiotikus stressztolerancia vizsgálata.....	66
6.3.3. J774.2 makrofág sejtek fagocitózis hatékonysága triazol evolvált törzsekkel szemben .....	67
6.3.4. <i>In vivo</i> virulencia vizsgálat <i>Galleria mellonella</i> fertőzési modellben.....	69
6.3.5. Genomszekvenálás és az aminosav szubsztitúciók meghatározása a triazol evolvált törzsek rezisztencia szempontjából lényeges fehérjéinek elsődleges szerkezetében.....	70
6.3.6. Különbségek vizsgálata a vad típusú CLIB 214 és POS <sup>EVO</sup> törzsek szerkezetében .....	71
7. Diskusszió.....	74
8. Összefoglalás.....	79
9. Summary.....	82
10. Irodalomjegyzék .....	85
11. Köszönetnyilvánítás.....	97

## 1. Rövidítések jegyzéke

ABC	ATP kötő kazetta ( <i>ATP binding cassette</i> )
ABPA	Allergiás bronhoalveoláris tüdő aszpergillózis ( <i>Allergic bronchoalveolar pulmonary aspergillosis</i> )
AmB	<u>A</u> mfhotericin <u>B</u>
AND <sup>ADP</sup>	<u>A</u> nidulafungin <u>a</u> daptált
AND <sup>EVO</sup>	<u>A</u> nidulafungin <u>e</u> volvált
BALB/c	<u>B</u> agg <u>a</u> lbino (egér törzs)
BLAST	<u>B</u> asic <u>L</u> ocal <u>A</u> lignment <u>S</u> earch <u>T</u> ool
<i>CaSAT1</i>	Nourseothricin rezisztenciát okozó gén
CAS <sup>ADP</sup>	<u>C</u> aspo <u>f</u> ungin <u>a</u> daptált
CAS <sup>EVO</sup>	<u>C</u> aspo <u>f</u> ungin <u>e</u> volvált
CDR	Candida drog rezisztencia gén ( <u>C</u> andida <u>d</u> rug <u>r</u> esistance)
CFU	Élőcsíraszám ( <u>C</u> olony <u>f</u> orming <u>u</u> nit)
<i>CHS 1-8</i>	Kitin szintáz 1-8 gének ( <u>C</u> hitin <u>s</u> ynthase)
CPA	Krónikus tüdő aszpergillózis ( <u>C</u> hronic <u>p</u> ulmonary <u>a</u> sp <u>e</u> rgil <u>l</u> osis)
CR	kongóvörös ( <u>C</u> ongo <u>r</u> ed)
CS	Kitin szintáz géncsalád ( <u>C</u> hitin <u>s</u> ynthase)
CW	Kalkofluor fehér ( <u>C</u> alcofluor <u>w</u> hite)
DIG	<u>D</u> igoxigenin
DMEM	<u>D</u> ulbecco's <u>M</u> odified <u>E</u> agle <u>M</u> edium
EDTA	<u>E</u> tilén- <u>d</u> iamin- <u>t</u> etra <u>e</u> cetsav
ER	<u>E</u> ndoplzmatikus <u>r</u> etikulum
<i>ERG 2-27</i>	<u>E</u> rgoszterol 2-27 gének
FBS	Borjú szérum ( <u>F</u> etal <u>b</u> ovine <u>s</u> erum)
Fc	<u>F</u> ragment of <u>c</u> ry <u>s</u> tallization
FITC	Fluoreszcens izotiocianát ( <u>F</u> luorescein <u>i</u> sot <u>h</u> iocyanate)
<i>FKSI-3</i>	β-1,3-glükán szintáz gének
Flu	<u>F</u> lukonazol
FLU <sup>ADP</sup>	<u>F</u> lukonazol <u>a</u> daptált
FLU <sup>EVO</sup>	<u>F</u> lukonazol <u>e</u> volvált
FMDP	N3-(4-metoxifumaroil) -L-2,3-diaminopropánsav
GM-CSF	Granulocita/makrofág-kolónia stimuláló factor ( <u>G</u> ranulocyte <u>m</u> acrophage- <u>c</u> olony <u>s</u> timulating <u>f</u> actor)
HE	<u>H</u> eterozigóta
HS	Mutációs forrópont ( <u>H</u> ot <u>s</u> pot)
Hsp90	Hőshock protein 90 ( <u>H</u> eat <u>s</u> hock <u>p</u> rotein <u>90</u> )
Ig	<u>I</u> mmunoglobulin
IV	<u>I</u> ntravénás
KO	<u>K</u> nock <u>o</u> ut
LC-MS	Folyadék kromatográfia-tömegspektrometria ( <u>L</u> iquid <u>c</u> hromatography- <u>m</u> ass <u>s</u> pectrometry)
<i>MDR</i>	Multidrog rezisztencia ( <u>M</u> ultidrug <u>r</u> esistance)
MFS	Fő efflux elősegítő szupercsalád ( <u>M</u> ajor <u>f</u> acilitator <u>s</u> uperfamily)
MIC	Minimális gátló koncentráció ( <u>M</u> inimal <u>i</u> nhibitory <u>c</u> oncentration)
MIC <sup>ADP</sup>	<u>M</u> icafungin <u>a</u> daptált

MIC <sup>EVO</sup>	<u>M</u> icafungin evolvált
Mnn1-11	Mannóz lánc szintézisében részt vevő enzimek
MRR	Multi rezisztencia regulator ( <u>M</u> ulti <u>r</u> esistance <u>r</u> egulator)
OD	<u>O</u> ptikai <u>d</u> enzitás
ORF	Nyílt leolvasási keret ( <u>O</u> pen <u>r</u> eading <u>f</u> rame)
PBMC	Perifériás vérből izolált mononukleáris sejt ( <u>P</u> eripheral <u>b</u> lood <u>m</u> ononuclear <u>c</u> ell)
PBMC-DM	Perifériás vérből izolált mononukleáris sejtől differenciáltatott makrofág ( <u>P</u> eripheral <u>b</u> lood <u>m</u> ononuclear <u>c</u> ell- <u>d</u> erived <u>m</u> acrophage)
PBS	Foszfát pufferelt só oldat ( <u>P</u> hosphate <u>b</u> uffered <u>s</u> aline)
PCR	Polimeráz lánc reakció ( <u>P</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction)
PKC	Protein kináz C ( <u>P</u> rotein <u>k</u> inase <u>C</u> )
PC	Foszfátidilkolin ( <u>P</u> hosphatidyl <u>c</u> holine)
PE	Foszfátidil-etanolamin ( <u>P</u> hosphatidyl- <u>e</u> thanolamine)
Pos	<u>P</u> osakonazol
POS <sup>ADP</sup>	<u>P</u> osakonazol <u>a</u> daptált
POS <sup>EVO</sup>	<u>P</u> osakonazol <u>e</u> volvált
RPMI	<u>R</u> oswell <u>P</u> ark <u>M</u> emorial <u>I</u> nstitute
PS	Foszfátidil-szerin ( <u>P</u> hosphatidyl- <u>s</u> erine)
SDS	Szódium-dodecil szulfát ( <u>S</u> odium- <u>d</u> odecyl- <u>s</u> ulphate)
SNP	<u>S</u> ingle <u>N</u> ucleotide <u>P</u> olymorfism
SSC	nátrium-klorid – nátrium citrát puffer
TAC	<u>C</u> DR transzkripció aktivátor ( <u>T</u> ranscription <u>a</u> ctivator of <u>C</u> DR)
TEM	<u>T</u> ransmissziós <u>e</u> lektron mikroszkópia ( <u>T</u> ransmission <u>e</u> lectron <u>m</u> icroscopy)
TM	Transzmembrán ( <u>T</u> rans <u>m</u> embrane)
TRIS	Tris-(hidroximetil)-aminometán ( <u>T</u> ris-(hydroxymethyl)-aminomethane)
Vor	<u>V</u> orikonazol
VOR <sup>ADP</sup>	<u>V</u> orikonazol <u>a</u> daptált
VOR <sup>EVO</sup>	<u>V</u> orikonazol <u>e</u> volvált
VT	<u>V</u> ad típus
WGA	Gabona csíra agglutinin ( <u>W</u> heat <u>g</u> erm <u>a</u> gglutinin)
YPD	Élesztő pepton dextróz ( <u>Y</u> east <u>p</u> eptone <u>d</u> extrose)

## 2. Bevezetés

Az élőlények mindegyike az aktuális környezetéhez való alkalmazkodásra törekszik, legyen szó akár többsejtű vagy egysejtű életformáról. Az adott élőlény aktuális élőhelye rendkívül sok módon hat az élőlényre. Ezeknek a hatásoknak egy részéről alapos ismeretekkel rendelkezünk, például ilyen a hőmérséklet vagy a tápanyag ellátottság, azonban nem feltételezhetjük, hogy minden környezettel kapcsolatos faktor hatásáról rendelkezünk ismerettel, ráadásul az egyes környezeti faktorok együttes hatása is befolyásolja, hogy az adott organizmus hogyan adaptálódik az adott környezethez. Azon mikroorganizmusok számára, amelyek a mikroflóra tagjai, vagy képesek az embert megbetegíteni (patogének vagy opportunistá patogének) a gazda jelenti a környezetet. Ezen mikroorganizmusok között az opportunistá patogének különleges helyet foglalnak el, ugyanis ezek az élőlények kommenzalistaként is jelen lehetnek a szervezetben, azonban csak bizonyos esetekben képesek azt megbetegíteni.

Az utóbbi évtizedekben folyamatosan és jelentősen emelkedik a *Candida* fajok által okozott megbetegedések száma. A nemzetségbe tartozó fajok között megtalálhatunk olyanokat is, amelyek a normál humán flóra tagjai, emellett egyesek a környezetből is izolálhatóak. Ezek a fajok bizonyos esetekben azonban képesek akár halálos kimenetelű fertőzéseket is okozni, különösképpen gyenge immunrendszerű betegekben, mint például HIV-fertőzöttek (*Human Immunodeficiency Virus*), szervátültetésen átesett egyének, újszülöttek, valamint az intenzív osztályokon kezelt idős betegek. Ezek alapján jól látszik, hogy az említett célcsoportokban megjelenő fertőzések gyakran valamilyen kórházi ápolással kapcsolatos okokra vezethetők vissza, ehhez az is hozzájárulhat, hogy egészségügyi dolgozók kezéről élesztőgombák izolálhatóak, melyek között nagy gyakorisággal fordulnak elő *Candida* fajok.

A *Candida* nemzetség tagjai által okozott megbetegedések legnagyobb hányadáért a *Candida albicans* tehető felelőssé. Az utóbbi évtizedben azonban egyéb, ún. nem-*albicans* *Candida* fajok növekvő arányban jelennek meg a klinikumban. Klinikai szempontból fontos *Candida* fajok a *C. albicans* mellett a *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* és a *C. tropicalis*. Egyes elméletek szerint a dinamikusan változó epidemiológia hátterének okai abban keresendők, hogy a *C. albicans* okozta fertőzések kezelésében sikeresen alkalmazhatóak voltak az azol típusú antifungális szerek, amelyek kb. 10 évvel ezelőttig a gombaellenes terápia első vonalának számítottak. A *C. albicans*-szal ellentétben a többi nem-*albicans* *Candida* faj viszonylag gyorsan és hatékonyan ellenállóvá vált az azolokkal

szemben (pl.: *C. krusei*, *C. glabrata*). Az utóbbi egy évtizedben a klinikai ajánlásoknak megfelelően az antifungális terápia első vonalába az echinokandin típusú szerek kerültek, ami a candidiázisos esetek fajok szerinti eloszlását szintén erősen befolyásolhatja, mivel a *C. albicans* kimondottan érzékeny echinokandinokra, míg a *C. parapsilosis*, *in vitro* tesztek alapján, a nemzetség tagjainál jóval ellenállóbb ezen antimikotikum típusra.

A *C. parapsilosis* okozta megbetegedések száma emelkedő tendenciát mutat mind a mai napig, azonban a kutatások leginkább a *C. albicans*-ra irányultak, feltehetően annak epidemiológiai dominanciájának köszönhetően. Míg a *C. albicans* esetén részletes ismeretekkel rendelkezünk a rezisztenciát, valamint a virulenciát illetően, jelentősen kevesebb információ áll rendelkezésünkre az ezek háttérében álló folyamatokról a *C. parapsilosis*-ban. Érdekes, de számos klinikai megfigyelés igazolja azt, hogy a kisebb antifungális érzékenység ellenére a *C. parapsilosis* okozta megbetegedések jól kezelhetők echinokandinokkal, valamint azol típusú antifungális szerekkel a *C. albicans*-szal ellentétben. Ennek az ellentmondásnak a biológiai háttere mindmáig ismeretlen. Jelen dolgozat célja felderíteni, hogy a rezisztencia kialakulása mögött álló folyamatok milyen hatással bírnak a *C. parapsilosis* egyéb tulajdonságaira, kiemelt figyelemmel a virulenciára.

### 3. Irodalmi áttekintés

#### 3.1. A gombafertőzések jelentősége

A gombák a földi bioszféra nagy részén megtalálhatóak. A különböző gomba fajok számát körülbelül 2,2 millió és 3,8 millió közötti számra becsülik, azonban ezek közül csak mintegy 300 okoz fertőzéseket emberben (Garcia-Solache és Casadevall 2010; Hawksworth és Lucking 2017; Taylor, és mtsi. 2001). A humán gombás fertőzés kiváltására képes fajok általában megtalálhatóak a környezetben, például a talajban, növényi részekben, de az egészséges emberi bőrön is. A gombák nagy része – néhány kivételtől eltekintve, például *Histoplasma capsulatum*, *Cryptococcus gattii*, *Cryptococcus neoformans* (Chamany, és mtsi. 2004; Colombo, és mtsi. 2011) – nem okoz megbetegedéseket egészséges emberi szervezetben, azonban ha az egyén valamilyen okból legyengült immunrendszerrel rendelkezik, akkor több gomba faj is képes lehet különböző fertőzéseket előidézni. Az ilyen mikroorganizmusokat opportunistáknak nevezzük. Különösen veszélyeztetettek a HIV-fertőzöttek, a daganatos megbetegedésben szenvedők és a szervátültetést követő immunszuppresszív terápian átesett betegek (Muskett, és mtsi. 2011). A gombák okozta fertőzések enyhébb esetben felszíni jellegűek, súlyos esetben az egész szervezetet érintő ún. szisztémás (teljes szervrendszert érintő) infekciók lehetnek. Ez utóbbiak különösen súlyos állapotot idézhetnek elő és magas halálozási rátával járnak. Az opportunistáknak gombafertőzések túlnyomó többségéért *Cryptococcus*, *Histoplasma*, *Aspergillus* és *Candida* fajok tehetők felelőssé (Brown, és mtsi. 2012).

A cryptococcosist elsősorban a *Cryptococcus neoformans* és *Cryptococcus gattii* fajok okozzák. Ezek az élesztőgombák a tüdőn keresztül jutnak a véráramba miután a makrofágok általi fagocitózist képesek túlélni, és a vér-agy gáton átjutó makrofágokból kiszabadulva súlyos, akár halálos kimenetelű meningitist okozhatnak. A fertőzés által leginkább veszélyeztetett betegcsoportok a HIV-fertőzöttek (Rajasingham, és mtsi. 2017). A *Cryptococcus* fajok okozta agyhártya- és agyvelőgyulladásos esetek mortalitása nagyban függ a földrajzi elhelyezkedéstől: Észak-Amerikában 20% körül alakul, míg Dél-Amerika és Afrika egyes területein elérheti a 70%-ot is (Mirza, és mtsi. 2003).

A *Histoplasma* fajok okozta mikózisokat Észak-Amerikában endemikusnak tekintik, azaz egyes területeken nagy arányban fordulnak elő. A hisztoplazmózis általában enyhe lefolyású, tünetekkel nem járó fertőzés. Bizonyos esetekben azonban a betegek jelentős hányada (akár 50-100%) is mutathat tüneteket, különösen olyan területeken, ahol nagy mennyiségű gombaspóra van jelen a környezetben (Armstrong, és mtsi. 2018). A gomba



elsősorban belélegzés útján jut be az emberi szervezetbe. Nagy kockázatnak ez esetben is a HIV-fertőzöttek vannak kitéve, esetükben a mortalitás elérheti akár a 30%-ot is (Chamany, és mtsi. 2004). A *H. capsulatum* egészséges embert is képes megfertőzni, azonban ilyen esetekben a mortalitás jóval alacsonyabb (4-7%) (Armstrong, és mtsi. 2018). A hisztoplazmózis kezelése fertőzött egyéneknél 3 hónaptól több éven át is elhúzódhat.

Az aszpergillózisok leggyakoribb megjelenési formája az allergiás bronchopulmonáris aszpergillózis (ABPA), az invazív *Aspergillus* fertőzések előfordulása ennél jóval ritkább. Bizonyos felmérések alapján az asztmás tüneteket mutató felnőttek 2,5%-a ABPA beteg, ami világviszonylatban 4,8 millió embert jelent, amelyből 400.000 eset krónikus tüdő aszpergillózis (CPA) (Denning, és mtsi. 2013a). A CPA betegek nagy részénél a tünetegyüttes kialakulása a tuberkulózis és szarkoidózis korábbi előfordulására vezethető vissza (Denning, és mtsi. 2011; Denning, és mtsi. 2013b). Az invazív, más szerveket érintő aszpergillózis nem gyakori, azonban a mortalitása igen magas még kezelés esetén is: összejt átültetés esetén 25%, szervátültetett páciensek esetén a 60%-ot is megközelíti (Kontoyiannis, és mtsi. 2010).

A legtöbb invazív (bőr mélyebb rétegeit, belső szerveket is érintő) gombás megbetegedést *Candida* fajok okozzák (Perlroth, és mtsi. 2007), ezenkívül a *Candida* fajok a negyedik leggyakrabban azonosított gomba csoport nozokomiális (kórházi ápolással összefüggő) véráram fertőzések során, csak olyan obligát patogén mikroorganizmusok előzik meg, mint a *Staphylococcus epidermidis* vagy a *S. aureus* (Wisplinghoff, és mtsi. 2004). Hasonlóan a többi gombás megbetegedéshez, az immunszuppresszált állapottal összefüggő kockázati tényezők, mint a neutropénia, kortikoszteroid kezelés vagy HIV-fertőzés hajlamosítanak disszeminált candidiázisra. Megjegyzendő azonban, hogy a nozokomiális fertőzések 80%-ában a betegség kialakulása nem immunszuppresszióhoz kapcsolható, hanem sokkal inkább az ápolással együtt járó kockázati tényezőkkel, mint a centrális vénás katéter alkalmazása, sebészeti beavatkozás vagy széles spektrumú antibiotikum kezelés (Perlroth, és mtsi. 2007). Egyes tanulmányok szerint az összes nozokomiális fertőzés között a *Candida* fertőzések aránya elérheti a 9-15%-ot. (Hidron, és mtsi. 2008; Romani, és mtsi. 2004; Wisplinghoff, és mtsi. 2004). Felmérések alapján a kórházban ápolat invazív candidiázisban szenvedő páciensek esetében a mortalitás eléri, és bizonyos esetekben meg is haladja az 50%-ot (Moran, és mtsi. 2009; Puig-Asensio, és mtsi. 2014).

### 3.2. A *Candida* fajok epidemiológiája

A *Candida* nemzetség megközelítőleg 150 ismert fajt foglal magába, azonban betegekben eddig mindössze 15 fajt azonosítottak, mint betegséget okozó ágens. Ezen fajok közül is 5 faj tehető felelőssé a fertőzések 95%-áért, ezek a *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* és a *C. krusei* (Diekema, és mtsi. 2012; Yapar 2014). A patogén *Candida* fajok eloszlása nagy földrajzi eltéréseket mutathat. Felmérések alapján a fertőzések túlnyomó többségéért a *C. albicans* a felelős, mindazonáltal a 2000-es évek második felétől kimutatható a *C. albicans* részarányának csökkenése és a nem-*albicans* *Candida* fajok egyre gyakoribb előfordulása a klinikumban (Diekema, és mtsi. 2012; Ruhnke 2006). Ennek következtében a *C. albicans* klinikai előfordulása 50% körülire esett vissza a korábbi akár 70%-os gyakorisághoz képest (Pfaller, és mtsi. 2010b; Pfaller, és mtsi. 2011) az északi mérsékelt égővi területeken (Európa, Észak-Amerika), míg a többi *Candida* faj aránya ezzel párhuzamosan folyamatosan emelkedett (Nawrot, és mtsi. 2013; Tortorano, és mtsi. 2013).

A nem-*albicans* *Candida* (NAC) fajok előfordulási gyakorisága és növekvő térnyerése a *C. albicans*-szal ellentétben, nagyban függ a földrajzi elhelyezkedéstől. Európa északi országaiban és Észak-Amerikában a *C. glabrata* a gyakoribb, míg Európa déli területein, Afrikában, Latin-Amerikában és Indiában inkább a *C. parapsilosis* a domináns NAC faj (Kreusch és Karstaedt 2013; Nucci, és mtsi. 2013), amely bizonyos esetekben akár a *C. albicans* előfordulási gyakoriságát is megelőzi (pl. 70%, Brazília) (Pinhati, és mtsi. 2016). A rohamosan változó epidemiológia feltételezett okai, hogy a triazolokat szereket és a később kifejlesztett echinokandinokat hatékonyan alkalmazták a klinikumban 1990-es évek elejétől, illetve a 2000-es évek második felétől *C. albicans* fertőzések során, ami utat nyithatott a már korábban említett nem-*albicans* fajok elterjedésének (Pappas, és mtsi. 2016).

Az epidemiológiai adatok részletesebb elemzése többször rámutat arra is, hogy a nem-*albicans* *Candida* fajok elterjedésében nemcsak a geográfiai viszonyok alapján lehet különbségeket felfedezni, hanem az egyes korcsoportok alapján is. Megfigyelhető, hogy a *C. parapsilosis* fertőzések aránya igen magas újszülöttek esetén, míg a *C. glabrata* inkább az idősebb korosztály tagjait veszélyezteti. Több tanulmány a *C. parapsilosis* okozta candidémiák gyakoriságát 33-67%-ra becsülte az alacsony születési súlyú újszülöttek körében (Ballot, és mtsi. 2013; Pammi, és mtsi. 2013). A 80-99 év közötti korosztály esetében a *C. glabrata* a candidémiák (véráram fertőzések) közel 30%-áért volt felelős (Pfaller, és mtsi. 2010a).

A *Candida* fajok okozta megbetegedések száma tehát folyamatosan növekszik és bár a fertőzések legnagyobb hányadáért továbbra is a *C. albicans* tehető felelőssé, egyéb nem-*albicans Candida* fajok is egyre inkább előtérbe kerülnek, köszönhetően a sikeresen alkalmazott triazoloknak és echinokandinoknak.

### 3.3. A *Candida parapsilosis* jelentősége

A *C. parapsilosis*-t 1928-ban izolálta Ashford, akkor azonban még *Monilia parapsilosis* néven rendszerezték, és csak később, a *Candida* nemzetség név megjelenésével 1932-ben nevezték át *Candida parapsilosis*-ra (Nosek, és mtsi. 2009; Trofa, és mtsi. 2008). Eleinte nem-patogén élesztőként tartották számon, azonban 1940-ben intravénás kábítószer használó betegben végzetes fertőzést okozó mikroorganizmusként írták le (Trofa, és mtsi. 2008). Egészen 2005-ig a *C. parapsilosis* izolátumokat három csoportba sorolták: I., II. és III. csoport, azonban molekuláris vizsgálatokat követően a három csoportot három fajként határozták meg: *C. parapsilosis sensu stricto* (I. csoport), *C. orthopsilosis* és *C. metapsilosis* (II. és III. csoport) (Tavanti, és mtsi. 2005). A három új faj genetikai tulajdonságain kívül nagyban eltér patogenitásában is. A fertőzések túlnyomó többségéért a *C. parapsilosis* a felelős, a *C. orthopsilosis* és *C. metapsilosis* csak jóval kisebb arányban okoz megbetegedéseket (Bertini, és mtsi. 2013; Nemeth, és mtsi. 2013).

A *C. parapsilosis* gyakran fordul elő egészséges bőrfelületeken kommenzalistaként, ezenkívül igen nagy gyakorisággal izolálható a környezetből, például talajból, tengervízből és olajfárról is (Fell és Meyer 1967; Nosek, és mtsi. 2009). A *C. parapsilosis* egyedülálló abban a tekintetben, hogy a többi *Candida* fajjal ellentétben - ahol a gombakolonizáció a születés során történik anyáról gyermekre történő vertikális transzferrel - a *C. parapsilosis* képes horizontális terjedésre is (Lupetti, és mtsi. 2002b; Trofa, és mtsi. 2008), azaz képes az emberről emberre való terjedésre.

A *C. parapsilosis* nem képes valódi hifák képzésére, mint a *C. albicans*, azonban megnyúlt sejtek osztódás utáni tökéletlen elválásával létrejöhetnek az úgynevezett pszeudohifák (Brunke és Hube 2013; Trofa, és mtsi. 2008). A pszeudohifák létrejötte lényeges faktor lehet fagocita típusú immunsejtekkel való kölcsönhatás során, ugyanis a megnyúlt *C. parapsilosis* sejtek képesek kijutni a fagoszómából (Nemeth, és mtsi. 2013; Toth, és mtsi. 2014). Ezen kívül a gomba horizontális átjutását emberről emberre az segítheti, hogy különböző műanyag felületeken hatékonyan hoz létre biofilmet, ezáltal a kórházakban jelentős kockázatot jelenthet az intenzív osztályon ápoltság számára, akik hasüregi vagy vénás katéterrel vannak ellátva (Trofa, és mtsi. 2008). Emellett az által, hogy gyors

növekedést és komplex biofilmképzést mutat különböző magas glükóz- és lipid tartalmú folyadékokban, nagy kockázatot jelent a mesterségesen táplált betegek számára is (Nosek, és mtsi. 2009).

A *C. parapsilosis* a *C. albicans*-hoz hasonlóan a CUG klád tagja, vagyis ez a kodon az általános kodonhasználatától eltérően a leucin helyett a szerin beépülését okozza a fehérjeszintézis során (Fitzpatrick, és mtsi. 2006). 2009-ben a *C. parapsilosis* CDC314 törzs genomszekvenciája elérhetővé vált (Butler, és mtsi. 2009): a genom mérete 13,1 Mb, amely megközelítőleg 5700 nyitott leolvasási keretet (*Open Reading Frame* - ORF) tartalmaz. Az azóta eltelt időszakban szekvenálásra került más *C. parapsilosis* törzsek genomja is (pl. GA1, CLIB 214) (Pryszcz, és mtsi. 2013). A *C. parapsilosis* és a *C. albicans* filogenetikailag közeli fajok, azonban a kódoló szekvenciáik jelentősen eltérnek egymástól: A *C. parapsilosis* fehérje szekvenciái 59%-os hasonlóságot mutatnak a megfelelő *C. albicans* ortológ szekvenciákkal. Ezenkívül a *C. parapsilosis* rendelkezik számos, a *C. albicans*-ból hiányzó kódoló szekvenciával is, illetve ennek a fordítottja is igaz, vagyis a *C. albicans*-ban is nagyszámú olyan szekvencia található, amelyek nincsenek jelen a *C. parapsilosis* genomjában (Logue, és mtsi. 2005; Nosek, és mtsi. 2009). Ráadásul nagyobb szekvenciabeli eltérések nemcsak a rokon fajokhoz képest voltak megfigyelhetőek, hanem a *C. parapsilosis* különböző izolátumai között is (Pryszcz, és mtsi. 2013).

### **3.4. A *Candida* sejtek antifungális terápia szempontjából lényeges sajátosságai**

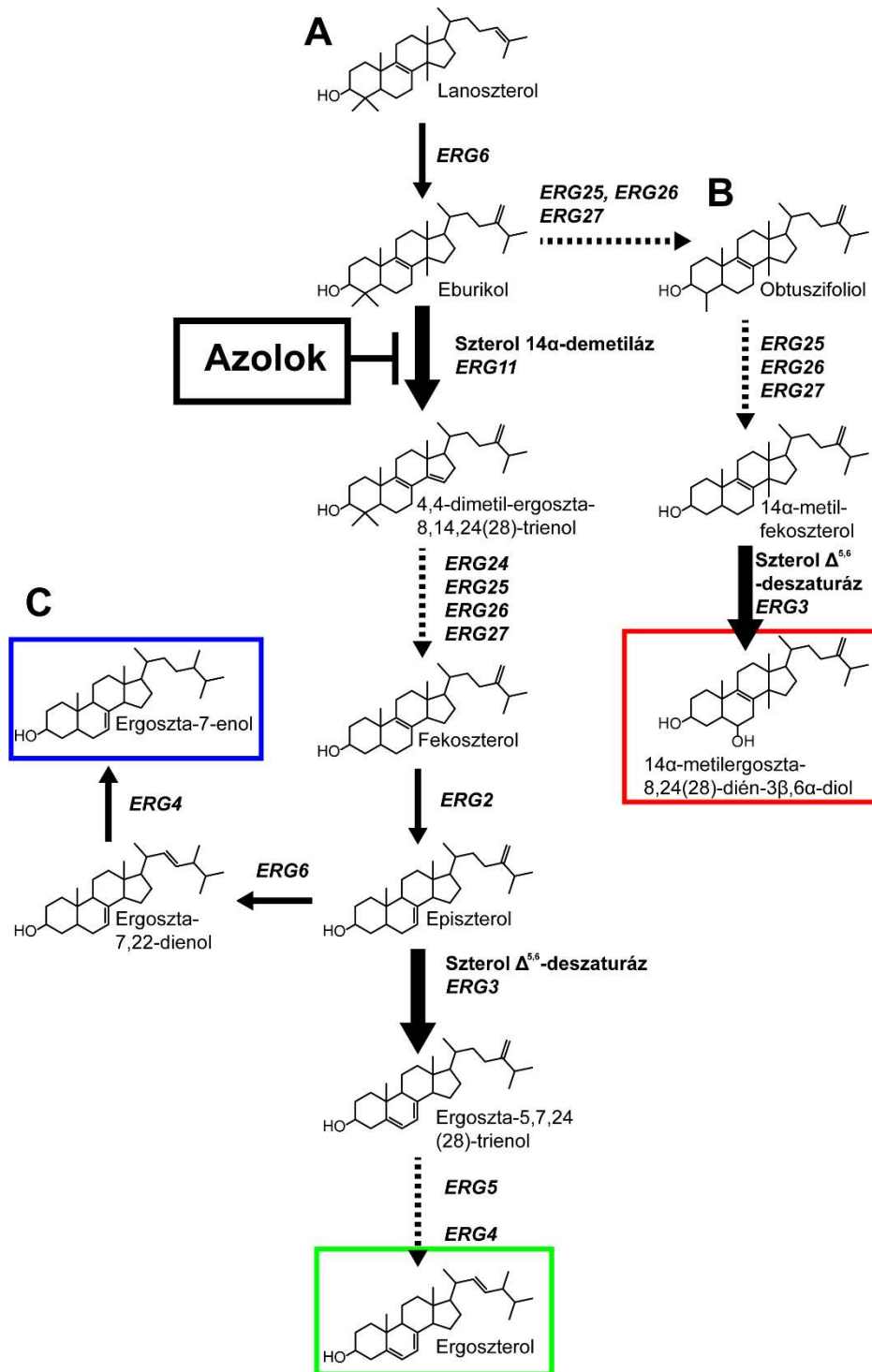
Bármilyen antimikrobiális kemoterápiáról is legyen szó, a legfontosabb szempont, hogy az adott mikroorganizmus növekedését meggátoljuk anélkül, hogy a gazdaszervezetet jelentősen károsítanánk. Ennek érdekében az antibiotikumokat úgy fejlesztik ki, hogy azok az adott mikroorganizmus vagy a mikroorganizmusok egy csoportjának olyan egyedi sajátosságát célozzák meg, amely tulajdonság nagyban eltér a gazdaszervezet jellemzőitől. Az antimikrobiális szerek hatásukat tekintve lehetnek sztatikus-, valamint cidikus hatásúak. A sztatikus hatású szerek a mikroorganizmusok növekedését gátolják, míg a cidikus hatásúak az adott mikroorganizmust elpusztítják (Delarze és Sanglard 2015). Candidiázis esetén a klinikumban használt antifungális szerek mindegyike a gomba plazmamembránjának integritását csökkenti vagy a sejtfal szintézisét gátolja.

#### **3.4.1. Gomba membrán és ergoszterol szintézis**

Gombák esetén a plazmamembrán funkciója - bármely más élőlény csoporthoz hasonlóan - a sejtek integritásának biztosítása azáltal, hogy elhatárolja a sejt tartalmát a külső

környezettől. A plazmamembrán intaktságának bármilyen megváltozása a sejtben stresszt indukál, ami extrém membránsérülés esetén akár sejthalálhoz is vezethet. A *Candida* nemzetségbe tartozó fajok plazmamembránjának alapvető felépítése nem különbözik nagyban az emlős sejtek membránjának foszfolipid kettősrétegű felépítésétől, azonban amíg azoknál a fluiditását a kettősréteg zsírsav oldalláncai közé ékelődő koleszterol befolyásolja, addig a gombák membránjában az ergoszterol látja el ezt a funkciót (Rella, és mtsi. 2016; Weete, és mtsi. 2010). Az ergoszterol befolyásolja az élesztő gombák membránjának rigiditását (Abe, és mtsi. 2009), a sejtek morfológiáját (Martin és Konopka 2004), valamint patogén fajok esetén közvetetten a virulenciára is hatással van (Saville, és mtsi. 2003).

Az ergoszterol bioszintézis útvonal régóta kutatott a gombákban. A növényi, állati és gomba szterolok szintézise acetyl-koenzim A-ból indul ki, amelyből 4 lépéses reakció során szkvalén, majd ennek oxidációjával szkvalén epoxid képződik. A szkvalén epoxidból állatokban és gombákban lanoszterol képződik, viszont ettől a lépéstől kezdve a szterolok szintézisének útvonala különbözik a két csoportban (Dupont, és mtsi. 2012). *Candida* fajokban a lanoszterolból az *ERG6* gén termékének, a 24-C-metiltranszferáz enzimnek hatására eburikol keletkezik, amit a lanoszterol 14 $\alpha$ -demetiláz (*ERG11*) alakít tovább 4,4-dimetil-ergoszta-8,14,24(28)-trienollá. Ezt a szterol származékot az *ERG24*, *ERG25*, *ERG26* és *ERG27* gének termékei több lépcsőben demetilálják a 4-es számú szénatomon, létrehozva ezzel a fekoszterolt. A fekoszterol egy izomerizációs reakcióban alakul tovább a C-8 izomeráz (*ERG2*) hatására episzterollá. Az episzterol 5-ös és 6-os szénatomja között a szterol  $\Delta^{5,6}$ -deszaturáz enzim (*ERG3*) kettős kötést hoz létre, így kialakul az ergoszta-5,7,24(28)-trienol, melyet az *ERG5* és *ERG4* gének termékei alakítanak tovább az útvonal végtermékévé, az ergoszterollá (Martel, és mtsi. 2010b). Az útvonalat az **1. ábra A** része foglalja össze.



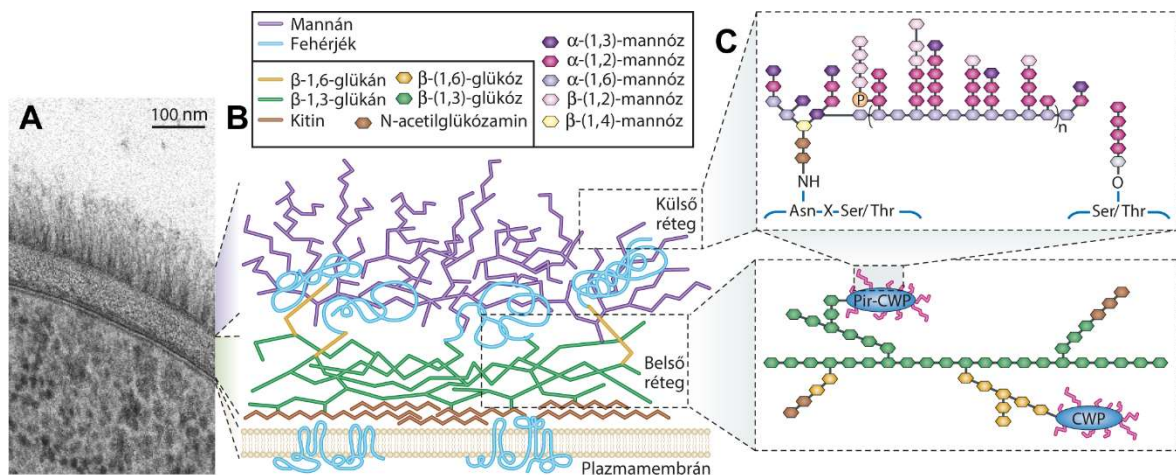
**1. ábra:** Az ergoszterol bioszintézis útvonala és lehetséges melléktermékei. **(A)** Az ergoszterol bioszintézise normál körülmények között az ergoszterol létrejöttéhez vezet (zöld négyzet). **(B)** Az ergoszterol szintézis útvonalának azolokkal történő gátlása esetén a folyamat végterméke a toxikus hatású 14α-metilergoszta-8,24(28)-dién-3β,6α-diol (piros négyzet). **(C)** Az ergoszterol bioszintézis útvonalban az *ERG3* gén termékének diszfunkciója esetén az episzterol tovább alakulása az ergoszta-7-enol (kék négyzet) kialakulásához vezet (Martel, és mtsi. 2010b).

### 3.4.2. Gomba sejtfal

A gombák, az állatoktól eltérően, sejtfallal rendelkeznek. A sejtfal a gombák számára nélkülözhetetlen sejtalkotó, amely lehetővé teszi a sejtek életben maradását egyébként kedvezőtlen ozmotikus tulajdonságú környezetben. Annak érdekében, hogy a sejt ellenálljon a környezet káros hatásainak, a sejtfalnak erősnek, mindazonáltal rugalmasnak kell lennie. Ennek érdekében a gombák sejtfala tartalmaz váz- és mátrix-szerű komponenseket is (Netea, és mtsi. 2008). Az egyes, egészségügyi szempontból jelentős gombacsoportok sejtfalának felépítésében eltérések tapasztalhatók, elsősorban a sejtfal mátrix-szerű rétegeiben, azonban mindegyik nemzetség sejtfala tartalmaz kitint, valamint a többségükében  $\beta$ -glükán is található, melyek a sejtfal vázát képezik (Erwig és Gow 2016). A *Candida* nemzetség tagjainak sejtfala transzmissziós elektronmikroszkópos (TEM) felvételeken egy tömör, elektrondenz belső réteggént jelenik meg, amelyhez kívülről egy sokkal lazább, kevésbé elektrondenz, fibrilláris megjelenésű külső réteg kapcsolódik (**2. ábra, A**). A belső réteg és valójában az egész sejtfal alapját az N-acetil-glükózamin monomerekből  $\beta$ -1,4-kötéssel kapcsolódó kitin polimer képezi, amelyhez a sejtfal fő alkotó eleme, a glükóz monomerekből  $\beta$ -1,3-kötésekkel felépülő  $\beta$ -1,3-glükán kapcsolódik  $\beta$ -1,6-kötéseken keresztül. Ezek a polimerek hidrogén-híd kötésekkel kapcsolódnak egymással, így építve fel a sejtfal vázát (**2. ábra, B**) (Gow, és mtsi. 2011; Netea, és mtsi. 2008). A sejtfal belső rétegét alkotó elemei közel helyezkednek el a plazmamembránhoz, azonban egy kisebb mennyiségű glükán és kitin a sejtfal teljes vastagságában is megtalálható. Ráadásul a *Candida* fajok sejtjein sarjadzás után található egy úgynevezett sarjheg, ahol a sejtfal belső rétegét alkotó polimerek megjelennek a felszínen (Gantner, és mtsi. 2005; Netea, és mtsi. 2008).

A kitin és a  $\beta$ -1,3-glükán szintézise a plazmamembránban található fehérjékkel történik. A kitint a kitin szintázok (CS) családjába tartozó enzimek szintetizálják, ezeket hét osztályba sorolják (I-VII.). Élesztőkben az I., II. és IV. osztályba tartozó kitin szintázok találhatóak meg. *Saccharomyces cerevisiae*-ben 3 kitin szintáz kódoló gén található: *CHS1* (I. osztály), *CHS2* (II. osztály) és *CHS3* (IV. osztály). *C. albicans*-ban 4 ilyen gén található, amelyek a *S. cerevisiae* kitin szintázokkal a következő sorrendnek megfelelően ortológok: *CHS2* és *CHS8* (I. osztály), *CHS1* (II. osztály) és *CHS3* (IV. osztály) (Lenardon, és mtsi. 2010). A különböző kitin szintázok szerepét elsősorban *S. cerevisiae*-ben ismerjük. A Chs1 aktivitása *in vitro* meglehetősen magas, azonban a sejtek összes kitin mennyiségéhez csak nagyon kis mértékben járul hozzá, ugyanis a *chs1* $\Delta$  mutáns sejtek továbbra is fenotípusos változás nélkül életképesek (Lenardon, és mtsi. 2010; Munro és Gow 2001). A Chs2 megközelítőleg a kitin teljes mennyiségének mindössze kb. 5%-áért felelős, azonban

megelepte esszenciálisnak bizonyult, mivel funkciójának kiesése jelentősen csökkenti a sejt életképességét. Ennek oka az enzim funkciója lehet, ugyanis a Chs2 enzim hozza létre az elsődleges szeptumot a sarjadzás során (Cabib és Duran 2005; Orlean 2012). A Chs3 felelős a szintetizált kitin mennyiségének kb. 90%-áért, ez az enzim elengedhetetlen a normál sejtciklushoz, valamint a megfelelő élesztő morfológia kialakulásához. Az endoplazmatikus retikulumban (ER) képződő fehérje a Chs7 hatására jut az ER-ből a Golgi-apparátusba, ahonnan a Chs5 és Chs6 segítségével jut a transzport vezikulumokba, majd a Chs4 irányítja a megfelelő helyre a sejtosztódás során a sarjadzást megelőzően. A Chs3 elsődleges feladatát, hogy a megfelelő helyen megkezdi a sarjadzáshoz szükséges kitin gyűrű szintézisét, ami majd a sarjadzás során lehetővé teszi az utódsejt invaginációját és a Chs2 funkciójának elindítását. A sarjadzást követően a Chs3 elsődleges funkciójának ellátása után az End4 segítségével úgynevezett kitoszómákba kerül, ahonnan újabb sarjadzás esetén a Chs6 közvetítésével a plazmamembránra kerül és ismét elláthatja elsődleges funkcióját, vagy pedig sejtfa stressz esetén annak kitin tartalmát növeli (Cabib és Duran 2005; Orlean 2012). A másodlagos szeptum kialakulása után és a leánysejt leválását követően a Chs3 a plazmamembrán teljes felületén megkezdi a laterális kitin szintézisét (Lesage és Bussey 2006; Orlean 2012).



**2. ábra:** A *Candida* fajok sejtfalának felépítése. (A) A sejtfa TEM felvétele, amelyen jól megkülönböztethető a sejtfa külső és belső rétege. (B) A sejtfa külső és belső réteget felépítő poliszacharidok és fehérjék egymáshoz viszonyított szerkezete és elhelyezkedése. (C) A sejtfa alkotó szénhidrát polimereket alkotó monomerek egymáshoz és a sejtfa fehérjékhez való kapcsolódásának modellje (Gow, és mtsi. 2011; Netea, és mtsi. 2008). Sejtfa protein (Cell wall protein, CWP)



A sejtfa! sz!razott!meg!enek t!lnyom! többs!g!t a  $\beta$ -1,3-gl!k!n teszi ki, ennek szint!zise is a kitin szint!zokhoz hasonl!an a plazmamembr!nhoz kapcsol!d! enzimek m!k!d!se r!v!n val!sul meg. A  $\beta$ -1,3-gl!k!n szint!z komplex m!k!d!se a Rho1 GTP-!z kapcsol!d!sa !ltal szab!lyozott !s az enzim aktivit!s!hoz elengedhetetlen. A katalitikus alegys!g!t az *FKS1*, *FKS2* !s *FKS3* g!enek k!d!lj!k az !leszt!kben. *C. albicans*-ban !s a *Candida* fajok többs!g!ben az *FKS1* megl!te esszenci!lis, kiv!ve a *C. glabrata*-ban, ahol az Fks1 !s Fks2 fehr!j!k funkci!ja redund!ns. Ennek k!vetkezt!ben az Fks1 elveszt!se nem let!lis *C. glabrata*-ban (Perlin 2015). Az *FKS3* expresszi!ja igen alacsony az !sszes *Candida* fajban. Az *fks3 $\Delta$*  mut!ns *S. cerevisiae* sejtek sporul!ci! sor!n abnormal!s morfol!gi!j! sp!r!kat k!peznek, ami arra utal, hogy az Fks3-nak a szexu!lis ciklus sor!n t!rt!n!  $\beta$ -1,3-gl!k!n szint!zisben van szerepe. Ez megmagy!r!zza, hogy a szexu!lis ciklus n!lk!li *Candida* fajokban az Fks3 szerepe mi!rt elhanyagolhat! (Orlean 2012; Perlin 2015). !leszt!kben az *FKS1* !s *FKS2* expresszi!ja elt!r! mint!z!tot mutat. Az *FKS1* expresszi!ja a sejtciklus G<sub>1</sub> !s S f!zis!ban !ri el a maximum!t. Az *FKS2* mRNS nem detekt!lhat! sarjadz! kult!r!kban, amikor a t!poldat gl!k!zt tartalmaz egyed!li sz!nforr!sk!nt. Ezzel ellent!tben, altern!tiv sz!nforr!s jelenl!t!ben (acet!t, glicerol, galakt!z, stb.) a sejtek *FKS2* expresszi!ja jelent!sen megemelkedik (Lesage !s Bussey 2006; Orlean 2012). A *C. glabrata* *FKS1/FKS2* expresszi!s mint!z!ta annyiban elt!r a fentebb le!rt!kt!l, hogy a k!t g!n expresszi!ja a sejtciklus sor!n permanensen !sszehasonl!lhat! m!rt!k! (Garcia-Effron, !s mtsi. 2009a; Katiyar, !s mtsi. 2012).

A sejtfa! k!ls! r!teg!ben nagyobb mennyis!g! fehr!je tal!lhat!, mint a bels! r!tegben. Ezek a fehr!j!k a Golgi-appar!tusból ker!lnek ki a sejtek felsz!n!re. A sejtfa!ban tal!lhat! fehr!j!k szekvenci!jukat !s funkci!jukat tekintve rendk!v!l sokf!l!k, abban viszont hasonl!ok, hogy kovalensen k!t!dnek a sejtfa! v!z!t alkot! poliszacharidokhoz (**2. !bra, C**) vagy a plazmamembr!nhoz, !s gazdagon mannozil!ltak (Netea, !s mtsi. 2008). A sejtfa! k!ls! r!teg!t legnagyobb mennyis!gben a mann!z alkotja, amely szerkezet!t tekintve sz!mos form!ban fordul el! fehr!j!khez kapcsol!dva (Hall !s Gow 2013; Orlean 2012). A fehr!j!khez a mann!n egys!gek k!tf!lek!ppen kapcsol!dhatnak: 1) aszparagin aminosav oldall!nc amino-csoportj!n keresztül (N-kapcsolt, N-mannozil!ci!), 2) szerin vagy treonin aminosavak oldall!nc!nak oxig!n atomj!n keresztül (O-kapcsolt, O-mannozil!ci!) (**2. !bra, C**). Az N-kapcsolt mann!n m!rete igen nagy, valamint el!gaz! szerkezet!t, m!g az O-kapcsolt mann!n line!ris !s t!b!nyire legfeljebb 5 mann!z monomerb!l !ll. A sejtfa! fehr!j!k N-mannozil!ci!j!nak kialakul!s!ban fontos szerepe van az ER-ben kialakul! mannozil!ci!s magnak, amely k!t N-acetil-gl!k!zamin egys!gen keresztül k!t!dik a fehr!je

aszparagin oldalláncához. Ebben a mannozilációs magban változatos kapcsolódású mannóz egységek találhatóak, amelyek lehetnek  $\beta$ -1,4-mannóz,  $\alpha$ -1,3-mannóz,  $\alpha$ -1,6-mannóz vagy  $\alpha$ -1,2-mannóz monomerek. A maghoz élesztősejtek esetén a Golgi-készülékben további mannóz egységek kapcsolódnak, amely valójában a sejtfa mannóz tartalmának legnagyobb részét jelentik. A mag egyik  $\alpha$ -1,3-mannóz egységéhez egy változó hosszúságú  $\alpha$ -1,6-mannóz gerinc kapcsolódik, amelynek kialakulásához, valamint hosszának meghatározásához több gén terméke elengedhetetlenül szükséges (Och1, Mnn9, Mnn10, Mnn11). Az  $\alpha$ -1,6-mannóz gerinc kialakulását követően az azt alkotó mannóz egységekhez további fehérjék (Mnn2, Mnn5) működésének hatására  $\alpha$ -1,2-mannóz egységek kapcsolódnak több rétegben. Az így felépült mannóz lánc bizonyos  $\alpha$ -1,2-es egységeihez az Mnn4 és Mnn6 foszfát csoporton keresztül  $\beta$ -1,2-mannóz monomereket, másokhoz az Mnn1  $\alpha$ -1,3-, és a Bmt1 pedig  $\beta$ -1,2-mannózt kapcsol (2. ábra, C) (Hall és Gow 2013; Netea, és mtsi. 2008; Orlean 2012). A lineáris, rövid O-kötött mannóz lánc kialakulása az N-mannozilációnál jelentősen egyszerűbb folyamat. A később sejtfaiba kerülő fehérjékre az első  $\alpha$ -1,2-mannóz monomer az ER-ben kerül Pmt (mannozilációs magot létrehozó enzim) homo- vagy heterodimerek működése révén. A további  $\alpha$ -mannóz egységek a Golgi-apparátusban, egy-egy enzim (Mnt1/Mnt2, Pmr1 stb.) működése során kapcsolódnak az előző mannóz monomerhez, így kialakítva a fehérje O-mannozilációját (2. ábra, C) (Hall és Gow 2013; Orlean 2012).

Az ergoszterol egyedülálló jelenléte a gombák membránjában, valamint a bioszintézise és a sejtfa felépítése optimális célpontot jelentenek a különböző antifungális szerek számára. A sejtfaiban a nagy mennyiségű  $\beta$ -1,3-glükán szintézisét viszonylag korlátozott számú fehérje végzi, ráadásul ezek a fehérjék erősen konzervált katalitikus doménnel rendelkeznek, emiatt a sejtfa különböző polimer molekuláinak szintézisét végző enzimek közül ezek a legalkalmasabb támadáspontok az antifungális szerek célpontjaiként. A kitin szintázok, valamint a sejtfa fehérjék mannozilációját végző enzimek klinikai szempontból nem jelentenek jó célpontot a gombaellenes szerek számára, mivel a funkcióik az egyes polimereket létrehozó csoportokon belül igen redundánsak.

### 3.5. Legfontosabb antifungális szerek és hatásmechanizmusuk

A klinikumban *Candida* fertőzések esetén az antifungális szerekből három csoportjába tartozó vegyületeket használnak, ezek közül a poliének és a triazolok a

gombasejtek plazmamembránján fejtik ki hatásukat, az echinokandinok pedig a sejtfall szintézisét gátolják.

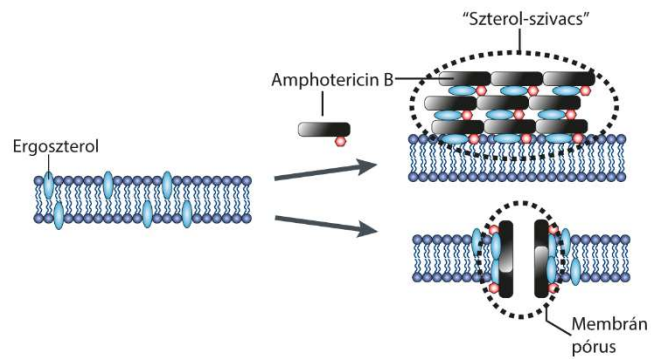
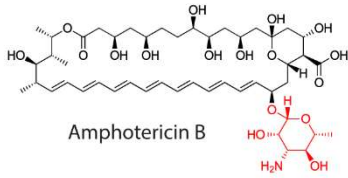
### 3.5.1. Amfotericin B

Az amfotericin B (amB) a legrégebben kifejlesztett antifungális szer, amit az 1950-es évek óta használnak. A poliének családjába tartozik, amelyek amfipatikus vegyületek. Felépítésükben egy gyűrűvé záródó hidrofób hidro-karbon lánc és egy hidrofil polihidroxil csoport vesz részt (Robbins, és mtsi. 2016). Az amB a gombasejtek membránjában található ergoszterolhoz köt. Korábbi kutatások arra utaltak, hogy a membránba ékelődő polién molekulák komplexet alkotnak és pórusokat hoznak létre, amin keresztül a sejt tartalom kikerül az extracelluláris térbe, ami a sejt pusztulását okozza (Gruszecki, és mtsi. 2003; Ostrosky-Zeichner, és mtsi. 2010). Frissebb tanulmányok rámutattak arra, hogy az amB egy „szterol-szivacsként” működik, amelynek során a membrán külső felületén az amB molekulák aggregátumot képeznek, ami kivonja az ergoszterolt a kettős foszfolipid membránból. Mindez a plazmamembránhoz köthető életműködések felborulásához, így a sejt pusztulásához vezet (**3. ábra, A**) (Anderson, és mtsi. 2014; Robbins, és mtsi. 2016). Az amB máig az egyik leghatékonyabb szer candidiázis és bármilyen egyéb gombafertőzés kezelésére. Annak ellenére azonban, hogy elsősorban a gombasejtekre jellemző ergoszterollal lép kölcsönhatásba, kisebb affinitással az emberi sejtekben található koleszterolhoz is képes kötődni, ami a gazdasejtekre is káros hatást fejt ki hosszan tartó terápia esetén. A kezelt betegekben leggyakoribb mellékhatásként veseelégtelenség alakul ki, emiatt a toxikus hatás miatt az eredeti deoxikoláttal formulázott kisserelését manapság már igen ritkán alkalmazzák, helyette lipid alapú amB-t használnak, amely lehet amB-lipid komplex, vagy liposzómás amB. A lipidek hordozóként történő alkalmazása jelentősen csökkenti az amB toxikus mellékhatásait, valamint javította farkamokinetikai tulajdonságait (Fanos és Cataldi 2000; Ostrosky-Zeichner, és mtsi. 2010).

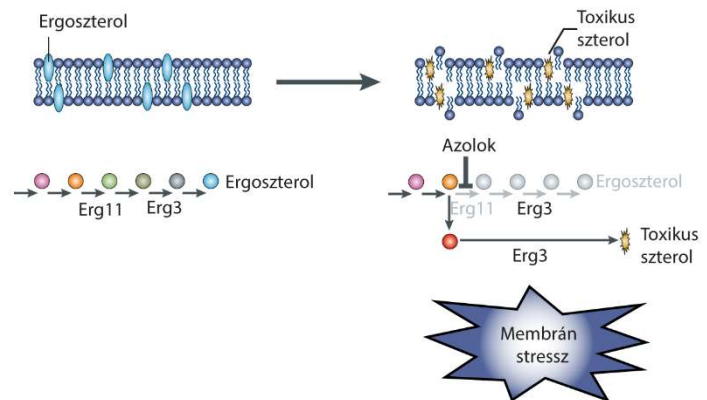
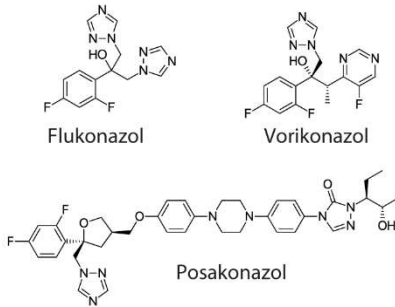
## SZERKEZET

## HATÁSMECHANIZMUS

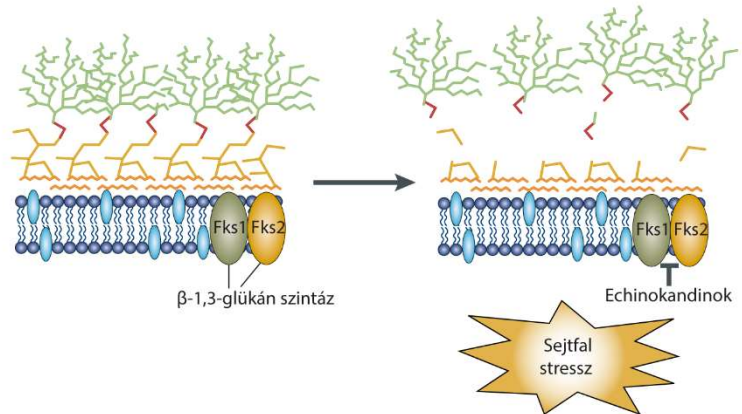
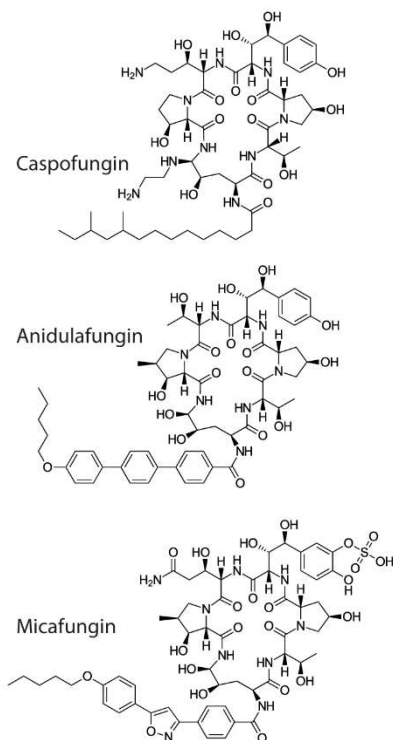
### A Poliének



### B Triazolok



### C Echinokandinok



**3. ábra:** A *Candida* fertőzések esetén alkalmazott (A) polién, (B) triazol és (C) echinokandin típusú antifungális szerek szerkezete és hatásmechanizmusuk

### 3.5.2. Triazolok

Az azolok a legszélesebb körben elterjedt és leggyakrabban alkalmazott antifungális szerek a klinikaiterápiában. Ez köszönhető az alacsony toxicitásuknak és annak, hogy adagolásuk orálisan és intravénásan is történhet. A molekulák felépítésében közös, hogy tartalmaznak legalább egy öttagú heterociklusos gyűrűt, amely attól függően, hogy imidazol vagy triazol típusú molekuláról van szó, 2 vagy 3 nitrogén atomot tartalmaz. *Candida* fertőzések kezelésére a triazolok csoportjába tartozó flukonazolt, vorikonazolt és posakonazolt alkalmaznak (Cuenca-Estrella, és mtsi. 2005; Freifeld, és mtsi. 2011; Pfaller és Diekema 2004; Pfaller és Diekema 2007; Robenshtok, és mtsi. 2007; Zonios és Bennett 2008). Az azolok azonos hatásmechanizmussal rendelkeznek: Az ergoszterol bioszintézisét gátolják (**1. ábra, A**). A molekulák öttagú heterociklusos gyűrűje képes kapcsolódni az ergoszterol bioszintézisben szerepet játszó lanoszterol  $14\alpha$  demetiláz (Erg11) vas atomjához, ezáltal gátolva az enzim működését. Ennek következtében a sejtekben ergoszterol hiány alakul ki, valamint lanoszterol halmozódik fel, amely az általános bioszintézis utat kikerülve alakul tovább előbb obtuszifoliollá, majd  $14\alpha$ -metil-fekoszterollá az *ERG25*, *ERG26* és *ERG27* gének termékeinek hatására. A  $14\alpha$ -metil-fekoszterolból a szterol  $\Delta^{5,6}$ -deszaturáz (Erg3) hozza létre a  $14\alpha$ -metilergoszta-8,24(28)-dién-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diolt, amely toxikus hatású a gombasejtekre nézve (**1. ábra, B**) (Martel, és mtsi. 2010b). Az azolok hatása a *Candida* sejtekre sztatikus hatású, vagyis gátolják a sejtek növekedését és osztódását, de nem pusztítják el azokat (Robbins, és mtsi. 2016). A flukonazolt 1990-ben hagyták jóvá antifungális szerként és azóta a legszélesebb körben alkalmazott gombaellenes szer köszönhetően annak, hogy biztonságosan alkalmazható, valamint, hogy mára már generikumként az ára alapján is a legelérhetőbb szer. A vorikonazol jelentősen nagyobb aktivitással rendelkezik *Candida* fajok ellen, mint a flukonazol (Cuenca-Estrella, és mtsi. 2005). Annak ellenére, hogy gyakran fordul elő a flukonazol és vorikonazol között keresztrezisztencia főleg *C. glabrata*-ban, a vorikonazol kisebb koncentrációban is hatékony flukonazol-rezisztens izolátumokkal szemben más *Candida* fajokban. A vorikonazol hatékonyan gátolja a *C. krusei* növekedését, amelyre a flukonazolnak nincs számottevő hatása *in vitro* körülmények között, mivel a vorikonazol hatékonyabban képes kötődni ennél a fajnál az Erg11 fehérjéhez, mint a flukonazol (Pfaller, és mtsi. 2003). A posakonazol a legújabb elérhető triazol. Az Egyesült Államokban 2006-ban került törzskönyvi bevezetésre, és 2013-tól, illetve 2014-től elérhető orális és intravénás formában. Főként profilaktikus szerként alkalmazzák csontvelő átültetésen átesett betegek és tumorelles kemoterápiából kifolyólag neutropeniás betegek esetében (Cornely, és mtsi. 2007). Kis koncentrációban is

hatékony még flukonazol és vorikonazol keresztrezisztens klinikai izolátumokkal szemben is (Pfaller, és mtsi. 2008).

### 3.5.3. Echinokandinok

Az elmúlt évtizedben egyedül az echinokandinok jelentek meg mint új antifungális szerek csoportja. A klinikumban jelenleg három féle echinokandin érhető el, a caspofungin, az anidulafungin és a micafungin (Robbins, és mtsi. 2016). Az echinokandinok molekuláris szerkezetében elkülöníthető egy, az összes ebbe az osztályba tartozó szerre általánosan jellemző ciklikus, amfifil hexapeptid mag, amelyhez egy, az adott echinokandin molekulára (caspofungin, anidulafungin, micafungin) jellemző acil-lipid oldallánc kapcsolódik N-kötéssel (**3. ábra, C**) (Chen, és mtsi. 2011; Denning 2003; Patil és Majumdar 2017). A caspofungin egy zsírsavból álló, az anidulafungin egy alkoxi-trifenil, a micafungin pedig egy komplex aromás (3,5-difenil-szubsztituált izoxazol) oldallánccal rendelkezik. Az echinokandinok a *Candida* sejtek sejtfa szintézisét gátolják azáltal, hogy nem-kompetitív módon gátolják a  $\beta$ -1,3-glükán szintáz komplex katalitikus alegységét (Fks1 vagy Fks2). Az echinokandinok pontos kapcsolódási helye egyelőre nem ismert, valamint az sem, hogy az echinokandinok kapcsolódási helye a katalitikus alegység intracelluláris vagy extracelluláris részén található-e (Bal 2010; Garcia-Effron, és mtsi. 2009b; Odds, és mtsi. 2003). Az Fks1 gátlásával a gomba sejtfalában jelentősen lecsökken az egyébként a sejtfa száraztömegének 90%-át jelentő  $\beta$ -1,3-glükán mennyisége, ami a sejt ozmotikus instabilitásához, majd ebből adódóan a sejt líziséhez vezet (**3. ábra, C**) (Chandrasekar és Sobel 2006; Wiederhold és Lewis 2007). Mivel az emberi sejtek nem rendelkeznek  $\beta$ -1,3-glükán szintázzal vagy ahhoz hasonló funkciójú enzimmel, így az echinokandinok a legnagyobb biztonsággal alkalmazható antifungális szerek. A korai echinokandin típusú szerek emberi sejtekre kifejtett toxicitása elsősorban a formulálásnak volt köszönhető, ami azóta a fentebb felsorolt szerek esetében már nem tapasztalható (Denning 2003; Patil és Majumdar 2017).

### 3.5.4. Az antifungális terápia gyakorlata

A candidémiás megbetegedések esetében mindig szükséges antifungális szerek használata a fertőzések kezelésére (Pappas, és mtsi. 2016). A központi vénás katéter eltávolítása önmagában nem elégséges módszer a fertőzés megszüntetésére, ugyanis az ilyen esetek rendszerint halálos végkimenetelűek (Fraser, és mtsi. 1992; Nguyen, és mtsi. 1995; Nucci, és mtsi. 1998). A legáltalánosabban alkalmazott antifungális szerek az echinokandinok és a flukonazol, köszönhetően annak, hogy a betegek még az újabb lipid

bázisú amB kissereléseknél is jobban tolerálják ezeket a szereket (Gafer-Gvili, és mtsi. 2008).

A jelenlegi kezelési javaslatokat candidémia és invazív candidiázis esetén az **1. táblázat** foglalja össze (Pappas, és mtsi. 2016). A kezelési javaslatok a betegeket neutropéniás és nem neutropéniás csoportokra osztják fel. *Candida* fertőzés diagnózisát követően elsődleges kezelési eljárást javasolnak, amit utókezelés követhet 5-7 nappal az elsődleges kezelés megkezdése után abban az esetben, ha: 1) a beteg klinikailag stabil, 2) a fertőzést okozó izolátum flukonazolra érzékenynek bizonyul, 3) a beteg vérkultúrája negatív *Candida* fajokra.

<b>1. táblázat: Kezelési módok candidémia és invazív candidiázis esetén (Pappas, és mtsi. 2016).</b>		
Betegcsoport	Kezelés	
	Kiindulási/Elsődleges	Utókezelés
Nem neutropéniás	1. Echinokandin intravénásan elsődleges választás 2. Nem kritikus betegek és nem flukonazol-rezisztens <i>Candida</i> fajjal ( <i>C. glabrata</i> ) fertőződés esetén orális flukonazol adagolás 3. Lipid formulált amfotericin B adagolás egyéb szerekkel szembeni intolerancia esetén, egyéb szerekre való rezisztencia vagy korlátozott hozzáférés esetén	1. Flukonazol 2. <i>C. glabrata</i> fertőzés esetén emelt dózisú flukonazol vagy vorikonazol
Neutropéniás	1. Echinokandin intravénásan 2. Nem kritikus betegek esetén, ha nem részesültek korábban azollal történő kezelésben, orális flukonazol adagolás 3. <i>Candida</i> fertőzés melletti fonalgomba általi fertőzés esetén vorikonazol kezelés	1. Flukonazol vagy vorikonazol kezelés klinikailag stabil betegek esetén, flukonazol-érzékeny izolátumokkal történő fertőzések és negatív vérkultúra esetén

*C. glabrata* és *C. krusei* fertőzések esetén a flukonazol használata kerülendő, mivel a *C. krusei* alapvetően rezisztens flukonazzal szemben és *C. glabrata* izolátumok esetén is egyre gyakrabban fordulnak elő flukonazol-rezisztens izolátumok, amelyek ráadásul gyakran flukonazol és vorikonazol keresztrezisztensek, így ezekkel a fajokkal történő fertőződés esetén hangsúlyozottan ajánlott az echinokandinok alkalmazása (Orozco, és mtsi. 1998; Pappas, és mtsi. 2016; Spellberg, és mtsi. 2006). Világviszonylatban azonban a *Candida* fertőzések kezelésére elsődlegesen a flukonazolt alkalmazzák legnagyobb mennyiségben, ugyanis ez a szer jóval kevesebb mellékhatással rendelkezik, mint az amB, valamint generikumként az egyik leginkább elérhető és gazdaságos szer (Freifeld, és mtsi. 2011; Zonios és Bennett 2008).

### **3.6. A *Candida* nemzetség antifungális szerekkel szemben mutatott rezisztencia mechanizmusai**

Ha az élőlényeket valamilyen külső tényező kibillentí homeosztázisukból, akkor az adott organizmus igyekszik a hatást kompenzálni az éppen rendelkezésére álló adaptációs eszköztárából. Erre jó példa a mikroorganizmusok ellen irányuló antimikrobiális terápia és az adott mikroorganizmusban a terápia ellen kialakuló rezisztencia. A *Candida* fajokban az antifungális rezisztenciát okozó genetikai háttér vagy eleve adott már a fertőzést okozó populáció egy bizonyos töredékében és a terápia hatására ez a genotípus terjed el, vagy pedig a fertőzés során a populáció bizonyos tagjaiban véletlenszerű mutációk jönnek létre és okoznak olyan változásokat, amelyek előnyösek a sejt számára az antifungális kezelés túlélésében. A rezisztencia megléte lehet egy adott faj minden izolátumára jellemző, „veleszületett” rezisztencia (Orozco, és mtsi. 1998; Spellberg, és mtsi. 2006) vagy egy faj bizonyos törzsére jellemző, a kezelés során kialakuló ún. „szerzett” rezisztencia (Costa-de-Oliveira, és mtsi. 2011; Pfaller, és mtsi. 2012).

Általánosan minden antifungális szer csoportra igaz, hogy a hatásuk kifejtése során sejtfal vagy membrán stresszt indukálnak a célsejtben. A mikroorganizmusok is rendelkeznek olyan mechanizmusokkal, amelyek a különböző organelleikat érintő káros hatások ellen hatnak. A *Candida* fajok ellen alkalmazott antifungális szerek hatására általánosan aktiválódnak a Hsp90 (Hősokk protein 90 – Heat Shock Protein 90), kalcineurin és protein kináz C (PKC) jelátviteli útvonalak, amelyek olyan folyamatokat indítanak el a sejt életműködésében, amelyek kompenzálják az adott drog okozta káros hatásokat (Cowen és Lindquist 2005; LaFayette, és mtsi. 2010; Robbins, és mtsi. 2017). Az azokra adott válaszként egyéb más szignáltranszdukciós útvonalak is aktiválódhatnak amelyek a sejtek



túlélését segítik elő, ilyen a TOR-szignalizáció is (Shekhar-Guturja, és mtsi. 2016). Ezek a stresszválaszban szerepet játszó adaptációs folyamatok azonban nem tekinthetők a klasszikus értelemben vett rezisztencia mechanizmusnak, mivel nem kimondottan antifungális szerek ellen hatnak, hanem sokkal általánosabb alkalmazkodási folyamatokként működnek. Például a TOR-jelátviteli útvonal is elsősorban változó tápanyagforráshoz való adaptációban játszik szerepet (Dibble és Manning 2013; Martin és Hall 2005).

A szerzett rezisztencia mechanizmusok rendszerint valamilyen genetikai változás miatt alakulnak ki, amelyek véletlenszerű mutációknak köszönhetők. A véletlenszerű mutációk javítására a *Candida* fajoknak is rendelkezésére áll a megfelelő enzimrendszer, így a véletlen mutációk elterjedése csak akkor lehetséges, ha az valamilyen jelentős előnnyel jár a gomba számára. Ismeretes, hogy a pontmutációkat javító mechanizmus hibáinak hatására megnő a megmaradó pontmutációk mennyisége. A *C. glabrata*-ban az *MSH2* gén elégtelen működése következtében úgynevezett mutátor fenotípus alakul ki, amely megnöveli az olyan mutációk rögzülését a genomban, amelyek a klasszikus értelemben vett rezisztencia mechanizmusok kialakulását okozzák (Healey, és mtsi. 2016). Az alábbiakban az egyes antifungális szerek hatásaival szemben kialakuló rezisztencia mechanizmusok kerülnek bemutatásra.

### **3.6.1. Amfotericin B rezisztencia mechanizmusok**

Az amB legnagyobb affinitással az ergoszterolhoz képes kapcsolódni, míg más szterol vázas molekulákkal csak jóval gyengébb kölcsönhatásra képes (pl. koleszterol) (Odds, és mtsi. 2003). Ebből adódóan az ergoszteroltól eltérő szterolok megjelenése a *Candida* sejtek plazmamembránjában az amB csökkent hatékonyságát okozza. *C. albicans*, *C. tropicalis* és *C. glabrata* amB-rezisztens klinikai és laboratóriumi izolátumaiban felfedezhetők olyan funkcióvesztéses mutációk, amelyek az ergoszterol bioszintézisben szerepet játszó bizonyos enzimeket érintik (Vincent, és mtsi. 2013). Ezek között találhatóak olyan mutációk, amelyek egymagukban képesek az amB-rezisztens fenotípus kialakítására, de az Erg11 funkcióvesztése kizárólag olyan esetben okoz rezisztenciát, ha emellett a toxikus szterolok kialakulásában szerepet játszó Erg3-ban is jelen van a funkcióvesztést okozó mutáció (Martel, és mtsi. 2010a; Sanglard, és mtsi. 2003). Azok a mutációk, amelyek egyedüli megléte is képes amB-rezisztenciát okozni, az Erg6, Erg2, Erg3 és Erg5 enzimeket érintik (Hull, és mtsi. 2012; Martel, és mtsi. 2010a; Vandeputte, és mtsi. 2008). Ezek az enzimdefektusok a lanoszterol, fekoszterol, episzterol vagy az ergoszte-5,7,24(28)-trienol feldúsulásához vezetnek (a szterol származékok sorrendje megfelel az előbb felsorolt enzim

defektusok sorrendjének) (**1. ábra, A**), míg az Erg11 és Erg3 egyidejű elégtelen működése esetén a 14 $\alpha$ -fekoszterol jön létre legnagyobb mennyiségben (**1. ábra, B**) (Martel, és mtsi. 2010b). A képződő szterolvázak közti termékekhez az amB jóval kisebb mértékben képes kapcsolódni, így sem az ergoszterol-amB aggregátumok, sem a membrán integritását megbontó pórusok nem jönnek létre (**4. ábra, A**) (Robbins, és mtsi. 2017). Az amB-rezisztencia kialakulása igen ritka esemény, ugyanis az előbb leírt folyamatok olyan mértékben felborítják a plazmamembrán dinamikáját, hogy azt még a Hsp90 által elindított jelátviteli folyamatok eredménye sem képes teljes egészében kompenzálni, ami miatt a rezisztens sejtek jelentős virulencia csökkenést szenvednek el (Vincent, és mtsi. 2013).

### 3.6.2. Triazol rezisztencia mechanizmusok

Azok ellen a rezisztencia többféle módon is kialakulhat. Leggyakrabban különböző efflux-pumpa fehérjék mennyisége növekszik meg a plazmamembránon. Ezek a fehérjék a sejt életműködése során képződő felesleges vagy káros anyagok sejtéből történő kijuttatásában vesznek részt. Számos kutatás során bebizonyosodott, hogy a flukonazol és a vorikonazol optimális szubsztrátjai a különböző efflux-pumpáknak. Az azol-rezisztencia kialakulásában szerepet játszó ilyen típusú fehérjék alapvetően két osztályba sorolhatóak. Az egyik az ABC-transzporterek (*ATP Binding Cassette*) osztálya, amely pumpák rendelkeznek egy ATP-kötő hellyel, aminek segítségével képesek az ATP hidrolízisére és így a fehérje konformáció megváltoztatásával aktív módon kijuttatnak bizonyos molekulákat a sejtéből. *Candida* fajokban ilyen fehérjék a *CDR1* és *CDR2* (*Candida Drug Resistance*) gének által kódolt pumpafehérjék (Prasad és Goffeau 2012). Ezeknek a géneknek a transzkripció aktivátora a Tac1 (*Transcription Activator of CDR genes*) transzkripció faktor (Coste, és mtsi. 2006; Shapiro, és mtsi. 2011). Bizonyos funkcionyeréses változások a *TAC1* gén szekvenciájában a Tac1 túlműködéséhez és ezáltal fokozott *CDR1* és *CDR2* kifejeződéséhez vezetnek, aminek flukonazol és vorikonazol rezisztencia lehet a következménye (**4. ábra, B/1.**) (Coste, és mtsi. 2006; Liu, és mtsi. 2007; Robbins, és mtsi. 2017). Az efflux-pumpák másik osztályába tartozó fehérjék az MFS-transzporterek (*Major Facilitator Superfamily*) nem rendelkeznek ATP-kötő doménnel, így ezeknek a molekuláknak a működése nem ATP-függő folyamat, az energiát rendszerint a H<sup>+</sup>-grádiens miatt kialakuló H<sup>+</sup>-szimport biztosítja. Ezen fehérjéknek jóval szélesebb a szubsztrátspecifitása, így emelkedett expressziójuk gyakran alakít ki multidrog rezisztens (MDR)-fenotípust. *Candida* fajokban a legfontosabb ilyen MFS gén az *MDR1* (*Multidrug Resistance*), amelynek a transzkripció aktivátora az Mrr1 (*Multidrug-Resistance Regulator*) faktor (Morschhauser, és mtsi. 2007). A Tac1-hez

hasonlóan az Mrr1 transzkripciós faktorban is létrejöhetnek olyan mutációk, amelynek hatására konstitutív válik az Mdr1 termelődése (**4. ábra, B/1.**) (Eddouzi, és mtsi. 2013; Sanglard, és mtsi. 2009).

Az azolok az Erg11 gátlása révén az ergoszterol bioszintézisét eltérítik a toxikus szterolképződés irányába az Erg3 működésének hatására (**3. ábra, B**). Bizonyos esetekben előfordul, hogy az egyébként ergoszterol bioszintéziséhez szükséges Erg3 funkcióvesztéses változást szenved el. Ilyen esetekben az adott azol ugyan eltolja a szterolszintézis útvonalát az ergoszterol képződés irányától, ám a toxikus 14 $\alpha$ -metilergoszta-8,24(28)dién-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol képződése nem megy végbe, hanem megáll a 14 $\alpha$ -metil-fekoszterolnál, amely bizonyos mértékben képes ellátni a szterolok funkcióját a gomba plazmamembránjában (**3. ábra, B és 4. ábra, B/2.**) (Lupetti, és mtsi. 2002a; Martel, és mtsi. 2010b). A korábbiaknak megfelelően, az Erg3 működésének hiánya általában amB és azolok közötti keresztrezisztenciát okoz (White, és mtsi. 1998).

Egy harmadik módja az azolokra való rezisztencia kialakulásának az azolok célpontját, az Erg11 enzimet érinti. Előfordulnak olyan azol-rezisztens *Candida* izolátumok, elsősorban *C. glabrata* esetében, amelyek *ERG11* génje olyan mutációt hordoz, amely a képződő fehérje funkcióját nem, vagy csak kis mértékben befolyásolja, viszont megakadályozza az azolok bekötését a hem-csoportoz (b) (**4. ábra, B/3.**) (Morio, és mtsi. 2010). Bizonyos esetekben az Erg11 jelentős mértékben megnövekedett mennyisége is vezethet azol-rezisztenciához azáltal, hogy a sejtben jelen lévő azol mennyiség nem képes lefedni az Erg11 teljes mennyiségét (**4. ábra, B/3.**) (Akins 2005; Perea, és mtsi. 2001). Az Erg11 megemelkedett expressziója rendszerint az Upc2 transzkripciós faktor funkciónyeréses megváltozásának köszönhető, amely általánosságban aktivátora az ergoszterol bioszintézisben szerepet játszó gének transzkripciójának (Flowers, és mtsi. 2012; Jiang, és mtsi. 2013).

### 3.6.3. Echinokandin rezisztencia mechanizmusok

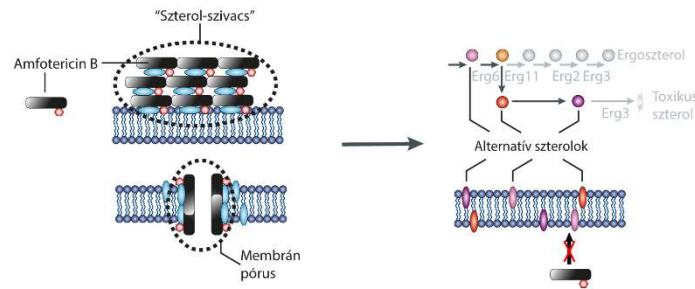
A *Candida* fajok többsége érzékeny echinokandinokra, ezek közül a fajok közül a *C. parapsilosis* esetén tapasztalható legmagasabb MIC érték (*Minimal Inhibitory Concentration*) (Kofteridis, és mtsi. 2010). Az általános érzékenység ellenére folyamatosan jelennek meg rezisztens *C. albicans* és *C. glabrata* izolátumok a klinikumban. Ezekben a fajokban a rezisztencia kialakulása elsősorban az Fks1  $\beta$ -1,3-glükán szintáz fajok között is konzerváltságot mutató mutációs forrópont (Hot Spot 1, HS1 és Hot Spot 2, HS2) régióiban bekövetkező aminosav cserékhez köthető, mint szerzett rezisztencia mechanizmus (Garcia-

Effron, és mtsi. 2009b). Mivel a *C. glabrata*-ban az Fks1 és Fks2 funkciója redundanciát mutat, ebből adódóan ennél a fajnál az Fks2 HS-régióit érintő aminosav változások is rezisztenciát okozhatnak (Garcia-Effron, és mtsi. 2009a). Annak ellenére, hogy az echinokandinok pontos kötőhelye a  $\beta$ -1,3-glükán szintázon nem ismert, a HS-régiókban bekövetkező bizonyos aminosav szubsztitúciók az echinokandinok csökkent növekedésgátló képességét okozzák (**4. ábra, C**) (Cowen, és mtsi. 2014; Perlin 2015). Nemrégiben egy harmadik HS-régiót (HS3) is leírtak *S. cerevisiae*-ben, amelyben bekövetkező aminosav cserék szintén rezisztens fenotípus megjelenését okozták (Johnson és Edlind 2012; Johnson, és mtsi. 2011). A *C. parapsilosis* fajcsoport tagjaiban megfigyelhető, hogy ezek a fajok rendelkeznek a legmagasabb MIC értékekkel echinokandinokra. Ezt a tulajdonságot annak tulajdonítják, hogy a fajcsoport tagjainak Fks1 fehérjéiben egy polimorf aminosav csere történt, amely egyetlen másik fajban sem található meg. Egész pontosan az enzim *C. albicans*-ban fellelhető 649. aminosava prolin, míg *C. parapsilosis*-ban az ennek megfelelő pozíciójú aminosav (660) alanin (Garcia-Effron, és mtsi. 2008).

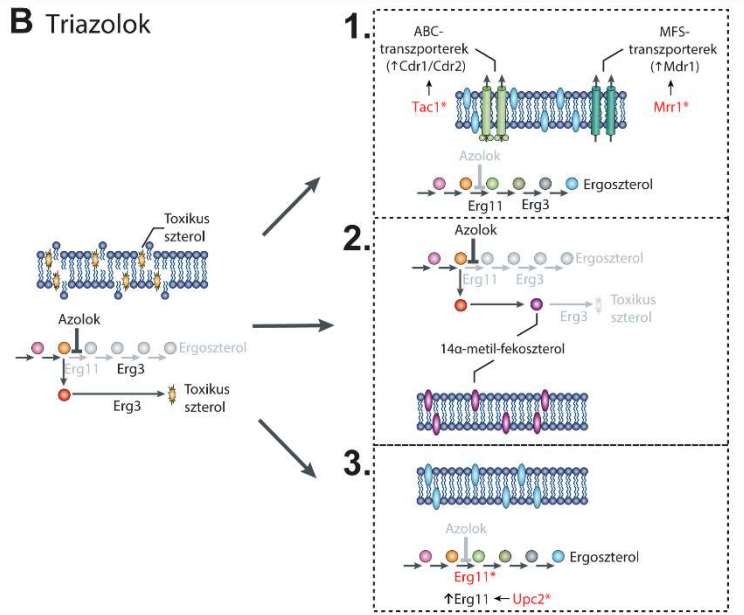
## HATÁSMECHANIZMUS

## REZISZTENCIA MECHANIZMUS

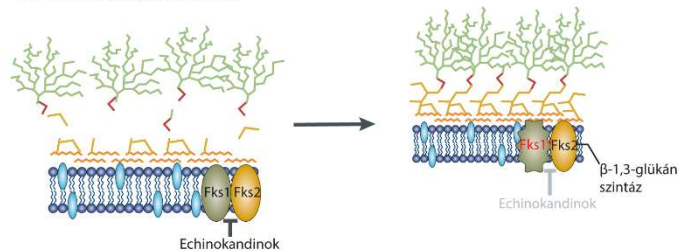
### A Poliének



### B Triazolok



### C Echinokandinok



**4. ábra:** Antifungális rezisztencia mechanizmusok. **(A)** Poliénekkal szemben a rezisztenciát az amB szterolokkal való gyenge kapcsolódása okozza az alternatív szterolok feldúsulása miatt. **(B)** Az azolokra több módon is kialakulhat rezisztencia: 1. efflux-pumpák túlműködése okán lecsökken az azol koncentrációja; 2. az Erg3 funkcióvesztése miatt nem jön létre toxikus szterol származék az azolok gátló hatása mellett sem; 3. az azolok által gátolt Erg11 expressziója megnő, vagy olyan mutáció következik be az Erg11-ben, amely az azolok elégtelen kapcsolódását okozza. **(C)** Az echinokandinokkal szembeni rezisztencia oka, hogy az Fks1-ben olyan aminosav szubsztitúció következik be, amely meggátolja az echinokandinok kötődését az enzimhez (Robbins, és mtsi. 2017).

#### 4. Célkitűzések

Munkánk célja volt, hogy az egyre nagyobb egészségügyi jelentőséggel bíró *C. parapsilosis*-ban megvizsgáljuk az antifungális szerekkel szemben kialakuló rezisztencia mechanizmusokat. Arra is választ kerestünk, hogy a *C. parapsilosis*-ban azolokkal és echinokandinokkal szemben kialakuló rezisztencia milyen egyéb fiziológiai változásokat idéz elő, amelyeknek hatása lehet a gomba élet- és fertőzőképességére.

A kérdéseink megválaszolására az alábbi célokat tűztük ki:

1. *CDR1-2* (ABC-transzporter) deléciós duplamutánsok létrehozása *C. parapsilosis*-ban, majd a létrehozott törzsek antifungális érzékenységének és virulenciájának vizsgálata.
2. Direkt szelekciós módszerrel echinokandin (caspofungin, anidulafungin, micafungin) rezisztens *C. parapsilosis* törzsek létrehozása, majd a mikroevolúciós eljárással létrehozott törzsek antifungális érzékenységének, életképességének és virulenciájának vizsgálata.
3. Direkt szelekciós módszerrel triazol (flukonazol, vorikonazol, posakonazol) rezisztens *C. parapsilosis* törzsek létrehozása, majd a mikroevolúciós eljárással létrehozott törzsek antifungális érzékenységének, életképességének és virulenciájának vizsgálata.

## 5. Anyagok és módszerek

### 5.1. Anyagok

#### 5.1.1. Felhasznált törzsek

<b>2. táblázat: Felhasznált, illetve létrehozott <i>C. parapsilosis</i> törzsek</b>			
<b>Törzs</b>	<b>Genotípus</b>	<b>Eredet</b>	<b>Referencia</b>
GA1 (Vad Típus)	<i>CpCDR1-CpCDR2/ CpCDR1-CpCDR2</i>	Klinikai izolátum	(Gacser, és mtsi. 2005)
<i>CDR1-2</i> HE <sup>R</sup>	<i>CpCDR1- CpCDR2/Δcpcdr1- Δcpcdr2::SAT1-FLIP</i>	GA1 (VT)	Jelen dolgozat
<i>CDR1-2</i> HE <sup>S</sup>	<i>CpCDR1-CpCDR2/ Δcpcdr1-Δcpcdr2::FRT</i>	<i>CDR1-2</i> HE <sup>R</sup>	Jelen dolgozat
<i>CDR1-2</i> KO <sup>R</sup>	<i>Δcpcdr1-Δcpcdr2/ Δcpcdr1-Δcpcdr2::SAT1- FLIP</i>	<i>CDR1-2</i> HE <sup>S</sup>	Jelen dolgozat
<i>CDR1-2</i> KO <sup>S</sup>	<i>Δcpcdr1-Δcpcdr2/ Δcpcdr1-Δcpcdr2::FRT</i>	<i>CDR1-2</i> KO <sup>R</sup>	Jelen dolgozat
CLIB 214 (Vad Típus)	-	Laboratóriumi törzs	(Laffey és Butler 2005)
FLU <sup>ADP</sup>	-	CLIB 214 (VT)	Jelen dolgozat
FLU <sup>EVO</sup>	-	FLU <sup>ADP</sup>	Jelen dolgozat
VOR <sup>ADP</sup>	-	CLIB 214 (VT)	Jelen dolgozat
VOR <sup>EVO</sup>	-	VOR <sup>ADP</sup>	Jelen dolgozat
POS <sup>ADP</sup>	-	CLIB 214 (VT)	Jelen dolgozat
POS <sup>EVO</sup>	-	POS <sup>ADP</sup>	Jelen dolgozat
CAS <sup>ADP</sup>	-	CLIB 214 (VT)	Jelen dolgozat
CAS <sup>EVO</sup>	-	CAS <sup>ADP</sup>	Jelen dolgozat
AND <sup>ADP</sup>	-	CLIB 214 (VT)	Jelen dolgozat
AND <sup>EVO</sup>	-	AND <sup>ADP</sup>	Jelen dolgozat
MIC <sup>ADP</sup>	-	CLIB 214 (VT)	Jelen dolgozat
MIC <sup>EVO</sup>	-	MIC <sup>ADP</sup>	Jelen dolgozat

(HE: heterozigóta, KO: *knock out*, R: nourseothricin rezisztens, S: nourseothricin szenzitív, *SAT1-FLIP*: deléciós kazetta, FLU: flukonazol, VOR: vorikonazol, POS: posakonazol, CAS: caspofungin, AND: anidulafungin, MIC: micafungin, ADP: adaptált, EVO: evolvált)

### 5.1.2. Alkalmazott primer sejtek és sejtvonalak

Perifériás vérből izolált mononukleáris sejtek (PBMC)

Perifériás vérből izolált mononukleáris sejtekből differenciáltatott makrofágok (PBMC-DM)

J774.2 sejtvonala

-BALC/c nőstény egerek tumoros sejtcsoportjából izolált monocitaszerű sejtvonala

### 5.1.3. Táptalajok, tápoldatok, egyéb oldatok

Élesztő-pepton-glükóz (YPD) tápoldat

- 1% (m/V) glükóz (Spektrum 3D)
- 1% (m/V) pepton (Reanal)
- 0,5% (m/V) élesztőkivonat (Diagnostica MERCK)
- 100 U/ml penicillin-sztreptomycin oldat (Sigma-Aldrich)

Élesztő-pepton-glükóz (YPD) táptalaj

- 1% (m/V) glükóz (Spektrum 3D)
- 1% (m/V) pepton (Reanal)
- 0,5% (m/V) élesztőkivonat (Diagnostica MERCK)
- 2% (m/V) agar (WVR)
- 100 U/ml penicillin-sztreptomycin oldat (Sigma-Aldrich)

Sabouraud tápoldat

- 4% (m/V) glükóz (Spektrum 3D)
- 1% (m/V) pepton (Reanal)
- 100 U/ml penicillin-sztreptomycin oldat (Sigma-Aldrich)

YPD táptalaj az evolvált törzsek fenntartásához

- 1% (m/V) glükóz (Spektrum 3D)
- 1% (m/V) pepton (Reanal)
- 0,5% (m/V) élesztőkivonat (Diagnostica MERCK)
- 2% (m/V) agar (WVR)
- 100 U/ml penicillin-sztreptomycin oldat (Sigma-Aldrich)
- + 16 µg/ml caspofungin, 16 µg/ml anidulafungin, 16 µg/ml micafungin, 64 µg/ml flukonazol, 8 µg/ml vorikonazol vagy 8 µg/ml posakonazol



J774.2 sejtek tenyésztésére használt tápoldat

- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Lonza)
- 10% (V/V) sterilre szűrt és hőinaktivált FBS (Fetal Bovine Serum, Lonza)
- 100 U/ml penicillin-sztreptomycin oldat (Sigma-Aldrich)

PBMC izolálásához használt oldat

- Ficoll-Paque<sup>TM</sup> PLUS endotoxin tesztelt, sűrűség: 1,077 g/ml  $\pm$  0,001 g/ml (20 °C)  
(GE Healthcare)

PBMC-DM tápoldat differenciálathoz

- X-VIVO 15 tápoldat (Lonza)
- 100 U/ml penicillin-sztreptomycin oldat (Sigma-Aldrich, Németország)
- 10 ng/ml rekombináns humán granulocita-monocita kolónia-stimuláló faktor  
(GM-CSF, Thermo Fischer Scientific)

PBMC és PBMC-DM sejtek fertőzéséhez használt tápoldat

- RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640) (Lonza)
- 100 U/ml penicillin-sztreptomycin oldat (Sigma-Aldrich)

Antifungális érzékenység teszteléséhez használt tápoldat

- MOPS-ot tartalmazó RPMI 1640 (Lonza)
- 100 U/ml penicillin-sztreptomycin oldat (Sigma-Aldrich)

Antifungális szerek

- Amfotericin B (AppliChem), Flukonazol (Fluka), Vorikonazol (Fluka),  
Posakonazol (Fluka), Itrakonazol (MedChem Express), Caspofungin (Fluka),  
Anidulafungin (MedChem Express), Micafungin (MedChem Express)

Foszfát pufferelt só oldat (Phosphate Buffered Saline, PBS)

- 137 mM NaCl
- 2,7 mM KCl
- 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- Steril MilliQ desztillált víz

#### 5.1.4. *C. parapsilosis* CDR1-2 KO mutáns létrehozásához használt anyagok

##### Polimeráz láncreakció (PCR)

Indítószekvenciák:

- CDR2upF: 5'-TTTTTTGGTACCGCCGCATATAGTCCTCGTAAAG-3' (*KpnI*)
- CDR2upR: 5'-TTTTTTGGGCCCGCCGTGGGTAAAAAGTATCAAC-3' (*ApaI*)
- CDR1doF: 5'-TTTTTTCCGCGGGCGGTTGTAAATAGTCGTGTTG-3' (*SacII*)
- CDR1doR: 5'-TTTTTTGAGCTCCGTGTTCCATCCATTTTGTTAC-3' (*SacI*)
  
- CDR\_downprobe\_Frw: 5'-GCGGTTGTAAATAGTCGTGTTG-3'
- CDR\_downprobe\_Rev: 5'-CGTGTTCCATCCATTTTGTTAC-3'

Reagensek

dNTP mix (Thermo Scientific)

- 10 mM dATP
- 10 mM dCTP
- 10 mM dGTP
- 10 mM dTTP

DIG-dNTP mix (Southern hibridizációs próba amplifikálásához)

- 0,5 µl dATP (10 mM)
- 0,5 µl dCTP (10 mM)
- 0,5 µl dGTP (10 mM)
- 0,375 µl dTTP (10 mM)
- 1,335 µl DIG-dUTP (10 mM) (Roche)
- 1,79 µl Desztillált víz

PCR elegy a Southern hibridizációs próba amplifikálásához

- 2,5 µl 10x DreamTaq puffer (Thermo Scientific)
- 5 µl DIG-dNTP mix
- 1 µl CDR\_downprobe\_Frw primer (2,5 nM)
- 1 µl CDR\_downprobe\_Rev primer (2,5 nM)
- 1 ng templát DNS (*C. p.* GA1 genomi DNS (gDNS))
- 1 U DreamTaq enzim (Thermo Scientific)
- 14 µl Desztillált víz

PCR elegy a homológ régiók amplifikálásához

- 2,5 µl 10x DreamTaq puffer (Thermo Scientific)
- 5 µl dNTP mix
- 1 µl CDR2upF / CDR1doF primer (2,5 nM)
- 1 µl CDR2upR / CDR1doR primer (2,5 nM)
- 1 ng templát DNS (*C. p.* GA1 genomi DNS (gDNS))
- 1 U DreamTaq enzim (Thermo Scientific)
- 14 µl Desztillált víz

PCR program a Southern hibridizációs próba amplifikálásához

- |    |  |              |                  |
|----|--|--------------|------------------|
| 1. | 95 °C                                      | 3 perc       | elődenaturáció   |
| 2. | 95 °C                                      | 30 másodperc | denaturáció      |
| 3. | 54 °C                                      | 30 másodperc | hibridizáció     |
| 4. | 72 °C                                      | 2 perc       | polimerizáció    |
| 5. | 2-4. lépés ismétlése 35 cikluson keresztül |              |                  |
| 6. | 72 °C                                      | 5 perc       | utópolimerizáció |

PCR program a homológ régiók amplifikálásához

- |    |  |              |                  |
|----|--|--------------|------------------|
| 1. | 95 °C                                      | 3 perc       | elődenaturáció   |
| 2. | 95 °C                                      | 30 másodperc | denaturáció      |
| 3. | 58 °C                                      | 30 másodperc | hibridizáció     |
| 4. | 72 °C                                      | 2 perc       | polimerizáció    |
| 5. | 2-4. lépés ismétlése 35 cikluson keresztül |              |                  |
| 6. | 72 °C                                      | 5 perc       | utópolimerizáció |

### Restriktív emésztés (16 h, 30 °C)

pSFS2a plazmid és homológ régiók emésztése

- 2 µg DNS (pSFS2a / CDR2Up / CDR1Do)
- 1 U *KpnI* / *SacII* enzim
- 1 U *ApaI* / *SacI* enzim
- 1 µl 10x *KpnI* puffer / 10x Blue puffer

gDNS emésztése Southern hibridizációhoz

- 10 µg gDNS
- 1 U *ScaI* enzim
- 20 µl 10x *ScaI* puffer

-166 µl AccuGene desztillált víz

### **Candida transzformáció**

TRIS-EDTA (TE) oldat

-10 mM Trisz-(hidroximetil)-amino-metán-hidroklorid (TRIS-HCl)

-1 mM EDTA

pH 7,5

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

### **Southern hibridizáció**

Lízis puffer (totál DNS izoláláshoz)

-1%(m/V) nátrium-dodecil-szulfát (SDS)

-50 mM EDTA

-100 mM TRIS (pH=8)

Denaturáló oldat 500 ml-re

-10 g NaOH

-43,8 g NaCl

Neutralizációs oldat 500 ml-re

-125 ml 2 M TRIS (pH 7,5)

-43,5 g NaCl

-1 ml 0,5M EDTA (pH 8)

20x nátrium-klorid – nátrium citrát puffer (SSC)

-0,3 M Na-citrát

-3 M NaCl

Hibridizációs puffer

-5x SSC

-0,1% N-lauril-szarkozin

-0,02% SDS

-1%(m/V) Blokkoló reagens (Sigma Aldrich)

1. mosó puffer 50 ml-re

- 5 ml 20x SSC
- 0,5 ml 10% SDS

2. mosó puffer 50 ml-re

- 2,5 ml 20x-os 2-es mosó oldat

10x-es 1-es detektáló puffer

- 0,1 M maleinsav
- 0,15 M NaCl
- pH 7,5

2. detektáló puffer

- 1%(m/V) blokkoló reagens (Sigma Aldrich) 1x 1. pufferben oldva

3. detektáló puffer

- 0,1 M TRIS-HCl
- 0,1 M NaCl
- 50 mM MgCl<sub>2</sub>
- pH 9,5

### 5.1.5. Abiotikus stressz vizsgálatához használt táptalajok

Különböző pH-n történő növekedés vizsgálata

YPD táptalaj (McIlvaine szerint):

- 1%(m/V) glükóz
- 1,5%(m/V) agar
- 1%(m/V) pepton
- 0,5%(m/V) élesztő kivonat
- 100 U/ml penicillin-sztreptomycin oldat
- +McIlvaine-puffer a pH-nak megfelelő összetételben:

pH=	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (ml)	Citromsav (ml)
4	15,4	24,6
5	20,6	19,4
6	25,3	14,7
7	32,9	7,1
8	38,9	1,1

## Különböző ozmotikumok jelenlétében történő növekedés vizsgálata

YPD táptalaj:

- 1%(m/V) glükóz
- 1,5%(m/V) agar
- 1%(m/V) pepton
- 0,5%(m/V) élesztő kivonat
- 100 U/ml penicillin-sztreptomycin oldat

+ ozmotikum:

	Koncentráció	Mennyiség 50 ml-hez
Glicerol	8% m/V	4,6 ml (87%-os oldat)
	10% m/V	5,75 ml (87%-os oldat)
	12% m/V	6 ml (87%-os oldat)
NaCl	1 M	2,92 g
	1,5 M	4,38 g
Szorbitol	1 M	9 g
	1,5 M	13,66 g

## Oxidatív stresszorok jelenlétében történő növekedés vizsgálata

YPD táptalaj 50 ml:

- 1%(m/V) glükóz
- 1,5%(m/V) agar
- 1%(m/V) pepton
- 0,5%(m/V) élesztő kivonat
- 100 U/ml penicillin-sztreptomycin oldat

+ oxidatív stresszor:

	Koncentráció	Mennyiség 50 ml-hez
CdSO <sub>4</sub>	0,05 mM	25 µl (0,1 M-os oldat)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	5 mM	76,6 µl (10%-os oldat)
	10 mM	153,2 µl (10%-os oldat)

## Sejtfalképződést zavaró, nem antibiotikus hatású anyagok jelenlétében történő növekedés vizsgálata

YPD táptalaj 50 ml:

- 1%(m/V) glükóz

- 1,5%(m/V) agar
- 1%(m/V) pepton
- 0,5%(m/V) élesztő kivonat
- 100 U/ml penicillin-sztreptomycin oldat

+ sejtfa stresszor:

	Koncentráció	Mennyiség 50 ml-hez
Koffein	12,5 mM	8,93 ml (70 mM-os oldat)
	15 mM	10,71 ml (70 mM-os oldat)
	17,5 mM	12,5 ml (70 mM-os oldat)
Kalkofluor fehér (CW)	50 µg/ml	250 µl (10 mg/ml-es oldat)
	75 µg/ml	375 µl (10 mg/ml-es oldat)
	100 µg/ml	500 µl (10 mg/ml-es oldat)
Kongó vörös (CR)	10 µg/ml	50 µl (10 mg/ml-es oldat)
	25 µg/ml	125 µl (10 mg/ml-es oldat)
	50 µg/ml	250 µl (10 mg/ml-es oldat)
	75 µg/ml	375 µl (10 mg/ml-es oldat)

Membránkárosító ágensek jelenlétében történő növekedés vizsgálata

YPD táptalaj 50 ml:

- 1%(m/V) glükóz
- 1,5%(m/V) agar
- 1%(m/V) pepton
- 0,5%(m/V) élesztő kivonat
- 100 U/ml penicillin-sztreptomycin oldat

+ membránkárosító stresszor:

	Koncentráció	Mennyiség 50 ml-hez
SDS	0,02% m/V	50 µl (20%-os oldat)
	0,04% m/V	100 µl (20%-os oldat)
	0,06% m/V	150 µl (20%-os oldat)

### 5.1.6. Genom szekvenálás során felhasznált kitek

#### Genomi DNS könyvtár készítés

- NEBNext® *Ultra II DNA Library Prep Kit for Illumina* (24 rxn) (Kvalitex)
- NEBNext® *Multiplex Oligos for Illumina* (Index Primer Set 1) (Kvalitex)

-NEBNext® *Library Quant Kit for Illumina* (100 rxn) (Kvalitex)

## Szekvenálás

-Illumina MiSeq Reagent Kit v3 (600 cycle) (Genetica)

### 5.1.7. Fagocitózis kísérlet során alkalmazott anyagok

-Alexa Fluor® 488 carboxylic acid, succinimidyl ester (Invitrogen)

-Alexa Fluor® 647 carboxylic acid, succinimidyl ester (Invitrogen)

-pHrodo™ Red, succinimidyl ester (pHrodo™ Red, SE) (Invitrogen)

### 5.1.8. *In vivo* kísérletekben alkalmazott állatok

-A/J egerek (The Jackson Laboratory, Albert Einstein College of Medicine)

-BALB/c egerek (The Jackson Laboratory, MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont)

-TruLarv™ *Galleria mellonella*, nagy viaszmosoly lárva (BioSystems Technology)

## 5.2. Módszerek

### 5.2.1. *C. parapsilosis* GA1 törzs transzformálása

A *C. parapsilosis* 50 ml-nyi, 1 éjszakán át YPD tápoldatban rázatott szuszpenzióját centrifugáltuk 5 percen át 6000 rcf-fel, majd a sejteket TE oldattal mostuk. Az újabb centrifugálást (5 perc, 6000 rcf) követően a pelletet 30 ml TE-lítium acetát oldatban szuszpendáltuk fel, majd 45 percen keresztül 30 °C-on rázattuk (150 rpm), ezt követően a tenyészethez 750 µl 1 M-os ditiotreitolt adtunk és további 15 percen át rázattuk (150 rpm) 30 °C-on. Ezután steril desztillált vizet adtunk a tenyészethez, centrifugálás (5 perc, 6000 rcf) után pedig a sejteket kétszer mostuk jéghideg steril desztillált vízzel. Ezután a sejteket 1 M-os szorbitollal mostuk, centrifugálás (5 perc, 6000 rcf) után a szorbitol nagy részét eltávolítottuk, majd a maradék felülúszóban felsuszpendáltuk és a sejteket az elektroporálásig jégen tartottuk. Az így kompetenssé tett sejtek 40 µl-ét a megfelelő DNS-sel (1-5 µg DNS) összekevertük, majd elektroporáló küvettába pipettáztuk. Az elektroporáció paraméterei: 1,5 kV, 25 µF, 200 ohm voltak. Az elektroporáció után a küvettákat jégre helyeztük és a sejtekhez 1 ml 1 M szorbitolt tartalmazó YPD tápoldatot adtunk. A sejteket ezt követően 3 órán keresztül 30 °C-on rázatva regeneráltuk, majd a sejteket nourseothricin (20 µg/ml) tartalmú szelektív táptalajra szélesztettük és 30 °C-on inkubáltuk.



### 5.2.2. Southern hibridizáció

A genomi DNS korábban leírt emésztését követően a DNS-t izopropanollal csaptuk ki és 10 percig 14000 rcf-fel centrifugáltuk. A pelletet steril desztillált vízben vettük fel, majd 0,8%-os agaróz/TAE gélen elektroforetizáltuk. A gélt ezután 1% töménységű etídium-bromiddal festettük, majd denaturáló oldatban 30 percen keresztül rázattuk (20 rpm). A DNS denaturálását követően a gélt kétszer 20 percen keresztül neutralizációs oldatban kezeltük. A neutrális pH elérése után összeállítottuk a blottoló piramist és a kapilláris blottolást egész éjszakán keresztül végeztük, melyhez 20x SSC-t alkalmaztunk.

A blottoló piramis szétszedése után a Hybond N filteren a DNS fragmentumokat UV fényrel rögzítettük. A filtert hibridizációs csőbe helyeztük a DNS-t tartalmazó oldalával befelé és hibridizációs pufferrel 4 órán keresztül 65 °C-on hibridizációs sütőben forgatva inkubáltuk. Ezt követően a filtert a hibridizációs pufferhez adott jelölt próbával 65 °C-on egy éjszakán keresztül hibridizáltuk. A hibridizációs kísérleteket megelőzően a DNS próbát 10 perc 100 °C-on, majd 10 perc 4 °C-on történő inkubálással denaturáltuk.

A következő napon a jelölt próbát tartalmazó hibridizációs puffer leöntése után a filtert 1. mosó oldatban kétszer 5 percig mostuk szobahőmérsékleten, majd 2. mosó oldattal kétszer 15 percig mostuk a hibridizációs sütőben forgatva 65 °C-on. Az ezt követő összes többi lépés szobahőmérsékleten zajlott. A 2. mosó oldat eltávolítása után a filtert 1., majd pedig 2. detektáló pufferrel öblítettük át. Ezután a filtert a 2. detektáló pufferhez adott antitest konjugátum (Sigma Aldrich) jelenlétében inkubáltuk 30 percen keresztül, majd a felesleges, nem kötődött antitestet 1. detektáló pufferrel való mosás segítségével távolítottuk el. Ezt követően a filtert 3. detektáló pufferben forgattuk 1 percig, majd a detektálás utolsó lépéseként a filtert a 3. detektáló pufferhez adott 200 µl NBT-BCIP előhívó reagenssel (Sigma Aldrich) inkubáltuk. A hibridizációs membránt a színreakció megjelenéséig sötétben inkubáltuk, majd a felesleges előhívó reagenst desztillált vizes mosással eltávolítottuk.

### 5.2.3. *C. parapsilosis* törzsek antifungális érzékenységének meghatározása

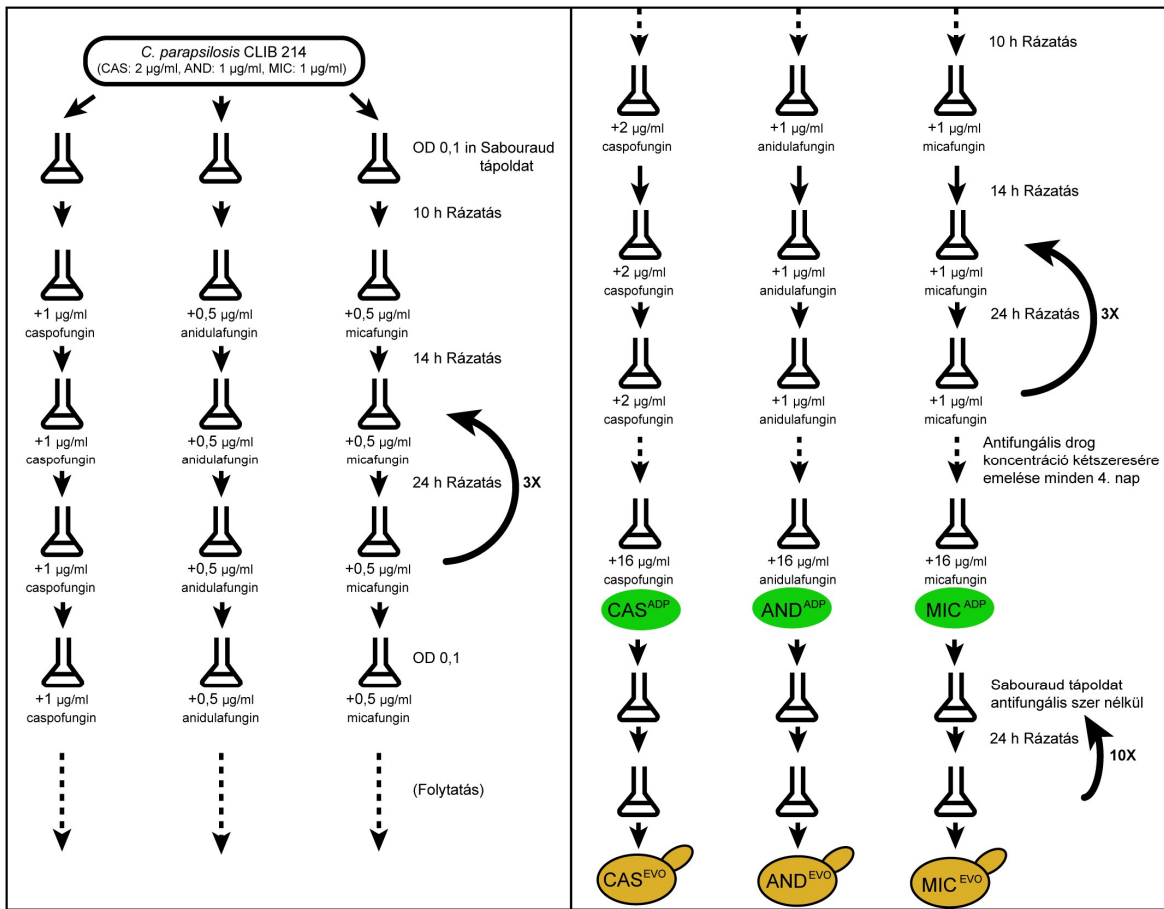
A *C. parapsilosis* törzsek antifungális érzékenységének meghatározása a National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) M27-A3 protokolljának megfelelően történt (CLSI 2008). A minimális gátló koncentrációk (MIC) amB és azok esetén a 90%-os növekedés gátlást okozó, echinokandinok esetében 50%-os gátlást okozó koncentrációkat jelentették. Az érzékenységet és rezisztenciát jelentő koncentrációk meghatározása a National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) M27-S4

kiegészítő protokolljának használatával történt. A kísérleteket két ismétlésben hajtottuk végre.

#### 5.2.4. Echinokandin- és azol evolvált törzsek létrehozása

Az evolvált törzsek létrehozása irányított szelekciós módszerrel történt. A szelekciós nyomás kialakítását megelőzően megállapítottuk a *C. parapsilosis* CLIB 214 törzs érzékenységet caspofunginra, anidulafunginra, micafunginra, flukonazolra, vorikonazolra, valamint posakonazolra. A CLIB 214 törzs sejtsűrűségét optikai denzitás (OD) 600 nm-en beállítottuk 0,1-re és 10 órán át ráztuk (150 rpm) 6 lombikban 30 °C-on Sabouraud tápoldatban. Ezt követően a szuszpenziókhöz hozzáadtuk az egyes antifungális szereket a MIC érték felének megfelelő koncentrációban (caspofungin: 1 µg/ml; anidulafungin: 0,5 µg/ml; micafungin: 0,5 µg/ml; flukonazol: 0,5 µg/ml; vorikonazol: 0,015 µg/ml; posakonazol: 0,015 µg/ml). A tenyészeteket ezután további 14 órán át ráztuk (150 rpm, 30 °C), majd a sejtek centrifugálással (4000 rcf, 5 perc) történő összegyűjtése után friss, a MIC érték felének megfelelő antifungális szerrel kiegészített tápoldatban ráztuk (150 rpm, 30 °C) 24 órán keresztül, ezt a rázatási lépést további két alkalommal ismételtük. A következő (4.) napon a tenyészetek OD-ját beállítottuk 0,1-re és a sejteket a MIC érték felének megfelelő drog koncentrációban ráztuk (150 rpm, 30 °C) 10 órán keresztül, majd a tenyészetekben az előzőleg használt koncentrációkhoz képest kétszeresére emeltük a megfelelő antifungális szerek koncentrációját, majd 14 órán keresztül ráztuk (150 rpm, 30 °C) a tenyészeteket. A tápoldatot ezután friss tápoldatra cseréltük, amely már a kétszeres koncentrációt tartalmazta az adott antifungális szerből, a szuszpenziókat így ráztuk (150 rpm, 30 °C) 24 órán keresztül, majd ezt a lépést további két alkalommal ismételtük. A következő napon ismét kétszeresére emeltük az antibiotikumok mennyiségét a tenyészetekben. A leírt tenyésztési ciklusokat az antifungális szerek kétszerezésével együtt addig folytattuk, amíg el nem értük a tenyészetekben a következő drog koncentrációkat: caspofungin: 16 µg/ml, anidulafungin: 16 µg/ml, micafungin: 16 µg/ml, flukonazol: 64 µg/ml, vorikonazol: 8 µg/ml, posakonazol: 8 µg/ml. Ezek a törzsek lettek az adaptált törzsek (CAS<sup>ADP</sup>, AND<sup>ADP</sup>, MIC<sup>ADP</sup>, FLU<sup>ADP</sup>, VOR<sup>ADP</sup>, POS<sup>ADP</sup>). Az így létrehozott törzseket ezt követően átoltottuk antifungális szert nem tartalmazó Sabouraud tápoldatba és 24 óráig ráztuk (150 rpm, 30 °C), ezt a lépést 10 alkalommal ismételtük minden alkalommal 100 µl szuszpenzió átoltásával, így létrehozva az evolvált törzseket (CAS<sup>EVO</sup>, AND<sup>EVO</sup>, MIC<sup>EVO</sup>, FLU<sup>EVO</sup>, VOR<sup>EVO</sup>, POS<sup>EVO</sup>). A direkt szelekció folyamatát az echinokandinok példáján az

**5. ábra** foglalja össze. Minden esetben egy sejt tenyészetekből gyűjtöttük le az adott törzset és ennek használatával hajtottuk végre kísérleteinket.



**5. ábra:** Az evolált törzsek létrehozásának folyamata az echinokandin evolált törzsek példáján.

### 5.2.5. Abiotikus stressztolerancia vizsgálata

A *C. parapsilosis* törzsek szuszpenzióját úgy állítottuk be PBS-ben, hogy 5 µl folyadék tartalmazzon  $10^4$  sejtet, majd ebből 3 további lépcsőben tízszeres hígítást készítettünk, így kialakítva a  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ ,  $10^1$  sejt/5 µl koncentrációjú szuszpenziókat. A szuszpenziókból 5 µl-t cseppentettünk egymás mellé a 3.1.5-ös pontban leírtaknak megfelelően elkészített, különböző stresszorokat tartalmazó táptalajokra. A csészéket szárítást követően 30 és 37 °C-on inkubáltuk, majd a törzsek növekedésének kiértékelését 2 nap után végeztük el. A kísérleteket két alkalommal ismételtük.

### 5.2.6. Humán PBMC izolálás és PBMC-DM differenciáltatás

A primer monocita sejtek izolálása egészséges humán donoroktól származó határréteg vérkészítményből (*buffy coat*) történt. A vért PBS-sel hígítottuk 1:2 arányban,

majd 8 ml Ficoll-Paque<sup>TM</sup> PLUS oldatra rétegeztük és centrifugáltuk 20 °C-on, 30 percen át, 900 rpm-mel. A Ficoll felszínén képződő mononukleáris sejtek alkotta réteget donoronként külön-külön összegyűjtöttük és kétszer mostuk jéghideg PBS-sel (1000 rpm, 10 perc, 4 °C), majd RPMI 1640 tápoldatban vettük fel a mononukleáris sejtek pelletét. A sejtek koncentrációját tripánkék festés után Bürker-kamra segítségével határoztuk meg.

A PBMC sejteket 12 mintahelyes tenyésztő lemezekben osztottuk szét úgy, hogy 1 mintahelybe  $2 \times 10^7$  sejt kerüljön. A lemezeket 1,5 órán keresztül 37 °C-on, 5% CO<sub>2</sub> és 100%-os relatív páratartalom mellett inkubáltuk, majd a le nem tapadt sejteket a tápoldattal együtt eltávolítottuk. A letapadt monocitákra 1 ml PBMC-DM differenciáltatáshoz való tápoldatot mértünk és 1 héten keresztül differenciáltattuk miközben a tápoldatot 2 naponta frissre cseréltük.

### **5.2.7. Azol evolvált törzsekkel szembeni fagocitózis hatékonyság vizsgálata**

A FLU<sup>EVO</sup>, VOR<sup>EVO</sup>, POS<sup>EVO</sup> törzsek J774.2 makrofágok általi fagocitózisához a gombasejteket PBS-sel történő mosás után 200 µl PBS-ben vettük fel, 22 µl 1 M-os Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-tal puffereltük és 4 µl AlexaFluor 488 fluoreszcens festékkel festettük 45 percen keresztül fénytől elzártan. A J774.2 sejteket  $2 \times 10^6$  mennyiségben helyeztük 12 mintahelyes lemez minden egyes mintahelyére. A jelölt gombasejteket ötszörös mennyiségben adtuk a fagocitákhoz ( $10^7$ ) és 2 órán keresztül 37 °C-on, 100%-os páratartalom és 5%-os CO<sub>2</sub> tenzió mellett inkubáltuk. A ko-inkubációt követően a tápoldatot eltávolítottuk és a nem fagocitált gombákat PBS-sel mostuk le. A J774.2 sejteket erőteljes pipettázással gyűjtöttük össze és centrifugáltuk, majd 100 µl PBS-ben vettük fel. A minták mérését *FlowSight Imaging Flow Cytometer* (Amnis) készülékkel végeztük, a kiértékeléshez pedig a hozzá tartozó IDEAS 6.2 szoftvert használtuk. A fagocitáló sejtek meghatározása a gombával nem fertőzött J774.2 sejtek kizáró kapuzásával történt. A kísérletet egy alkalommal hajtottuk végre, három biológiai párhuzamos használatával.

### **5.2.8. Gomba eliminációs hatékonyság vizsgálat a *C. parapsilosis cdr1-2 KO* törzssel szemben**

A gomba eliminációs kísérlet során  $10^5$  számú J774.2 sejtet fertőztünk  $5 \times 10^5$  számú gombasejttel 96 mintahelyes lemezen 10% FBS-t tartalmazó DMEM tápoldatban. Kontrollként az adott gombatorzs sejtjeit a fentiekkel megegyező mennyiségben oltottuk le a tápoldatba fagocita sejtek jelenléte nélkül. A fertőzést követően (37 °C, 100%-os páratartalom és 5%-os CO<sub>2</sub> tenzió) 3 vagy 12 óra múlva a tápoldatot a gombasejtekkel együtt

összegyűjtöttük 1,5 ml-es mikrocentrifuga csövekbe. A letapadt fagocitákat 2 alkalommal kezeltük steril AccuGene desztillált vízzel 5 percen keresztül és az így feltárt szuszpenziót a megfelelő centrifuga csőbe gyűjtöttük. Így a fagocitált, de nem eliminált gombasejteket is kinyertük. Ezt követően a szuszpenziókat YPD-agar csészékre szélesztettük és 2 napig 30 °C-on inkubáltuk majd meghatároztuk az élő csíraszámot (CFU). A gomba elimináció hatékonyságát a következő képlet alapján számoltuk ki:

$$\text{Elimin. hatásf. (\%)} = \frac{(\text{CFU}_{\text{kontroll}} - \text{CFU}_{\text{ko-kultúra}})}{\text{CFU}_{\text{kontroll}}} \times 100$$

A kísérletet hét alkalommal ismételtük meg.

### 5.2.9. *Galleria mellonella*, nagy viaszmolylárva fertőzése

Fertőzés előtt a *Galleria mellonella* lárvák hasi oldalát etanollal sterilizáltuk, ezt követően az utolsó lábkezdemenyen keresztül fertőztük 10 µl PBS-ben szuszpendált  $5 \times 10^7$  gombasejttel 26G-s, kúposított hegyű tűvel ellátott Hamilton fecskendő segítségével. *C. parapsilosis* törzsenként 20 lárvát használtunk, valamint 15-15 PBS-sel injektált és kezeletlen kontrollt is alkalmaztunk. A fertőzést követően a lárvákat 30 °C-on tartottuk és a túlélést napi rendszerességgel ellenőriztük. A kísérleteket az echinokandin evolált törzsek esetén két alkalommal, a triazol evolált törzsek esetén egyelőre előkísérletként egy alkalommal hajtottuk végre.

### 5.2.10. *In vivo* egér fertőzési modell

Az egérszervek gomba-kolonizáltságának megállapítására 8-12 hetes BALB/c (evolált törzsek) vagy 6-8 hetes A/J (*C. parapsilosis* CDR1-2 KO) egereket fertőztünk  $2 \times 10^7$  gombasejttel 100 µl PBS-ben (BALB/c:  $N \geq 11$ , A/J:  $N = 5$ ). Három nappal a fertőzést követően az állatokat CO<sub>2</sub>-vel túlaltattuk, majd az agyat, májat, lépét és a veséket eltávolítottuk és lemértük a tömegüket. Ezt követően pedig Ultra-Turrax T25 homogenizátor segítségével homogenizáltuk és hígítottuk a megfelelő mértékben, majd 1% penicillin-sztreptomocinnal kiegészített YPD táptalajra szélesztettük. Az élő csíraszámot 2 nap (30 °C) elteltével határoztuk meg. A kísérleteket háromszor hajtottuk végre minden alkalommal fertőzési csoportonként egér fertőzésével.

### 5.2.11. Etikai engedély

Az állatkísérleteket a Magyar Nemzeti (1998. XXVIII; 40/2013), valamint az Európai Unió (2010/63/EU) által előírt etikai irányelveknek megfelelően hajtottuk végre. A protokollokat az MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont Állatkísérleti és Etikai Bizottsága, valamint a Magyar Nemzeti Állatkísérleti és Etikai Bizottsága hagyta jóvá (engedélyezési szám: XVI./03521/2011.) a Szegedi Tudományegyetem további engedélyével: XII./00455/2011 és XVI./3652/2016.

### 5.2.12. Ergoszterol és köztitermékeinek meghatározása LC-MS használatával

Az egy éjszakán keresztül YPD tápoldatban 30 °C-on tenyésztett gomba mintákat négyszer mostuk MilliQ bidesztillált vízzel, a mintákat ezt követően folyékony N<sub>2</sub>-ben fagyasztottuk és liofilizáltuk egy éjszakán keresztül. A kiszáritott gomba minták 10 mg-ját 2 ml metanolban oldott 10% KOH-dal szappanosítottuk el 80 °C-on 90 percen keresztül. Az elszappanosított és lehűtött mintákhoz 500 µl desztillált vizet és 1 ml n-hexánt mértünk és a keveréket 30 másodpercig erőteljesen ráztattuk. A fázisok szeparálásának érdekében az elegyet 5 percig 5000 rpm-mel centrifugáltuk, majd a felső, szterolokat tartalmazó n-hexán fázist 2 ml-es sötét színű üvegfialába gyűjtöttük és áramló N<sub>2</sub> alatt beszárítottuk. Az n-hexánnal az extrakciót egyszer ismételtük. Végül a beszárított extraktumot 500 µl metanolban feloldottuk, amelyből 5 µl-t injektáltunk a LC-MS (folyadék kromatográfia-tömeg spektrometria, *liquid chromatography-mass spectrometry*) rendszerbe.

A minták analízise DionexUltimate 3000 UHPLC rendszerrel kapcsolt Q Exactive Plus hybrid quadrupole-Orbitrap tömegspektrométerrel történt APCI ionforrás alkalmazásával, pozitív ion módban. A komponensek elválasztása Gemini NX C18 oszlopon (150 x 2, 3µm) izokratikus elúcióval (metanol/víz, 95/5, V/V %) valósult meg 25 °C hőmérsékleten, 0,3 ml/min áramlási sebesség mellett. A tömegspektrometriás mérések „full scan” üzemmódban történtek az *m/z* 50-550 tartományban. A méréseket Dr. Varga Mónika az SZTE TTIK Mikrobiológiai Tanszék munkatársa végezte.

### 5.2.13. Sejtfal összetétel vizsgálata

A gombasejtek feltárása fastprep homogenizátorral történt. A sejttörmelékét 4 °C-on történő 20000 x g-s, 5 percig tartó centrifugálással távolítottuk el, a sejtfalat 6 ismétlésben, MilliQ vízzel és a fentieknek megfelelő centrifugálással mostuk. Ezt követően a sejtfal preparátumokat egymás után inkubáltuk forró SDS-ben, β-merkaptotanolban és NaCl-ban, majd hidrolizáltuk forró 2 M-os trifluoro-ecetsav jelenlétében egy korábbi

tanulmányban leírtaknak megfelelően (Mora-Montes, és mtsi. 2007). A savas hidrolízis után a minták analízise pulzáló amperometriás detektálással egybekötött magas teljesítményű anioncserélő kromatográfiával történt (High performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection, HPAEC-PAD) Dionex rendszerben (Thermo Fisher Scientific) egy korábban leírt eljárásnak megfelelően (Estrada-Mata, és mtsi. 2015). A sejtfal összetételének vizsgálatát Dr. Hector Mora Mones és Nancy E. Lozoya-Pérez végezték el a mexikói Guanajuato Egyetemén.

#### **5.2.14. Felszíni kitin és $\beta$ -1,3-glükán fél-quantitatív meghatározása fluoreszcens festéssel**

A kitin jelöléséhez a gombasejteket PBS-ben oldott 1 mg/ml WGA-FITC-ben (Sigma) (Wheat Germ Agglutinin-Fluorescent Isothiocyanate) inkubáltuk 1 órán keresztül szobahőmérsékleten a korábban leírtaknak megfelelően (Mora-Montes, és mtsi. 2011). A  $\beta$ -1,3-glükán festéséhez a gombasejteket 5  $\mu$ g/ml IgG Fc-Dectin-1 (Immunoglobulin G molekula kristályosodási fragmentuma) kiméra fehérjével (Graham, és mtsi. 2006) inkubáltuk 40 percig szobahőmérsékleten, majd a  $\beta$ -1,3-glükán és IgG Fc-Dectin-1 kapcsolódását 1  $\mu$ g/ml Anti-Fc IgG-FITC-cel (Sigma-Aldrich) detektáltuk 40 perc szobahőmérsékleten történő inkubációt követően (Marakalala, és mtsi. 2013). A festés minden lépése közvetlen fénytől elzárta, lehetőség szerint sötétben történt. A festett élesztősejtekről a fluoreszcens felvételek Zeiss Axioscope 40 mikroszkóppal és AxioCam Mrc kamerával készültek. Az elkészült képeken 300-300 darab élesztősejtet értékeltünk ki Adobe Photoshop™ CS6 szoftverrel a következő képlet segítségével: [(összes zöld pixel - háttér pixelek) x 100] /összes pixel.

#### **5.2.15. Teljes genom szekvenálás analízise**

A „*Pair-end fastq read*” fájlok trimmelésre kerültek a Trimmomatic v0.36 használatával (Bolger, és mtsi. 2014). Az alkalmazott paraméterek a következők voltak: eltávolítottuk a vezető és végi nukleotidokat, melyek minőségi értéke 10 alatti volt (“LEADING” és “TRAILING” paraméterek sorrendjében); négy nukleotidos *sliding* ablakot használtunk és levágtuk azokat, melyeknek a nukleotidokénti átlagos minőség értéke az adott ablakban 15 alatti volt (“SLIDINGWINDOW” paraméter); azokat a readeket is kizártuk, melyek hossza a fentebb leírt trimmelést követően kevesebb, mint 40 nukleotid volt (“MINLEN” paraméter). Majd a trimmelt readeket a referencia genomra térképeztük a „*bwa-mem*” eszköz segítségével, amely a 0.7.12-r1039 verziójú BWA-ról származott (Li

2013). A térképezéshez használt referencia genom a CDC317 számú törzs fasta fájlja volt, melyet 2018 áprilisában szereztünk be a „*Candida Genome Database*”-ről (Skrzypek, és mtsi. 2018). A térképezés kimenetéből BAM fájlokat generáltunk a SortSam és MarkDuplicates parancsokkal 2.15.0 verziójú Picard-ban (<http://broadinstitute.github.io/picard/>). Végül lehívtuk a variánsokat ezekből a readokból a 1.1.0-9-g09d4ecf verziójú Freebayes használatával (Garrison és Marth 2012), hogy együttesen genotipizáljuk az érintett törzsek genomját. A vcflib-ből ismert vcffilter (Garrison, <https://github.com/vcflib/vcflib>) eszközzel szűrtük a pontmutációkat (Single Nucleotide Polimorfism – SNP). Kizártuk azokat az SNP-eket, melyeknek az átlagos térképezési minősége (MQM) 30 alatti, a QUAL értéke 20 alatti (ami, a 0,01-nél nagyobb valószínűségű hibás variáns megnevezéseket jelzi) és/vagy a leolvasási mélység (read depth – DP) 30 alatti volt. A szekvenálást Dr. Bodai László az SZTE TTIK Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék munkatársa, a szekvenálás analízisét pedig Dr. Toni Gabaldon, Jesse R. Willis és Ewa Ksiezopolska a Centre for Genomic Regulation, The Barcelona Institute of Science and Technology munkatársai végezték el.

#### **5.2.16. Bioinformatikai eljárások**

A transzmembrán hélix topológiák prediktálása TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) és PRO-TMHMM szerverek (<http://topcons.cbr.su.se/>) segítségével történt (Krogh, és mtsi. 2001; Tsirigos, és mtsi. 2015). A fehérje szekvenciák illesztéséhez az NCBI Protein BLAST online bioinformatikai eszközt használtuk (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

#### **5.2.17. Statisztikai analízis**

A kísérletek statisztikai analízise a GraphPad Prism v 6.0 szoftverrel, parametrikus t-teszt, nem-parametrikus Mann-Whitney teszt vagy Log-rank (Mantel-Cox) teszt használatával történt. Statisztikailag szignifikáns eltérést abban az esetben állapítottunk meg, ha  $p < 0,05$  volt.

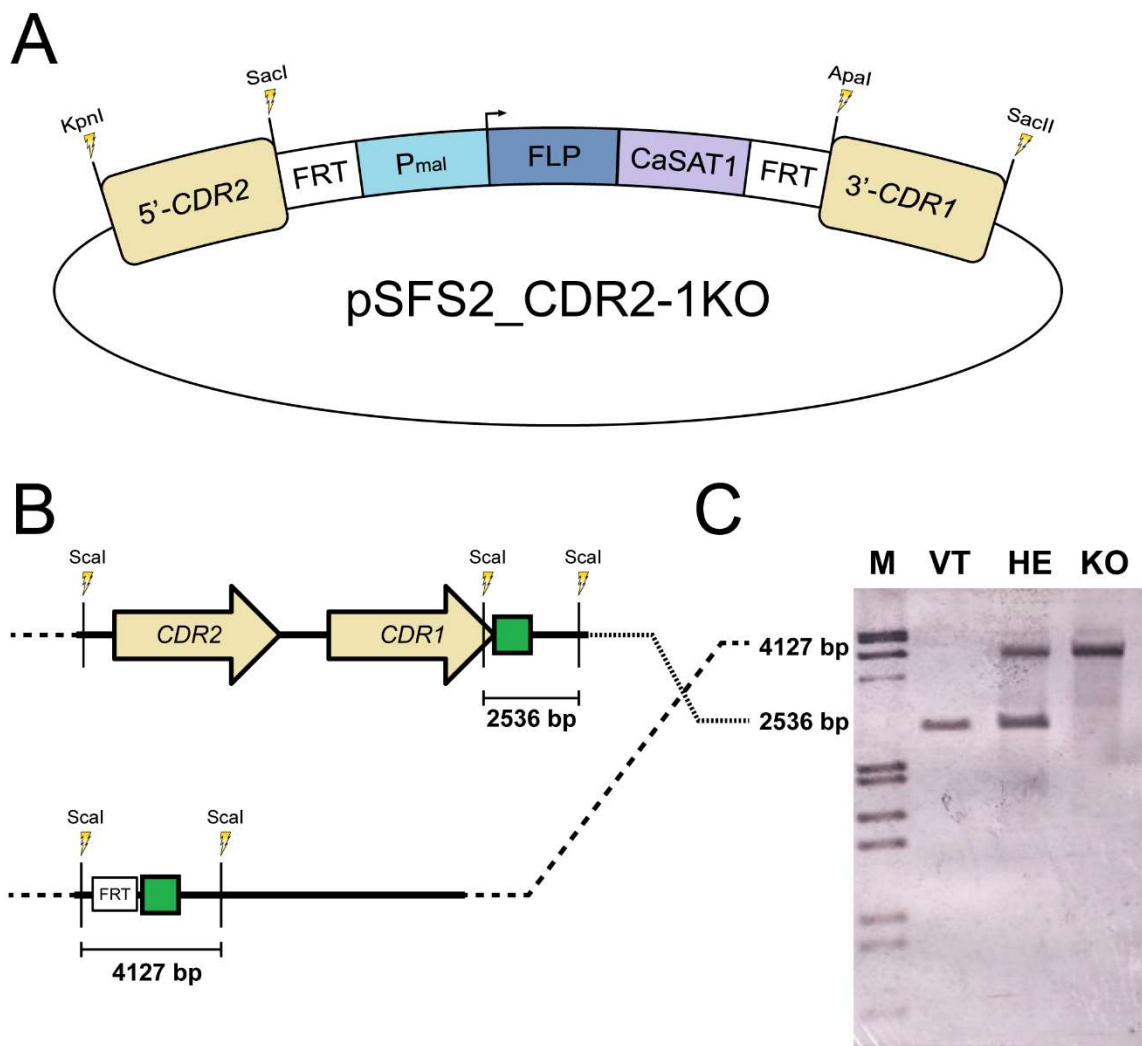


## 6. Eredmények

### 6.1. *C. parapsilosis cdr1-2* deléciós duplamutáns jellemzése

#### 6.1.1. *C. parapsilosis cdr1-2* KO mutáns létrehozása

A rezisztenciában feltételezhetően szerepet játszó ABC-transzporterek jelentőségének vizsgálatára létrehoztunk egy *C. parapsilosis* CDR1-2 deléciós duplamutáns törzset. Mivel a CDR1 és a CDR2 gének a *C. parapsilosis* genomjában egymás mellett helyezkednek el, kiütésüket egyidejűleg végeztük el célzott deléció létrehozásával, amelyhez az FRT-FLP rendszert használtuk (Gacser, és mtsi. 2007). A *C. parapsilosis* GA1 törzsének genomi DNS-éből amplifikáltuk a CDR2 géntől 5' irányban elhelyezkedő, valamint a CDR1 géntől 3' irányban elhelyezkedő 500 bp hosszúságú szakaszokat. Az így nyert homológ régiókat az FLP-FRT kazettát tartalmazó pSFS2 plazmidba (Gacser, és mtsi. 2007) klónoztuk: az 5'-CDR2 szakaszt a plazmid *KpnI* és *SacI* restriktív emésztési helyei közé, a 3'-CDR1 szakaszt pedig az *ApaI* és *SacII* emésztési helyei közé, így létrehozva a pSFS2\_CDR2-1KO plazmidot (6. ábra, A). A pSFS2\_CDR2-1KO plazmidot linearizáltuk *KpnI*-*SacII* emésztéssel, majd az így kapott deléciós konstrukciót *C. parapsilosis* GA1 törzsébe transzformáltuk. A deléciós kazetta az 5'-CDR2 és 3'-CDR1 homológ régióknak köszönhetően rekombináldott a genomba, eliminálva ezzel a CDR2 és CDR1 géneket. A transzformálást követően domináns szelekciós markerrel a nourseothricin rezisztenciát okozó CaSAT1 genomi jelenlétére szelektáltunk. A deléciós kazettát tartalmazó sejteket maltóz tartalmú tápoldatban rázatva, az FLP (flippáz enzim) transzkripciójának aktiválásával a deléciós kazettát elimináltuk az FRT szakaszok egymással történő rekombinálásával (6. ábra, B). Mivel a *C. parapsilosis* diploid organizmus az előzőekben létrehozott heterozigóta mutánsok újra végrehajtottuk a deléciós eljárást a transzformálástól kezdve, így létrehozva a *C. parapsilosis cdr1-2* deléciós duplamutánst. Mind a heterozigóta, mind a homozigóta deléciós mutánsokat Southern hibridizációs eljárással ellenőriztük. Ennek érdekében a vad típusú (VT), heterozigóta (HE) és homozigóta (KO) mutánsokból genomi DNS-t izoláltunk, amelyet *ScaI* enzimmel emésztettünk, majd agaróz gélen elválasztottuk és nitrocellulóz filterre blottoltuk. A specifikus méretű DNS szakaszokat a 3'-CDR1 DNS-próbával mutattuk ki. A vad típusú allél *ScaI* emésztés utáni méretét 2536 bp, míg a deléciós allél méretét 4127 bp nagyságúnak számítottuk, amely méreteket meg is kaptuk a detektálást követően (6. ábra, B, C).



**6. ábra:** (A) A *C. parapsilosis cdr1-2* deléziós mutáns létrehozásához használt plazmid. P<sub>mal</sub>: maltóz promóter, FLP: flippáz, helyspecifikus rekombináza, FRT: az FLP felismerő helye, CaSAT1: nourseothricin rezisztenciát okozó heterológ gén. (B) A *CDR2-1* régió a vad típusú sejtekben (felül), valamint a *CDR2-1* és a deléziós kazetta eliminálását követően (alul). Zöld négyzet: hibridizációs próba. *ScalI* emésztést követően a próba vad típusú allél esetén 2538 bp, míg deléziós allél esetén 4127 bp nagyságú szakaszt mutat ki. (C) A vad típusú (VT), heterozigóta (HE) és homozigóta deléziós (KO) törzsek Southern hibridizációs képe. M: DNS létra (*DNA Molecular Weight Marker VII, DIG-labeled, Roche*).

### 6.1.2. *C. parapsilosis cdr1-2* KO mutáns törzs antifungális szerekkel szembeni érzékenysége

A létrehozott *C. parapsilosis CDR1-2* heterozigóta és *C. parapsilosis cdr1-2* homozigóta mutánsok érzékenységét antifungális szerekkel szemben (amphotericin B, flukonazol, caspofungin) az M27-A3 protokollnak megfelelően. Összehasonlítottuk a szülői

*C. parapsilosis* GA1 szülői törzs érzékenységevel 24 és 48 óra inkubációt követően. Az összes törzs érzékenynek bizonyult amB-re és flukonazolra, viszont caspofunginnal szemben a szülői és a heterozigóta mutáns törzs a nem érzékeny kategóriába esett, míg mind a két *CDR1-2* allél elvesztése a *C. parapsilosis cdr1-2* KO törzsben megnövelte a caspofunginnal szembeni érzékenységet. A flukonazol MIC értékében szintén csökkenést figyeltünk meg a *C. parapsilosis cdr1-2* törzs esetében a flukonazzal szembeni érzékenység növekedésének köszönhetően (3. táblázat).

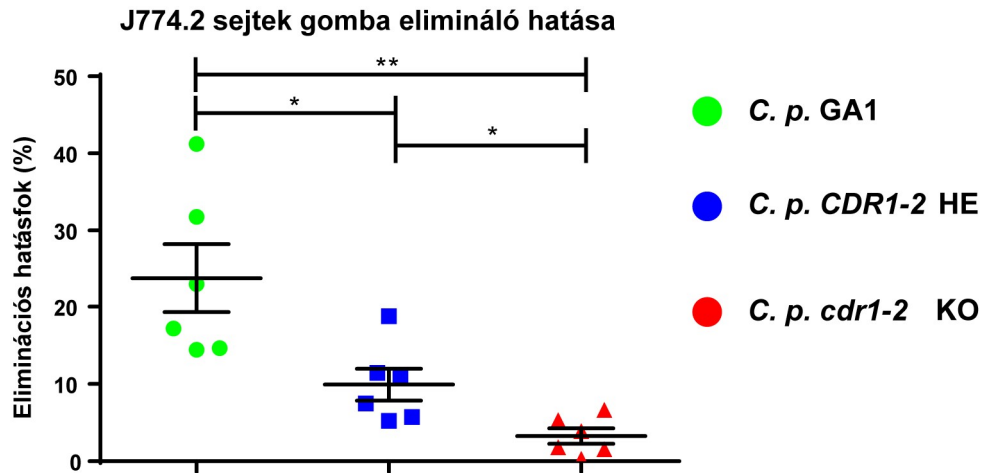
**3. táblázat: *C. parapsilosis cdr1-2* deléciós mutánsok és a szülői törzs antifungális szerekkel szembeni érzékenysége**

Törzsek	MIC (µg/ml)					
	Amfotericin B		Flukonazol		Caspofungin	
	24 óra	48 óra	24 óra	48 óra	24 óra	48 óra
<i>C. p.</i> GA1	0,25 (S)	0,25 (S)	0,5 (S)	0,5 (S)	4 (NS)	4 (NS)
<i>C. p.</i> <i>CDR1-2</i> HE	0,25 (S)	0,25 (S)	0,5 (S)	0,5 (S)	4 (NS)	4 (NS)
<i>C. p.</i> <i>cdr1-2</i> KO	0,25 (S)	0,25 (S)	0,25 (S)	0,25 (S)	2 (S)	2 (S)

(NS: nem érzékeny, S: érzékeny, Zöld háttér: nem változott / enyhén csökkent MIC, Sárga háttér: enyhén emelkedett MIC, Piros háttér: rezisztencia)

### 6.1.3. Gazdasejtek gomba eliminációs hatékonysága a *C. parapsilosis cdr1-2* KO mutánsval szemben

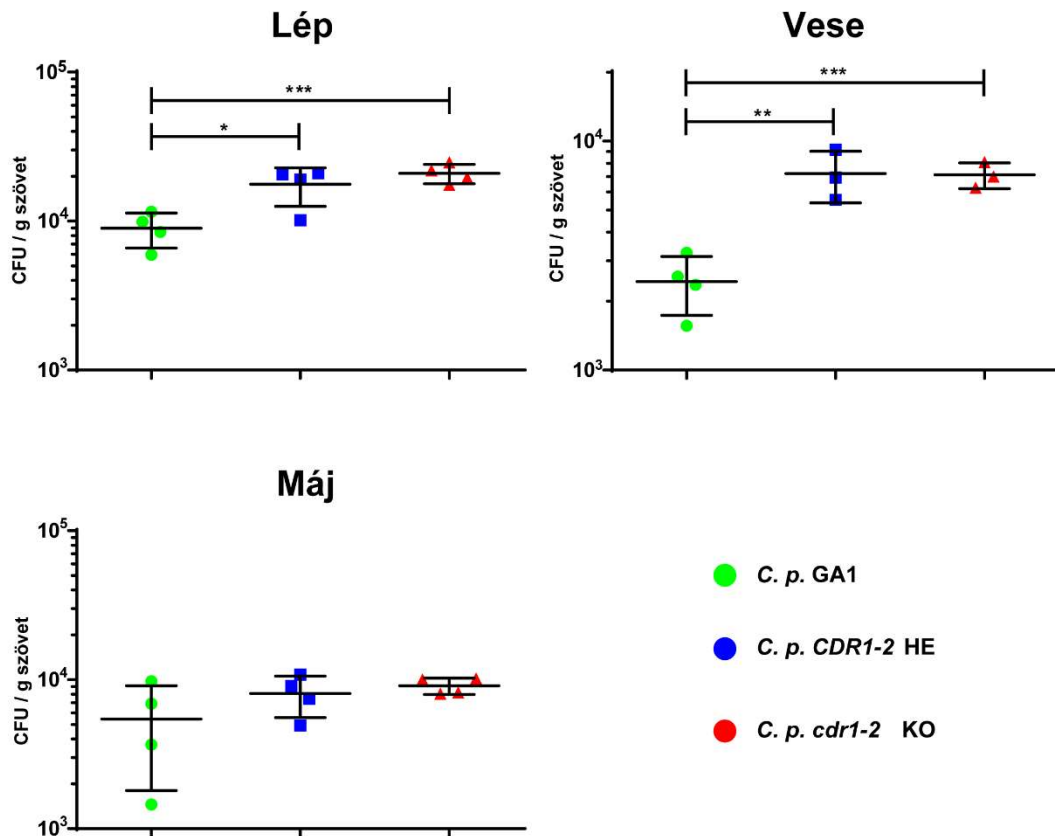
Megvizsgáltuk a J774.2 makrofágszerű sejtvonal sejtjeinek gombasejt elimináló képességét a szülői (*C. p.* GA1), heterozigóta mutáns (*C. p.* *CDR1-2* HE) és homozigóta mutánsokkal (*C. p.* *cdr1-2* KO) szemben, hogy detektálni tudjuk a mutánsok fagocita sejtekkel szembeni ellenállását fertőzés során. A makrofágok a vad típusú törzs (*C. p.* GA1) sejtjeinek 22,93%-át, a heterozigóta mutáns törzs (*C. p.* *CDR1-2* HE) sejtjeinek 9,92%-át, míg a homozigóta deléciós mutáns (*C. p.* *cdr1-2* KO) sejtjeinek mindössze 3,89%-át voltak képesek eliminálni (7. ábra). Mind a vad típusú és homozigóta mutáns elleni, valamint a heterozigóta és homozigóta mutáns elleni gombaölő hatékonyság közti szignifikáns különbség arra utal, hogy a *CDR1* és *CDR2* gének elvesztése miatt a homozigóta mutáns törzs sejtjei hatékonyabban képesek túlélni a J774.2 makrofágok általi fagocitózist követő fago-lizoszómán belüli ölési mechanizmusokat. Az eredmények alapján az is megállapítható, hogy ez a tulajdonság függ az ép *CDR1-2* allélok számától.



**7. ábra:** A J774.2 makrofágszerű egér sejtek gombaölő hatékonysága a *C. parapsilosis* vad típusú (*C. p. GA1*), *CDR1-2* heterozigóta (*C. p. CDR1-2 HE*) és *cdr1-2* homozigóta mutánsok (*C. p. cdr1-2 KO*) sejtjeivel szemben. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,005$

#### 6.1.4. *C. parapsilosis cdr1-2 KO* mutáns virulencia vizsgálata *in vivo* egér modellben

Annak érdekében, hogy megbizonyosodjunk a *C. parapsilosis cdr1-2 KO* mutáns hatékonyabb túléléséről a gazda szervezetében, A/J egereket fertőztünk intravénásan (IV) a vad típusú szülői (*C. p. GA1*), heterozigóta (*C. p. CDR1-2 HE*) és homozigóta (*C. p. cdr1-2 KO*) törzsek sejtjeivel, majd 3 nap múlva meghatároztuk az élőcsíraszámot az egerek lépében, veséiben és májában. Eredményeink alapján az egerek lépében és veséiben nagyobb számban éltek túl mind a heterozigóta, mind a homozigóta deléciós mutánsok, mint a szülői törzs sejtjei. A májban ellenben nem volt szignifikáns különbség a három törzs élőcsíraszámában (**8. ábra**). Míg az *in vitro* fertőzés során különbség volt a heterozigóta és homozigóta mutáns túlélőképességében, addig *in vivo* fertőzés során a két mutáns élőcsíraszámuk között nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést. Ez arra utalhat, hogy a túlélőképességre *in vivo* körülmények között már egy *CDR1-2* allél elvesztésének is számottevő hatása lehet, mivel a heterozigóta mutáns is nagyobb élőcsíraszámot produkált az egerek lépében és veséiben.



**8. ábra:** A vad típusú szülői (*C. p.* GA1), *CDR1-2* heterozigóta (*C. p.* CDR1-2 HE) és *cdr1-2* homozigóta (*C. p.* cdr1-2 KO) mutáns törzsek élőcsíraszámja az A/J egerek lépében, veséiben és májában a fertőzést követő 3. napon. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,005$ ; \*\*\*  $p \leq 0,0005$

## 6.2. Echinokandin evolvált *C. parapsilosis* törzsek jellemzése

Az echinokandin-rezisztencia mechanizmusok vizsgálatára *C. parapsilosis*-ban létrehoztunk direkt szelektációs eljárással 3 adaptált és ezekből 3 evolvált törzset (antifungális szerenként 1-1 törzset), amelyeket az adott echinokandin (casprofungin, anidulafungin, micafungin) növekvő koncentrációjú jelenlétében tettünk azokra rezisztensé. A folyamatot az 5.2.3. fejezetben (Echinokandin- és azol evolvált törzsek létrehozása) bemutatott **5. ábra** foglalja össze.

### 6.2.1. Echinokandin evolvált *C. parapsilosis* törzsek érzékenysége antifungális szerekkel szemben

A létrehozott echinokandin adaptált és evolvált *C. parapsilosis* törzsek (CAS<sup>ADP</sup>, CAS<sup>EVO</sup>, AND<sup>ADP</sup>, AND<sup>EVO</sup>, MIC<sup>ADP</sup>, MIC<sup>EVO</sup>) antifungális szerekkel szembeni érzékenységét összehasonlítottuk a szülői *C. parapsilosis* CLIB 214 törzs érzékenységével. A MIC értékeket a **4. táblázat** foglalja össze.

**4. táblázat: Az echinokandin adaptált és evolált törzsek, valamint a szülői törzs antifungális szerekkel szembeni érzékenysége.**

		MIC (µg/ml)															
		Flukonazol		Vorikonazol		Posakonazol		Itrakonazol		Caspofungin		Anidulafungin		Micafungin			
Törzsek		24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h		
	<i>C. p.</i> CLIB214	1	1	0,031	0,031	0,031	0,031	0,062	0,25	2	2	1	1	1	1	1	
<i>C. p.</i> CAS <sup>ADP</sup>	2	2	0,031	0,031	0,031	0,125	0,25	0,25	>8	>8	>8	>8	>8	>8	>8		
<i>C. p.</i> CAS <sup>EVO</sup>	1	2	0,031	0,031	0,031	0,125	0,25	0,25	>8	>8	4	4	8	>8	>8		
<i>C. p.</i> AND <sup>ADP</sup>	1	1	0,031	0,031	0,031	0,062	0,125	0,125	>8	>8	>8	>8	>8	>8	>8		
<i>C. p.</i> AND <sup>EVO</sup>	1	1	0,031	0,031	0,031	0,062	0,125	0,125	>8	>8	>8	>8	>8	>8	>8		
<i>C. p.</i> MIC <sup>ADP</sup>	1	1	0,031	0,031	0,031	0,062	0,125	0,125	2	2	4	4	4	>8	>8		
<i>C. p.</i> MIC <sup>EVO</sup>	1	1	0,031	0,031	0,031	0,062	0,125	0,125	2	2	4	4	4	>8	>8		

(Zöld háttér: nem változott / enyhén csökkent MIC, Sárga háttér: enyhén emelkedett MIC, Piros háttér: rezisztencia)

Annak érdekében, hogy igazoljuk az evolvált törzsek esetén a rezisztencia stabilitását, összehasonlítottuk az adaptált és evolvált törzsek érzékenységet. Az echinokandinnal létrehozott adaptált és evolvált törzsek között nem tapasztaltunk jelentős eltérést a MIC értékekben. Mindhárom evolvált törzs rezisztenciát mutatott arra az echinokandinra, amelyet a létrehozása során felhasználtunk. Ezenkívül a caspofungin és anidulafungin evolvált ( $CAS^{EVO}$ ,  $AND^{EVO}$ ) törzsek keresztrezisztenciát mutattak mindhárom vizsgált echinokandinra (caspofungin, anidulafungin, micafungin; MIC >8  $\mu\text{g/ml}$ ). Az előzőekkel ellentétben a  $MIC^{EVO}$  törzs csak micafunginnal szemben mutatott rezisztens fenotípust, míg anidulafungin esetén csak emelkedett MIC értéket tapasztaltunk (4  $\mu\text{g/ml}$ ), caspofungin esetén pedig a MIC érték nem változott a szülői *C. parapsilosis* CLIB 214 törzshöz képest. Megfigyeltük, hogy a caspofungin adaptált és evolvált törzsekkel szemben enyhén megemelkedett flukonazol és itraconazol MIC értéke. Vorikonazollal és posakonazollal szemben egyik létrehozott törzs sem mutatott megváltozott érzékenységet a szülői törzs érzékenységéhez képest.

### 6.2.2. Echinokandin evolvált *C. parapsilosis* abiotikus stressztolerancia vizsgálata

Az olyan mikroorganizmusoknak, amelyek a környezetben is fellelhetők, illetve patogénként is jelen lehetnek az emberi szervezetben, változatos, olykor extrém környezeti körülményekhez kell alkalmazkodniuk. Emiatt megvizsgáltuk az echinokandin evolvált törzsek életképességét különböző típusú stresszt előidéző ágensek jelenlétében. A vizsgált körülmények közül a különböző pH értékű táptalajok és az ozmotikusan aktív anyagok (glicerol, NaCl, szorbitol) nem befolyásolták az echinokandin evolvált törzsek növekedési képességét a szülői *C. parapsilosis* CLIB 214 törzshöz viszonyítva. Az oxidatív stresszorok hatásának vizsgálatakor 0,05 mM  $\text{CdSO}_4$  és 5 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  jelenlétében a  $MIC^{EVO}$  törzs a növekedés hiányát, illetve erős növekedési defektust mutatott 37 °C-on nevelve (9. ábra).

Általánosságban az összes echinokandin evolvált törzs bizonyos fokú érzékenységgel bírt a sejtfal szerkezet összerendeződését zavaró anyagokkal (koffein, CW, CR) szemben. A  $MIC^{EVO}$  törzs erős növekedési defektust mutatott koffein jelenlétében, míg a  $CAS^{EVO}$  és  $AND^{EVO}$  törzsek esetében csak enyhe vagy közepes növekedési defektust figyeltünk meg 37 °C-on történő nevelést követően. A koffein 30 °C-on nem befolyásolta a törzsek növekedését egyik alkalmazott koncentrációban sem a szülői törzshöz viszonyítva. A CW az összes echinokandin evolvált törzsben jelentős növekedési defektust okozott, 75  $\mu\text{g/ml}$ -es koncentráció felett mindhárom törzs esetén a növekedés teljes hiányát okozta, míg 50  $\mu\text{g/ml}$ -es koncentráción a  $CAS^{EVO}$  és  $AND^{EVO}$  törzsekben közepes növekedési defektust

idézett elő, a MIC<sup>EVO</sup> törzsben pedig meggátolta a növekedést. A kalkofluor fehér (CW) hatásában nem tapasztaltunk különbséget a 30 és 37 °C-on történő inkubáció alkalmazásakor. Kongóvörös (CR) hatásának vizsgálatakor 10 µg/ml CR megakadályozta az AND<sup>EVO</sup> és MIC<sup>EVO</sup> törzsek növekedését 37 °C-on, míg 30 °C-on csak a MIC<sup>EVO</sup> törzs növekedését gátolta. A CR 25 µg/ml vagy annál nagyobb koncentrációban alkalmazva 37 °C-on megakadályozta nemcsak az echinokandin evolált törzsek növekedését, hanem a szülői törzsét is (9. ábra, \*). Ezzel szemben 30 °C-on 25 µg/ml vagy annál magasabb koncentrációjú CR a szülői törzshöz viszonyítva a CAS<sup>EVO</sup> és AND<sup>EVO</sup> törzsekben közepes, illetve erős növekedési defektust okozott a koncentráció függvényében, míg a MIC<sup>EVO</sup> törzs egyáltalán nem volt képes növekedni ezen körülmények között (9. ábra).

	Nincs növekedés	Erős defektus	Közepes defektus	Enyhe defektus	Nincs különbség	Jobb növekedés
Viszonyl. növ. kép. a <i>C. p.</i> CLIB 214-hez						
Törzs	CAS <sup>EVO</sup>		AND <sup>EVO</sup>		MIC <sup>EVO</sup>	
Hőmérséklet	30 °C	37 °C	30 °C	37 °C	30 °C	37 °C
Oxidatív stresszorok						
CdSO <sub>4</sub> (0,05 mM)						
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (5 mM)						
Sejtfalszintézist zavaró ágensek						
Koffein (12,5 mM)						
Koffein (15 mM)						
Koffein (17,5 mM)						
Kalkofluor fehér (50 µg/ml)						
Kalkofluor fehér (75 µg/ml)						
Kalkofluor fehér (100 µg/ml)						
Kongóvörös (10 µg/ml)						
Kongóvörös (25 µg/ml)		*		*		*
Kongóvörös (50 µg/ml)		*		*		*
Kongóvörös (75 µg/ml)		*		*		*
Membrán detergentek						
SDS (0,02% m/V)						
SDS (0,04% m/V)						
SDS (0,06% m/V)						

9. ábra: Az echinokandin evolált törzsek (CAS<sup>EVO</sup>, AND<sup>EVO</sup>, MIC<sup>EVO</sup>) növekedési képességének hőterképe különböző stresszorok jelenlétében a szülői *C. parapsilosis* CLIB 214 törzshöz viszonyítva. A „\*” a szülői törzs növekedési hiányát jelzi.

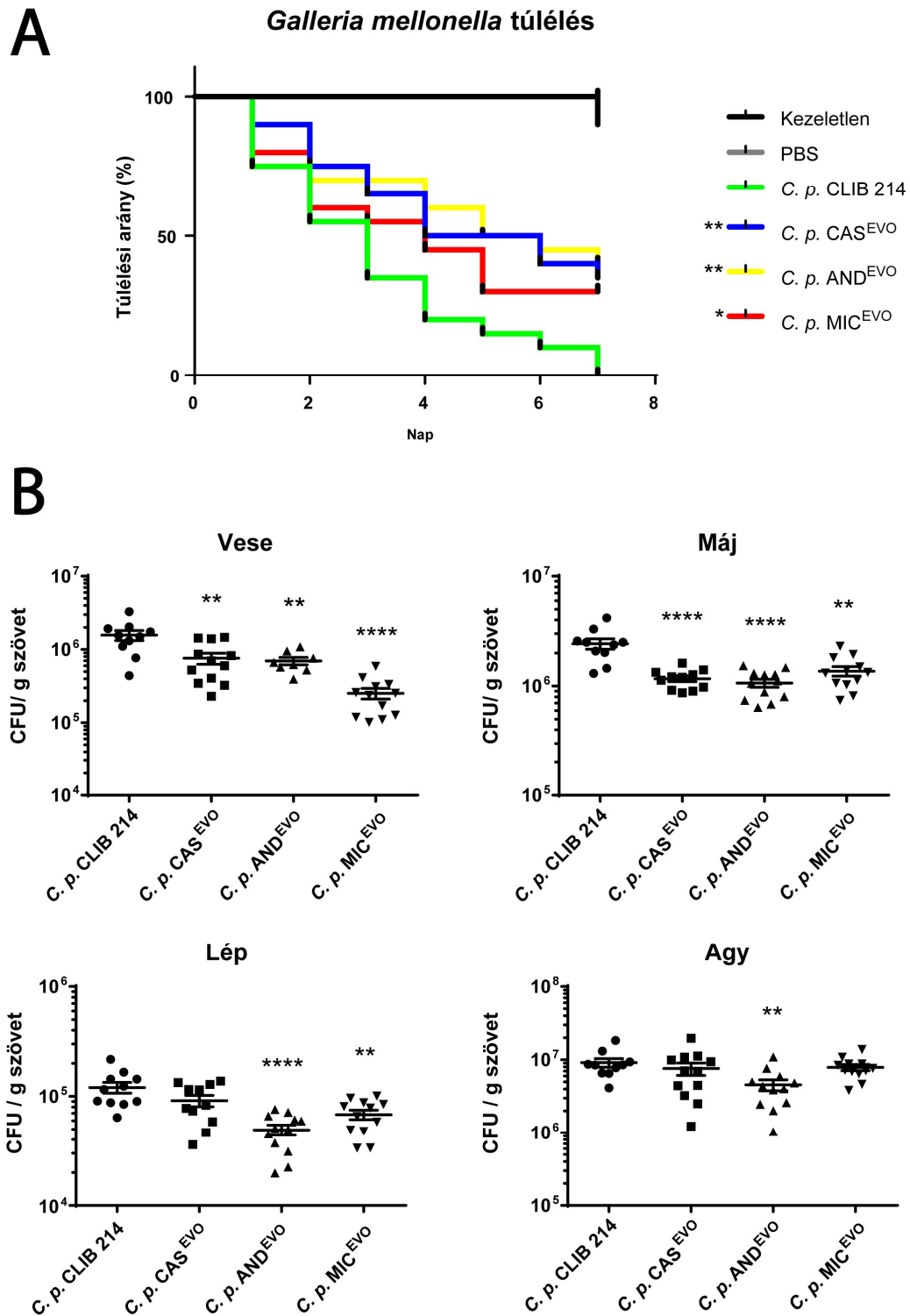
Érdekes módon a membrántkárosító SDS hatására a CAS<sup>EVO</sup> és MIC<sup>EVO</sup> törzsek jobban növekedést mutattak 37 °C-on, mint a szülői törzs. Ez a növekedési különbség 30 °C-on csak a MIC<sup>EVO</sup> törzsre volt jellemző az alkalmazott SDS koncentrációk jelenlétében (9. ábra).



### 6.2.3. *In vivo* virulencia vizsgálat *Galleria mellonella* és egér fertőzési modell segítségével

A sejt különböző életfolyamataira ható, stresszt okozó ágensekre történő szülőitől nagymértékben eltérő növekedési válasz felvetette annak lehetőségét is, hogy a létrehozott evolvált törzsek a szülőitől eltérő virulenciával is rendelkeznek. Ennek kiderítése érdekében *G. mellonella*, nagy viaszpoly lárva modell rendszert alkalmaztunk, amelynek során a lárvákat csoportonként fertőztük meg a különböző echinokandin evolvált törzsekkel és vizsgáltuk a lárvák túlélését. A kezeletlen és PBS-sel kezelt kontroll csoport esetén a lárvák közül egy sem pusztult el a kísérlet befejezéséig. Ellenben a *C. parapsilosis* CLIB 214 szülői törzssel injektált lárvák mindegyike elpusztult a fertőzést követő hetedik napon. Az echinokandin evolvált törzsekkel fertőzött lárvák 40 (CAS<sup>EVO</sup>), 35 (AND<sup>EVO</sup>) és 30%-a (MIC<sup>EVO</sup>) élt túl a fertőzést követő hetedik napon (**10. ábra, A**). A **10. ábra „A”** részén megfigyelhető továbbá, hogy az echinokandin evolvált törzsekkel fertőzött lárvák túlélési görbéi szignifikánsan eltérnek a szülői törzssel fertőzött lárvák túlélési görbéjéhez viszonyítva. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az echinokandin típusú antifungális szerekhez történő alkalmazkodás a rezisztens törzsek csökkent patogenitását okozhatja.

Annak érdekében bizonyítsuk az evolvált törzsek *in vivo* viaszpoly lárvaiban megfigyelt csökkent virulenciáját egy sokkal összetettebb *in vivo* egér fertőzési rendszert dolgoztunk ki. A BALB/c állatokat intravénásan fertőztük a szülői és evolvált törzsekkel, majd az ezt követő harmadik napon az egerek veséiben, májában, lépében és agyában meghatároztuk az élőcsíraszámot. Azoknak az állatoknak a májában és veséiben, amelyeket valamelyik echinokandin evolvált törzssel fertőztünk, az élőcsíraszám jelentősen lecsökkent a *C. parapsilosis* CLIB 214 szülői törzshöz képest. A lépben csak azoknál az állatoknál tapasztaltunk CFU csökkenést, amelyeket az anidulafungin evolvált és micafungin evolvált törzsekkel fertőztünk. Az agyban pedig csak az anidulafungin evolvált törzs élt túl kisebb mértékben, mint a szülői törzse (**10. ábra, B**). Az eredmények alapján az echinokandinok jelenlétében végzett direkt szelekció a létrejött törzsek csökkent virulenciájához vezetett a kialakult rezisztenciával párhuzamosan.

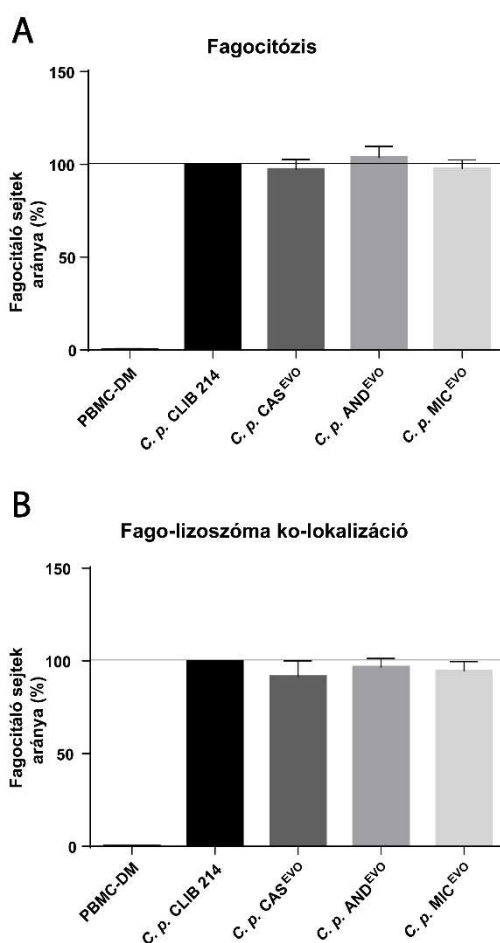


**10. ábra:** A szülői és echinokandin evolált törzsek virulenciája *in vivo* fertőzések során. (A) A szülői és evolált törzsekkel fertőzött *G. mellonella* lárvák túlélésének alakulása 7 napos időintervallumban. (B) A *C. parapsilosis* CLIB 214, CAS<sup>EVO</sup>, AND<sup>EVO</sup> és MIC<sup>EVO</sup> törzsek élőcsíraszámja BALB/c egerek (N=8-12) fertőzését követő harmadik napon az állatok szerveiben. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,005$ ; \*\*\*  $p \leq 0,0005$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$

#### 6.2.4. Echinokandin evolvált törzsekkel szembeni fagocitózis hatékonyság

A gombasejtek csökkent *in vivo* virulenciája és gyengébb túlélési képessége gyakran annak köszönhető, hogy a gazdaszervezetbe került mikroorganizmusokat az immunsejtek (pl. makrofágok) hatékonyabban képesek bekebelezni, majd elpusztítani.

Kísérleteket végeztünk annak vizsgálatára, hogy az emberből származó PBMC-DM sejtek hatékonyabban képesek-e fagocitálni az echinokandin evolvált törzsek valamelyikét a szülői *C. parapsilosis* CLIB 214 törzshöz viszonyítva. Eredményeink azt mutatták, hogy sem a legalább egy gombasejtet fagocitáló sejtek arányában (**11. ábra, A**), sem pedig a fago-lizoszóma ko-lokalizációban (**11. ábra, B**) nem volt kimutatható különbség a szülői és az evolvált törzsek között.

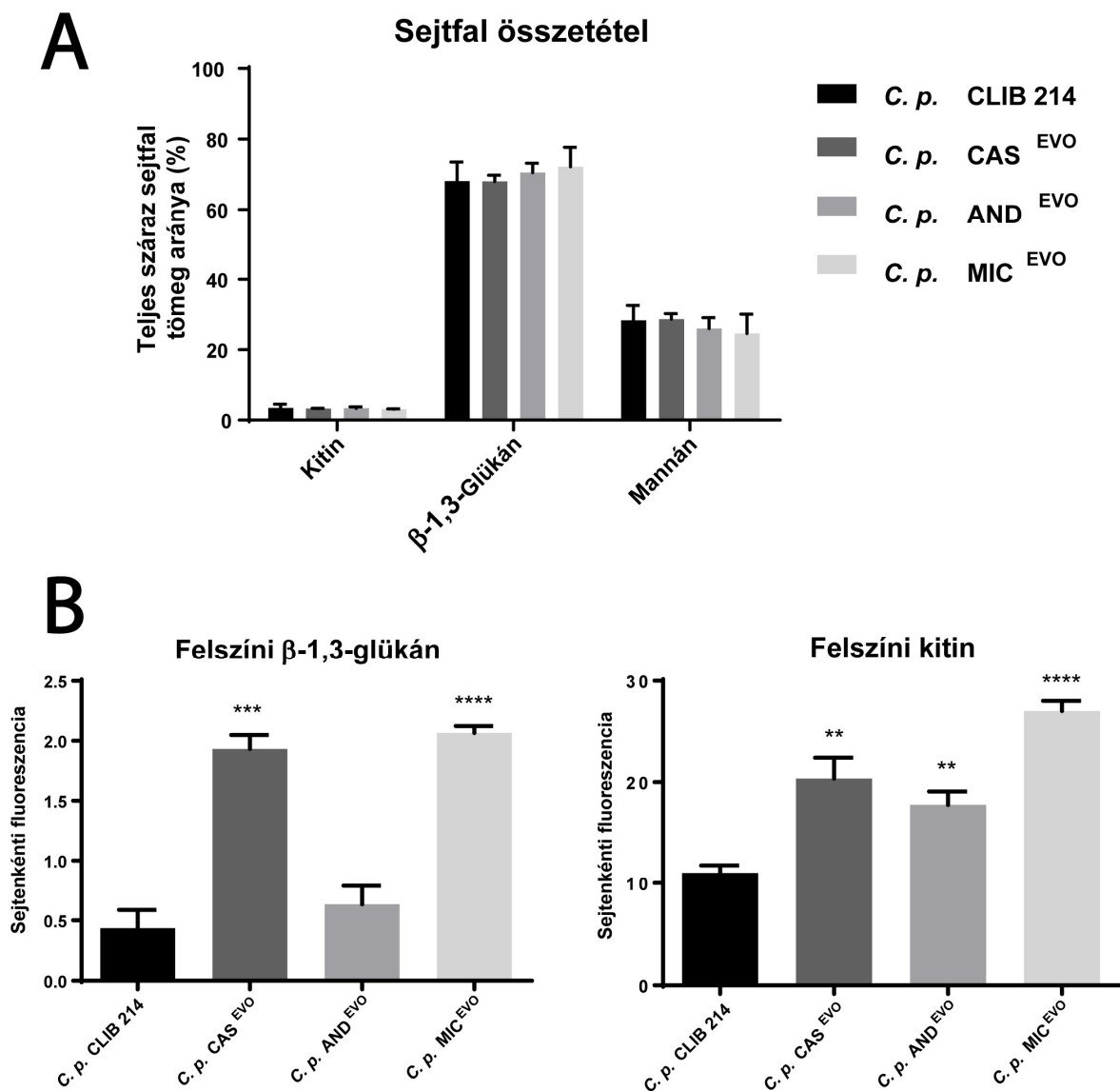


**11. ábra:** Emberi PBMC-DM sejtek általi fagocitózis hatékonyság a *C. parapsilosis* CLIB 214, CAS<sup>EVO</sup>, AND<sup>EVO</sup> és MIC<sup>EVO</sup> törzsekkel szemben. (**A**) A fagocitáló sejtek aránya, az értékek *C. parapsilosis* CLIB 214 sejteket fagocitáló makrofágok arányára normalizálva. (**B**) A fagocitáló makrofágok populációjában a fago-lizoszóma ko-lokalizáció pozitív sejtek részaránya a *C. parapsilosis* CLIB 214 törzsszel fertőzött PBMC-DM-ek arányára normalizálva.

### 6.2.5. Echinokandin evolvált törzsek sejtfa1 összetétele és bels1 sejtfa1 komponensek felszíni megjelenése

Mivel az echinokandinok akadályozzák a sejtfa1  $\beta$ -1,3-glükán szintéziséért felel1s enzim m1ködését, ezért az echinokandin kezelés, valamint a más fajokból ismert echinokandin rezisztencia mechanizmusa jelent1sen befolyásolhatja a sejtfa1 összetételét és szerkezetét. Megvizsgáltuk, hogy az echinokandin evolvált *C. parapsilosis* törzsek sejtfa1ában bekövetkezett-e összetételbeli vagy szerkezeti változás a vad típusú CLIB 214 törzzsel összehasonlítva. El1sz1r meghatároztuk, hogy a legf1bb összetev1k milyen arányban vannak jelen az egyes törzsek sejtjeinek sejtfa1ában. A sejtfa1 összetételben nem találtunk különbséget a különb1z1 sejtfa1 komponensek arányát tekintve a törzsek között: legnagyobb mennyiségben az 1sszes törzs sejtfa1a  $\beta$ -1,3-glükánt (68-72%), ennél kisebb arányban mannánt (24-28%) tartalmazott, legkisebb mennyiségben a kitin volt jelen (3,4-3,1%) (12. ábra, A).

Annak ellenére, hogy a sejtfa1 összetétel nem változott meg számottev1en, a sejtfa1 szerkezetét még befolyásolhatják az Fks1-ben esetlegesen bekövetkező változások. A sejtfa1 szerkezetének megváltozására leginkább annak bels1 rétegeinek (kitin,  $\beta$ -1,3-glükán) a sejt felszínén való megjelenése utal. A felszíni kitin kimutatására és fél-quantitatív meghatározására a WGA-FITC festéket használják, ugyanis ez a lektin típusú fehérje méretéb1l adódóan nem képes kapcsol1dni a sejtfa1 mélyebb rétegeiben lév1 kitinnel, így csak akkor alakul ki kölcs1nhatás, ha a kitin a sejtfa1 felszínén helyezkedik el. A  $\beta$ -1,3-glükán kimutatása is hasonló elven alapul, ám ebben az esetben az egérb1l származó Dectin-1 ( $\beta$ -1,3-glükán receptor) és emberb1l származó immunglobulin G Fc régiójának kiméra fehérjével (Dectin-1-Fc) konjugált Alexa Fluor 647 fluoreszcens festéket használtuk ezen sejtfa1 1sszetev1 felszíni jelenlétének és mennyiségének fél-quantitatív meghatározására. A festést követ1en készített fluoreszcens mikroszkópos felvételeken meghatározható az átlagos gombasejtenkénti pixelintenzitás, ami utal az adott sejtfa1 alkotó mennyiségére.



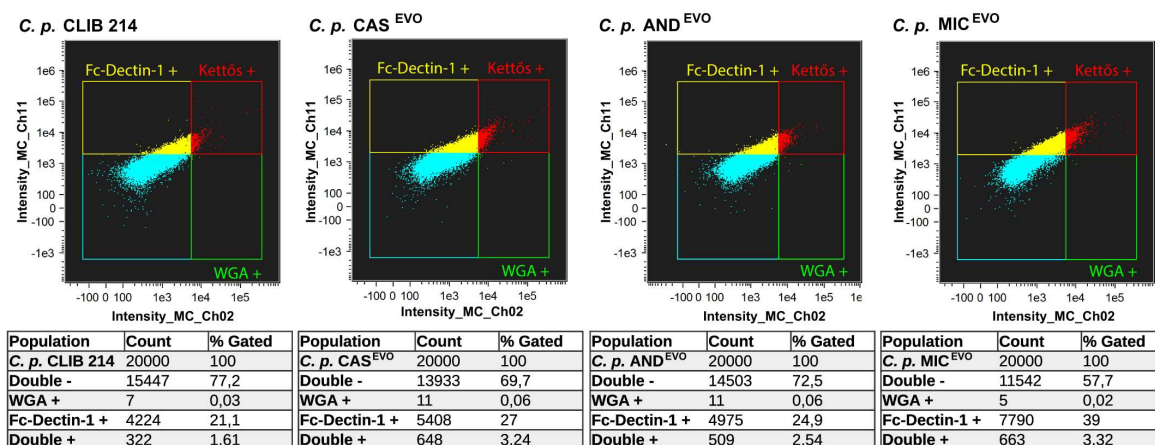
**12. ábra:** A *C. parapsilosis* CLIB 214, CAS<sup>EVO</sup>, AND<sup>EVO</sup> és MIC<sup>EVO</sup> törzsek sejtfal összetétele és szerkezetének változásai. (A) A legfontosabb sejtfal komponensek aránya. (B) A sejtfal belső rétegében található komponensek (kitin, β-1,3-glükán) felszínén való megjelenésének félszámított meghatározása. (C) Az egyes törzsek sejtjeinek populáció vizsgálata: Dectin-1-Fc, WGA és kettős festődést mutató sejtek aránya a teljes sejtpopulációban. \*\*  $p \leq 0,005$ ; \*\*\*  $p \leq 0,0005$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$

Vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy a *C. parapsilosis* CAS<sup>EVO</sup> és MIC<sup>EVO</sup> törzsek sejtjeinek felszínén jelentősen nagyobb mennyiségben jelent meg mind a β-1,3-glükán, mind a kitin a szülői *C. parapsilosis* CLIB 214 törzshöz képest (12. ábra, B). Érdekes módon a *C. parapsilosis* AND<sup>EVO</sup> törzs esetében csak a legbelső sejtfal alkotó rétegre jellemző kitin jelent meg nagyobb mennyiségben a sejtfal felszínén a szülői törzshöz

viszonyítva, szemben a  $\beta$ -1,3-glükánnal ahol szignifikáns eltérést nem tapasztaltunk (12. ábra, B).

A WGA-FITC és Dectin-1-Fc festések együttes használatával a szülői és az echinokandin evolált törzsek belső sejtfal komponenseinek felszínén való megjelenését áramlási citometriás módszerrel populáció szinten vizsgáltuk. Ennek során meghatároztuk, hogy az adott törzs sejtpopulációjának mekkora hányadában jelent meg a kitin (WGA pozitív), a  $\beta$ -1,3-glükán (Dectin-1-Fc pozitív) vagy mindkettő (kettős pozitív) komponens a sejtek felszínén. Általánosságban igaz volt, hogy a sejteknek azon része, amelyek felszínén megjelent a kitin, azok egyaránt Dectin-1-Fc pozitívak is voltak. Összességében a  $\beta$ -1,3-glükánt sejt felszínen expresszáló sejtek (WGA+ és kettős+) aránya magasabb volt az echinokandin evolált törzsekben, mint a *C. parapsilosis* CLIB 214 szülői törzsben (CLIB 214: 22,71%, CAS<sup>EVO</sup>: 30,24%, AND<sup>EVO</sup>: 27,44%, MIC<sup>EVO</sup>: 42,32%) (13. ábra).

### Felszíni $\beta$ -1,3-glükán és kitin expresszáló sejtek aránya



13. ábra: Az egyes törzsek sejtjeinek populáció vizsgálata: Dectin-1-Fc, WGA és kettős festődést mutató sejtek aránya a teljes sejtpopulációban.

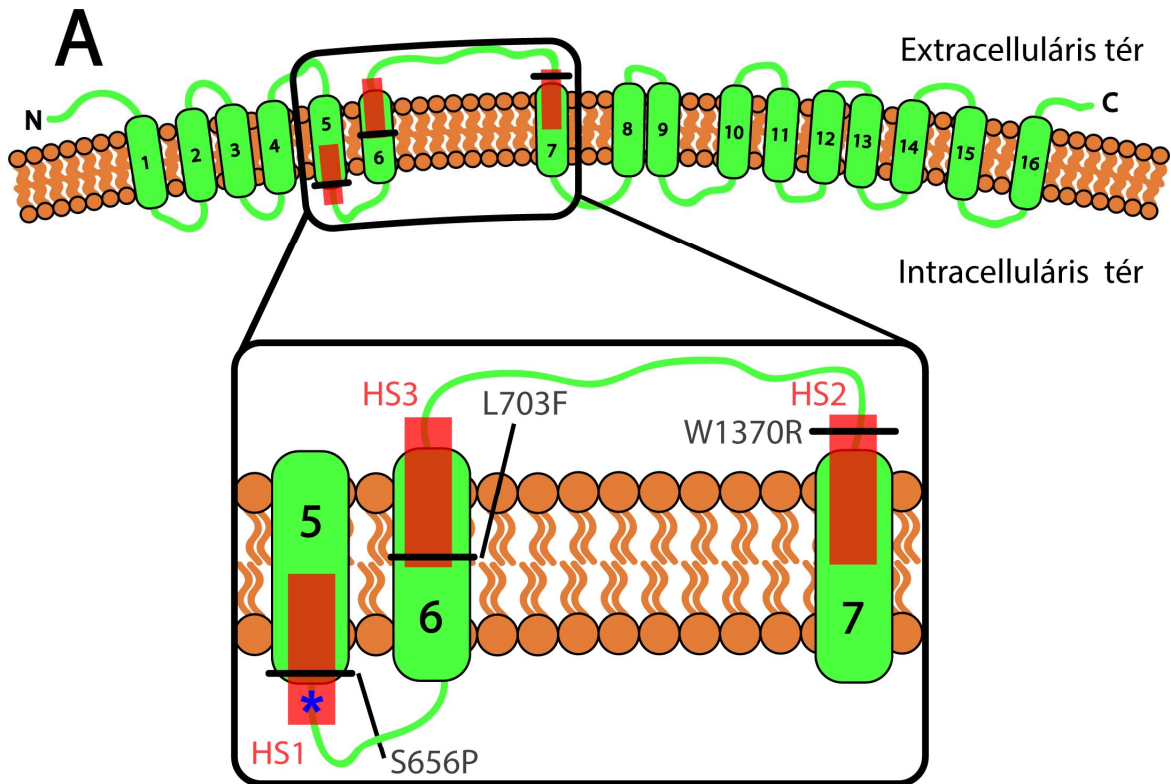
### 6.2.6. Genomszekvenálást követő aminosav változások meghatározása az echinokandin evolált törzsek Fks1 fehérje szekvenciáiban, illetve az Fks1 protein topológiájának előrejelzése

Az echinokandinokkal szembeni rezisztencia mechanizmusok megismerésének érdekében meghatároztuk a szülői és az echinokandin evolált törzsek teljes genomjának szekvenciáját. A kapott nukleotid szekvenciákat aminosav sorrendre fordítva meghatároztuk a rezisztens törzsekben bekövetkezett aminosav változásokat a CLIB 214 törzs fehérje szekvenciáihoz képest.

Az *FKSI* gén szülői és evolvált törzsekből származó szekvenciái alapján a CAS<sup>EVO</sup> és AND<sup>EVO</sup> törzsek HS2 régiójában az 1370. aminosav triptofánról (W) a két evolvált törzsben argininra (R) változott. Ezenkívül az AND<sup>EVO</sup> törzs HS1 régiójában található 656. pozícióban található szerin (S) heterozigóta formában volt jelen, mivel az *FKSI* gén másik allélja ebben a pozícióban prolint (P) kódolt (14. ábra, B, HS1 HS2). Említésre érdemes, hogy ez az S656S/P szubsztitúció viszonylag közel helyezkedik el a *C. parapsilosis* fajcsoportra jellemző polimorfikus Ala660 aminosavhoz, aminek jelentős hatása lehet a rezisztenciára (14. ábra, A:\*, B:A). A MIC<sup>EVO</sup> törzsben a szülői törzshöz viszonyítva a HS3 régióban található 703. pozíciójú leucin (L) fenilalaninra (F) változott.

Bioinformatikai eszközök segítségével meghatároztuk az Fks1 fehérje előre jelzett topológiáját a plazmamembránban. Ezen kívül a genomi DNS szekvenálását követően meghatároztuk az *FKSI* génben bekövetkezett pontmutációkat. Ezután a fehérjeszekvenciákban meghatároztuk a keletkezett pontmutációk okozta aminosav változásokat és ezeket a szubsztitúciókat a létrehozott topológia modellre térképeztük, valamint elhelyeztük a már jól ismert és újabban leírt mutációs forrópont régiókban (Hot Spot, HS): HS1, HS2 és HS3.

A topológia előrejelzés alapján a *C. parapsilosis* Fks1 proteinje 16 plazmamembránon áthaladó transzmembrán (TM) szegmessel és extracelluláris N- és C-terminális régióval rendelkezik (14. ábra, A). A specifikus aminosav szubsztitúciókat és a mutációs HS régiókat az előre jelzett topológia modellre térképezve azt tapasztaltuk, hogy a HS1 régió az 5., a HS2 régió a 7., a HS3 régió pedig a 6. TM szegmensen helyezkedik el. A CAS<sup>EVO</sup> és AND<sup>EVO</sup> törzsekben megtalálható W1370R szubsztitúció a 6. és 7. TM szegmenseket összekötő, extracellulárisan elhelyezkedő hurkon lokalizálódik. A MIC<sup>EVO</sup> törzsben fellelhető L703F aminosav csere a 6. TM szegmens középső szakaszán található. Az AND<sup>EVO</sup> törzsre jellemző heterozigóta formában megtalálható S656P aminosav változás - amely a *C. parapsilosis*-ra jellemző polimorf Ala660 közelében helyezkedett el - az 5. TM szegmens intracelluláris szakaszára lokalizálódott (14. ábra, A).



**B**

	FKS1		
	HS 1	HS 2	HS 3
<i>C. albicans</i>	E <sub>637</sub> SYFFLTLSLRDPIR	D <sub>1357</sub> WIRRYTLS	L <sub>692</sub> DTYMWYIICN
<i>C. p.</i> CLIB	E <sub>648</sub> SYFFLTLSLRD <b>A</b> IR	D <sub>1369</sub> WIRRYTLS	L <sub>703</sub> DTYLWYIICN
<i>C. p.</i> CAS <sup>EVO</sup>	E <sub>648</sub> SYFFLTLSLRD <b>A</b> IR	D <sub>1369</sub> <b>R</b> IRRYTLS	L <sub>703</sub> DTYLWYIICN
<i>C. p.</i> AND <sup>EVO</sup>	E <sub>648</sub> SYFFLT <b>L</b> LRD <b>A</b> IR	D <sub>1369</sub> <b>R</b> IRRYTLS	L <sub>703</sub> DTYLWYIICN
<i>C. p.</i> MIC <sup>EVO</sup>	E <sub>648</sub> SYFFLTLSLRD <b>A</b> IR	D <sub>1369</sub> WIRRYTLS	<b>E</b> <sub>703</sub> DTYLWYIICN

**14. ábra:** A *C. parapsilosis* Fks1 topológiája a plazmamembránban és az elsődleges szerkezetében megjelenő aminosav változások echinokandin direkt szelekció után. **(A)** *C. parapsilosis* Fks1 protein topológia modellje és az echinokandin evolvált törzsekre jellemző aminosav szubsztitúciók modellen való elhelyezkedése. **(B)** A *C. albicans* CDC 314, *C. parapsilosis* CLIB 214, CAS<sup>EVO</sup>, AND<sup>EVO</sup> és MIC<sup>EVO</sup> Fks1 fehérjék HS régióinak egymásra illesztése aminosav szinten. Kék háttérrel: *C. parapsilosis* fajcsoportra jellemző aminosav használat, Piros háttérrel: az echinokandin evolvált törzseknél kimutatott aminosav csere.

### 6.3. Triazol evolvált *C. parapsilosis* törzsek jellemzése

Mivel az azokkal szemben az ABC-transzporterek túlműködésén kívül is vannak más lehetséges mechanizmusai a rezisztencia kialakulásának, létrehoztunk három triazol



evolvált törzset a három legfontosabb triazol alkalmazásával (flukonazol, vorikonazol, posakonazol). Megvizsgáltuk a törzsek rezisztencia mechanizmusait, valamint a virulenciában bekövetkezett változásokat.

### 6.3.1. Triazol evolvált *C. parapsilosis* törzsek érzékenysége antifungális szerekkel szemben

Meghatároztuk a szülői, triazol adaptált és triazol evolvált törzsek antifungális szerekkel szembeni érzékenységét és annak érdekében, hogy igazoljuk az evolvált törzsek rezisztenciájának stabilitását, összehasonlítottuk az adaptált és a belőlük létrehozott evolvált törzsek esetén kapott MIC értékeket egymással, valamint a szülői *C. parapsilosis* CLIB 214 törzsnél kapott MIC értékekkel. A vizsgálat során a legfontosabb klinikumban használt antifungális szereket alkalmaztuk (amfotericin B, flukonazol, vorikonazol, posakonazol, itrakonazol, caspofungin, anidulafungin, micafungin). Az antifungális érzékenységi kísérletek eredményeit az **5. táblázat** foglalja össze.

A flukonazzal és vorikonazzal létrehozott adaptált és evolvált törzsekben az adaptált és evolvált törzsek között nem volt különbség a MIC értékekben a különböző antifungális szerekkel szemben. Ezzel szemben a posakonazol adaptált törzs (POS<sup>ADP</sup>) növekedése nagy szórást mutatott flukonazol (4 - >256 µg/ml), vorikonazol (4 - >32 µg/ml) és itrakonazol (0,5 - 4 µg/ml) jelenlétében, illetve a POS<sup>ADP</sup> törzs esetén az amfotericin B (0,5 µg/ml), a posakonazol (2 µg/ml) és az echinokandinok (caspofungin: 2 µg/ml, anidulafungin: 2 µg/ml, micafungin: 4 µg/ml) megemelkedett MIC értéket mutattak. A POS<sup>EVO</sup> törzsben a POS<sup>ADP</sup> törzsnél tapasztalható rezisztens fenotípus stabilizálódott (MIC<sub>flukonazol</sub>: >256 µg/ml, MIC<sub>vorikonazol</sub>: >32 µg/ml, MIC<sub>itrakonazol</sub>: >32 µg/ml), mivel a POS<sup>ADP</sup> törzs esetén tapasztalható szórás a MIC értékekben az evolvált törzsben már nem volt tapasztalható. Emellett a POS<sup>EVO</sup> törzs rezisztenciája posakonazolra (>32 µg/ml) és echinokandinokra (MIC<sub>caspofungin</sub>: 4 µg/ml, MIC<sub>anidulafungin</sub>: 4 µg/ml, MIC<sub>micafungin</sub>: 8 µg/ml) jelentősen megemelkedett.

A flukonazol adaptált és evolvált törzsekben jelentősen megemelkedett a flukonazol (128 µg/ml), vorikonazol (2 µg/ml) és itrakonazol (0,25 µg/ml) MIC értéke, valamint kismértékű emelkedés volt tapasztalható az amfotericin B MIC értékében (1 µg/ml) a szülői *C. parapsilosis* CLIB 214 törzshöz képest (MIC<sub>amfotericin B</sub>: 0,25 µg/ml, MIC<sub>flukonazol</sub>: 1 µg/ml, MIC<sub>vorikonazol</sub>: 0,031 µg/ml, MIC<sub>itrakonazol</sub>: 0,063 µg/ml).

5. táblázat: *A. C. parapsilosis* CLIB 214, triazol adaptált és evolált törzsek antifungális szerekkel szembeni érzékenysége.

Törzs	MIC (µg/ml)															
	Amfo. B		Flukon.		Vorikon.		Posakon.		Itrakon.		Caspof.		Anidula.		Micaf.	
	24 óra	48 óra	24 óra	48 óra	24 óra	48 óra	24 óra	48 óra	24 óra	48 óra	24 óra	48 óra	24 óra	48 óra	24 óra	48 óra
<i>C. p. CLIB 214</i>	0,5	0,25	1	1	0,031	0,031	0,031	0,031	0,063	0,063	1	1	1	1	1	2
<i>C. p. FLU<sup>ADP</sup></i>	1	1	128	128	2	2	0,031	0,031	0,125	0,25	1	1	1	1	0,5	2
<i>C. p. FLU<sup>EVO</sup></i>	1	2	128	128	2	2	0,031	0,031	0,25	0,25	1	1	1	1	0,5	2
<i>C. p. VOR<sup>ADP</sup></i>	0,5	0,5	>256	>256	8	8	0,031	0,031	0,25	0,25	0,5	0,5	1	1	0,5	1
<i>C. p. VOR<sup>EVO</sup></i>	1	2	>256	>256	8	8	0,031	0,031	0,25	0,25	1	1	1	1	0,5	1
<i>C. p. POS<sup>ADP</sup></i>	0,5	1	>256	>256	>32-	>32-	1	2	4-	4-	2	2	2	2	4	4
<i>C. p. POS<sup>EVO</sup></i>	1	1	>256	>256	>32	>32	>32	>32	>16	>32	2	4	4	4	4	8

(Zöld háttér: nem változott / enyhén csökkent MIC, Sárga háttér: enyhén emelkedett MIC, Piros háttér: rezisztencia)

A vorikonazol jelenlétében létrejött adaptált és evolváló törzsek esetében nemcsak a szülői törzshöz képest tapasztaltunk jelentősen magasabb MIC értékeket flukonazol (256 µg/ml) és vorikonazol (8 µg/ml) alkalmazásakor, hanem a FLU<sup>ADP</sup> és FLU<sup>EVO</sup> törzseknél is nagyobb rezisztenciával rendelkeztek. A flukonazol és vorikonazol jelenlétében szelektált törzsek a posakonazollal létrehozott törzssel ellentétben a caspofunginnal és micafunginnal szemben enyhén megnövekedett érzékenységet mutattak.

### 6.3.2. Triazol evolváló *C. parapsilosis* abiotikus stressztolerancia vizsgálata

A triazol evolváló törzsek abiotikus stressztoleranciáját összehasonlítottuk a szülői *C. parapsilosis* CLIB 214 törzsével szilárd táptalajon. A vizsgálat során ozmotikusan aktív anyagokat (glicerol, NaCl, szorbitol), sejtfal szintézis gátló anyagokat (koffein, kalkoflor fehér, kongó vörös) és membránkárosító anyagokat (SDS) alkalmaztunk. A törzseket a stresszorok jelenlétében 30 és 37 °C-on inkubáltuk. A kísérletek eredményeit a **15. ábrán** foglaltuk össze.

Glicerol, NaCl és szorbitol jelenlétében a VOR<sup>EVO</sup> és POS<sup>EVO</sup> törzsek 30 és 37 °C-on nevelve egyaránt növekedési defektust mutattak, amely 37 °C-on még kifejezettebb volt. A FLU<sup>EVO</sup> törzs esetén az ozmotikus stresszorok csak 37 °C-on okoztak csökkent növekedési képességet, 30 °C-on nem tapasztaltunk különbséget a *C. parapsilosis* CLIB 214 törzshöz viszonyítva.

A koffein jelenlétében a FLU<sup>EVO</sup> és VOR<sup>EVO</sup> törzsek növekedési képessége jobbnak bizonyult a szülői törzsnél mind 30, mind 37 °C-on, ellenben a POS<sup>EVO</sup> törzs esetében a koffein 30 °C-on erős, 37 °C-on pedig teljes növekedésgátlást okozott. A VOR<sup>EVO</sup> és POS<sup>EVO</sup> törzsek növekedési képessége enyhe és közepes csökkenést mutatott 30 és 37 °C-on 50 µg/ml kalkoflor fehér jelenlétében, azonban 75 µg/ml és ennél magasabb koncentrációjú kalkoflor fehér mindhárom triazol evolváló törzsnél erős növekedésgátlást okozott, amely 100 µg/ml kalkoflor fehér jelenlétében a VOR<sup>EVO</sup> törzs esetében csak 37 °C-on, a POS<sup>EVO</sup> törzs esetében pedig 30 és 37 °C-on is teljes növekedésgátlásban nyilvánult meg. Kongóvörös jelenlétében 37 °C-on egyik törzs sem volt képes növekedni beleértve a szülői *C. parapsilosis* CLIB 214 törzset is (**15. ábra, \***), ezért itt csak a 30 °C-on inkubált törzsek összehasonlítása releváns. A 10 és 25 µg/ml kongóvörös alkalmazása csak a VOR<sup>EVO</sup> és POS<sup>EVO</sup> törzsekben okozott enyhe növekedés csökkenést, 50 és 75 µg/ml-es koncentrációban azonban mindhárom triazol evolváló törzsnél erőteljes növekedési defektust figyeltünk meg.

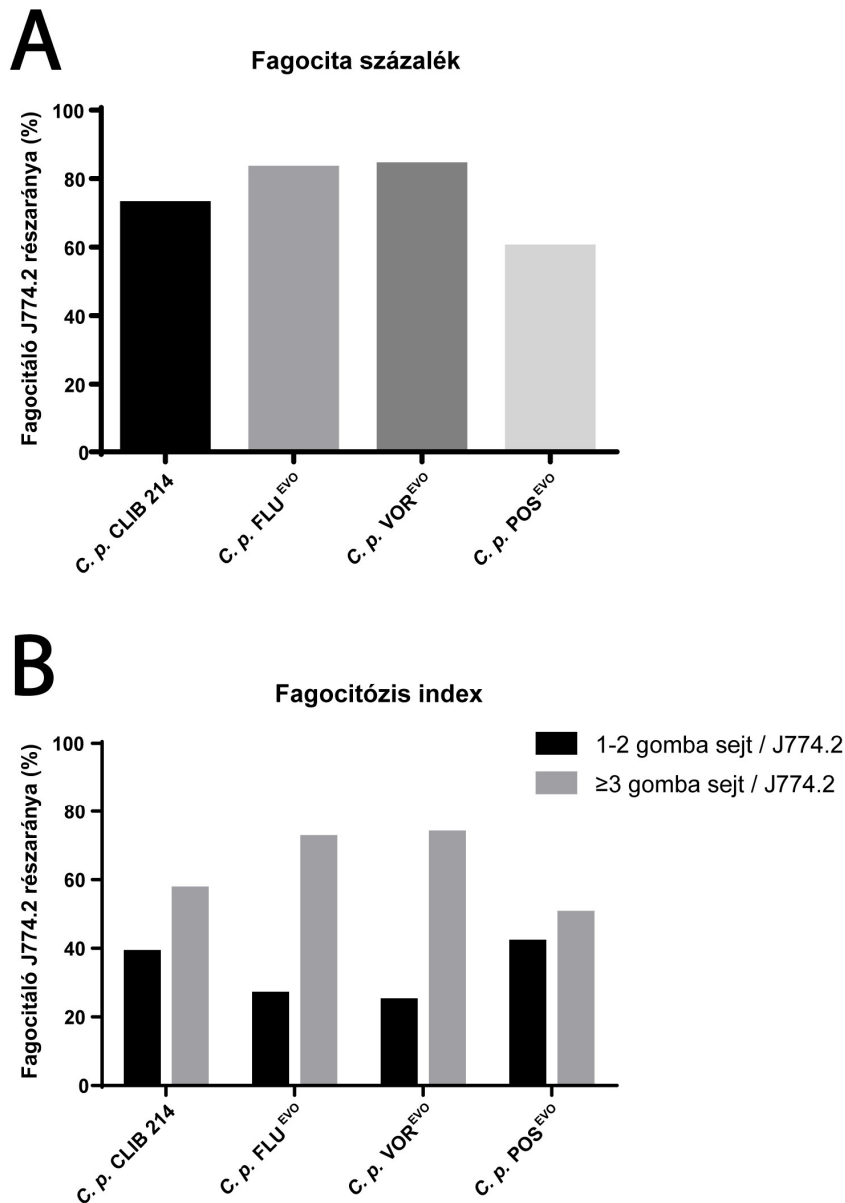
A membránkárosító SDS jelenlétében - hasonlóan a kongóvöröshöz - 37 °C-on sem a szülői törzs, sem a triazol evolvált törzsek nem voltak képesek növekedni, azonban 30 °C-on a FLU<sup>EVO</sup> törzs erőteljesebb növekedési képességet mutatott a szülői törzshöz képest, míg a VOR<sup>EVO</sup> és POS<sup>EVO</sup> törzseknél teljes növekedésgátlást figyeltünk meg.

	Nincs növekedés	Erős deffektus	Közepes deffektus	Enyhe deffektus	Nincs különbség	Jobb növekedés
Viszonyl. növ. kép. a <i>C. p.</i> CLIB 214-hez						
Törzs	FLU <sup>EVO</sup>		VOR <sup>EVO</sup>		POS <sup>EVO</sup>	
Hőmérséklet	30 °C	37 °C	30 °C	37 °C	30 °C	37 °C
<b>Ozmotikus stresszorok</b>						
Glicerol (8% m/V)						
Glicerol (10% m/V)						
Glicerol (12% m/V)						
NaCl (1 M)						
NaCl (1,5 M)						
Szorbitol (1 M)						
<b>Sejtfal szintézis zavaró ágensek</b>						
Koffein (12,5 mM)						
Koffein (15 mM)						
Koffein (17,5 mM)						
Kalkofluor fehér (50 µg/ml)						
Kalkofluor fehér (75 µg/ml)						
Kalkofluor fehér (100 µg/ml)						
Kongóvörös (10 µg/ml)		*		*		*
Kongóvörös (25 µg/ml)		*		*		*
Kongóvörös (50 µg/ml)		*		*		*
Kongóvörös (75 µg/ml)		*		*		*
<b>Membrán detergenszek</b>						
SDS (0,02% m/V)						
SDS (0,04% m/V)						
SDS (0,06% m/V)						

**15. ábra:** A triazol evolvált törzsek (FLU<sup>EVO</sup>, VOR<sup>EVO</sup>, POS<sup>EVO</sup>) növekedésének hőtésképe ozmotikus stresszorok, sejtfal felépülést zavaró ágensek és membránkárosító vegyületek jelenlétében 30 és 37 °C-on nevelve a szülői *C. parapsilosis* CLIB 214 törzshöz viszonyítva. A „\*” a szülői törzs növekedési hiányát jelzi.

### 6.3.3. J774.2 makrofág sejtek fagocitózis hatékonysága triazol evolvált törzsekkel szemben

Megvizsgáltuk a szülői *C. parapsilosis* CLIB 214 törzssel és a triazol evolvált törzsekkel szemben mutatott fagocitózis hatékonyságát J774.2 makrofágszerű sejtek által egy előkísérletben. Áramlási citometriás eljárás segítségével meghatároztuk a J774.2 sejtek azon hányadát, amelyek legalább 1 gombasejtet fagocitáltak, valamint ezen a fagocitózis pozitív populáción belül megállapítottuk azoknak a sejteknek az arányát, amelyek 1 és 2 gombasejtet vagy pedig 3 és annál több gombasejtet kebeleztek be 2 órával a J774.2 makrofágok gombával való fertőzését követően.



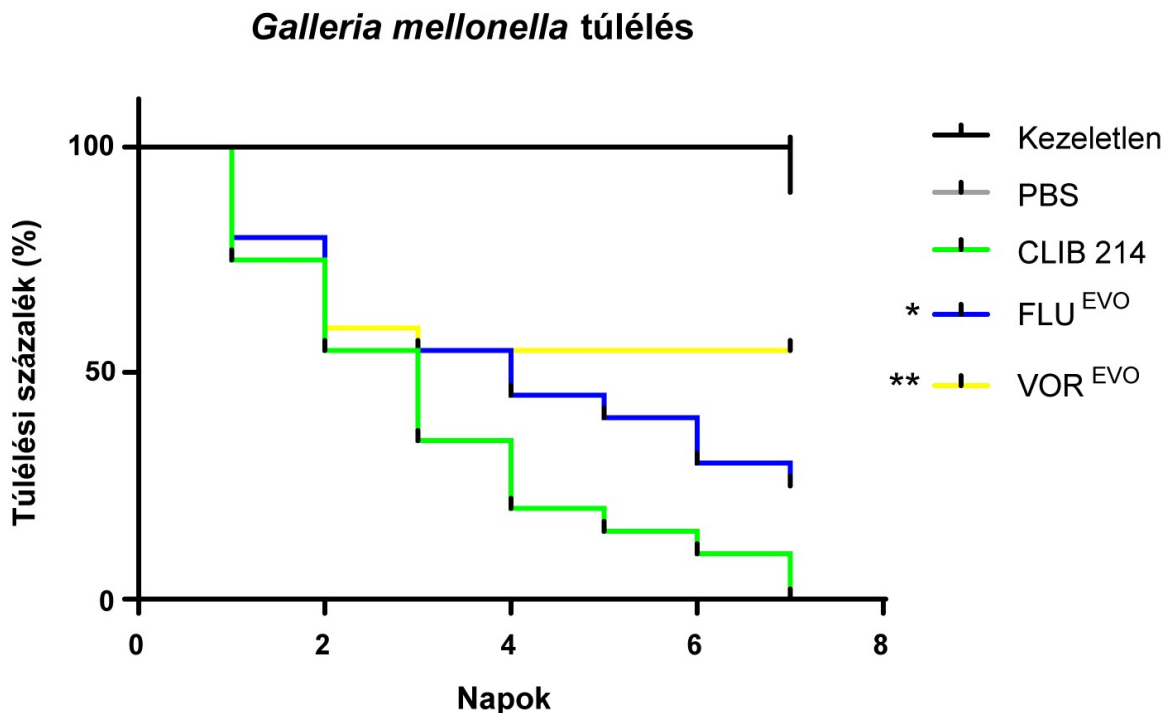
**16. ábra:** A J774.2 makrofágok *C. parapsilosis* CLIB 214, FLU<sup>EVO</sup>, VOR<sup>EVO</sup> és POS<sup>EVO</sup> törzsekkel szembeni fagocitózis hatékonysága. **(A)** A J774.2 makrofág-szerű sejtek populációjában a fagocitáló sejtek aránya a CLIB 214, FLU<sup>EVO</sup>, VOR<sup>EVO</sup> és POS<sup>EVO</sup> törzsekkel való fertőzést követően. **(B)** A fagocitáló J774.2 makrofág populációban az 1-2 gombasejtet fagocitáló és a legalább 3 gombasejtet fagocitáló sejtek aránya a CLIB 214, FLU<sup>EVO</sup>, VOR<sup>EVO</sup> és POS<sup>EVO</sup> törzsekkel való fertőzést követően.

A *C. parapsilosis* CLIB 214 sejteket a J774.2 makrofágok 72,7%-a fagocitálta (**16. ábra, A**), ezen sejtek között az 1-2 sejtet fagocitáló makrofágok aránya elérte a 40%-ot, míg a háromnál több élesztőt fagocitáló sejtek aránya 60% körüli volt (**16. ábra, B**). A FLU<sup>EVO</sup> és VOR<sup>EVO</sup> törzsek sejtjeit a makrofágszerű sejtek 83 és 84%-a fagocitálta (**16. ábra, A**), ráadásul a fagocitálni képes sejtek populációján belül a háromnál több gombasejtet

fagocitáló J774.2 sejtek aránya a CLIB 214 esetén tapasztalható 60%-ról 72-73%-ra emelkedett (**16. ábra, B**). A FLU<sup>EVO</sup> és VOR<sup>EVO</sup> törzseknél tapasztalt növekedés a fagocitáló sejtek arányában és a fagocitált gombák számának arányában a POS<sup>EVO</sup> törzssel való fertőzést követően nem volt megfigyelhető, sőt a fagocitáló sejtek aránya 72,7%-ról 60%-ra csökkent (**16. ábra, A**). Továbbá a legalább 3 élesztőt fagocitáló makrofágok aránya is kismértékű csökkenést mutatott (50%) a szülői *C. parapsilosis* CLIB 214 törzssel való fertőzéshez viszonyítva (**16. ábra, B**).

#### **6.3.4. In vivo virulencia vizsgálat *Galleria mellonella* fertőzési modellben**

Mivel a FLU<sup>EVO</sup> és VOR<sup>EVO</sup> törzsekkel szemben a makrofágok emelkedett fagocitózis hatékonyságot mutattak a szülői törzshöz képest, megvizsgáltuk *in vivo* *G. mellonella* modellben a *C. parapsilosis* CLIB 214, FLU<sup>EVO</sup> és VOR<sup>EVO</sup> törzsek virulenciáját. A kezeletlen és a PBS-sel kezelt lárvák a kísérlet időtartama alatt nem pusztultak el, ami alapján kijelenthető, hogy a gombasejtekkel fertőzött állatok pusztulását a gombasejtek jelenléte okozta. A lárvák túlélését 7 napon keresztül figyeltük meg, mivel ez volt az az időpont, amikor a *C. parapsilosis* CLIB 214 törzssel fertőzött lárvák mindegyike elpusztult (**17. ábra**). A monitorozási időszak folyamán a lárvák pusztulása egyenletesnek bizonyult. A három különböző gombatörzssel fertőzött állatok túlélési görbéje a 3. napig megegyezett (55%-os pusztulás), azonban a 4. naptól kezdve a görbék elváltak egymástól: a CLIB 214 fertőzött lárvák továbbra is 15-20%-os pusztulást mutattak, míg a FLU<sup>EVO</sup> törzssel fertőzött lárvák napi pusztulása 5-10%-ra csökkent, a VOR<sup>EVO</sup> törzssel fertőzött állatok közül pedig a 3. naptól kezdve egy sem pusztult el (**17. ábra**).



**17. ábra:** A szülői (*C. parapsilosis* CLIB 214) és triazol evolvált törzsek (FLU<sup>EVO</sup>, VOR<sup>EVO</sup>) virulenciája *in vivo* fertőzések során. A szülői és evolvált törzsekkel fertőzött *G. mellonella* lárvák túlélésének alakulása 7 napos időintervallumban. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,005$

### 6.3.5. Genomszekvenálás és az aminosav szubsztitúciók meghatározása a triazol evolvált törzsek rezisztencia szempontjából lényeges fehérjéinek elsődleges szerkezetében

A vad típusú CLIB 214 és a belőle létrehozott triazol evolvált törzsek (FLU<sup>EVO</sup>, VOR<sup>EVO</sup>, POS<sup>EVO</sup>) genomját Illumina rendszerrel szekvenáltuk, majd a pontmutációkat analizáltuk. Összehasonlítottuk, hogy a szülői törzs genomjához képest milyen aminosav változást okozó mutációk alakultak ki az azol evolvált törzsek genomjában. Az előforduló aminosav változásokat a **6. táblázat** foglalja össze.

A FLU<sup>EVO</sup> és VOR<sup>EVO</sup> törzsekben az *MRR1* génben egy-egy misszensz mutációt találtunk, amelyek az *Mrr1* transzkripciós faktorban a FLU<sup>EVO</sup> törzs esetén A808T (alanin/threonin) aminosav szubsztitúciót, a VOR<sup>EVO</sup> törzs esetén pedig A394T aminosavcserét okoztak. Az *Mrr1* transzkripciós faktor az *MDR1* gén transzkripciójának pozitív regulátora. A POS<sup>EVO</sup> törzsben nem találtunk pontmutációkat az *MRR1* génben, ellenben a  $\Delta^{5,6}$ -deszaturáz enzimet kódoló *ERG3* gén olyan pontmutációt tartalmazott, amely G14T (glicin/threonin) aminosav szubsztitúciót okozott a szülői törzshöz viszonyítva. Az *Erg3* enzim lényeges szerepet játszik az ergosterol bioszintézisének folyamatában, valamint az azolok hatásmechanizmusában is, mivel ez az enzim hozza létre az azolok által gátolt

Erg11 funkciójának kiesése következtében azokat a toxikus szterolokat, amelyek megakadályozzák a gombasejtek növekedését és osztódását az azok jelenlétében. A POS<sup>EVO</sup> törzsben az *ERG3* gént érintő mutáción kívül a *CaBPHI*-gyel homológ génben is azonosítottunk egy pontmutációt, amely a fehérje szekvenciájában A1006T aminosav változást okozott.

**6. táblázat: Aminosavcserek a *C. parapsilosis* triazol evolvált törzsekben (FLU<sup>EVO</sup>, VOR<sup>EVO</sup>, POS<sup>EVO</sup>) a CLIB 214 törzshöz viszonyítva.**

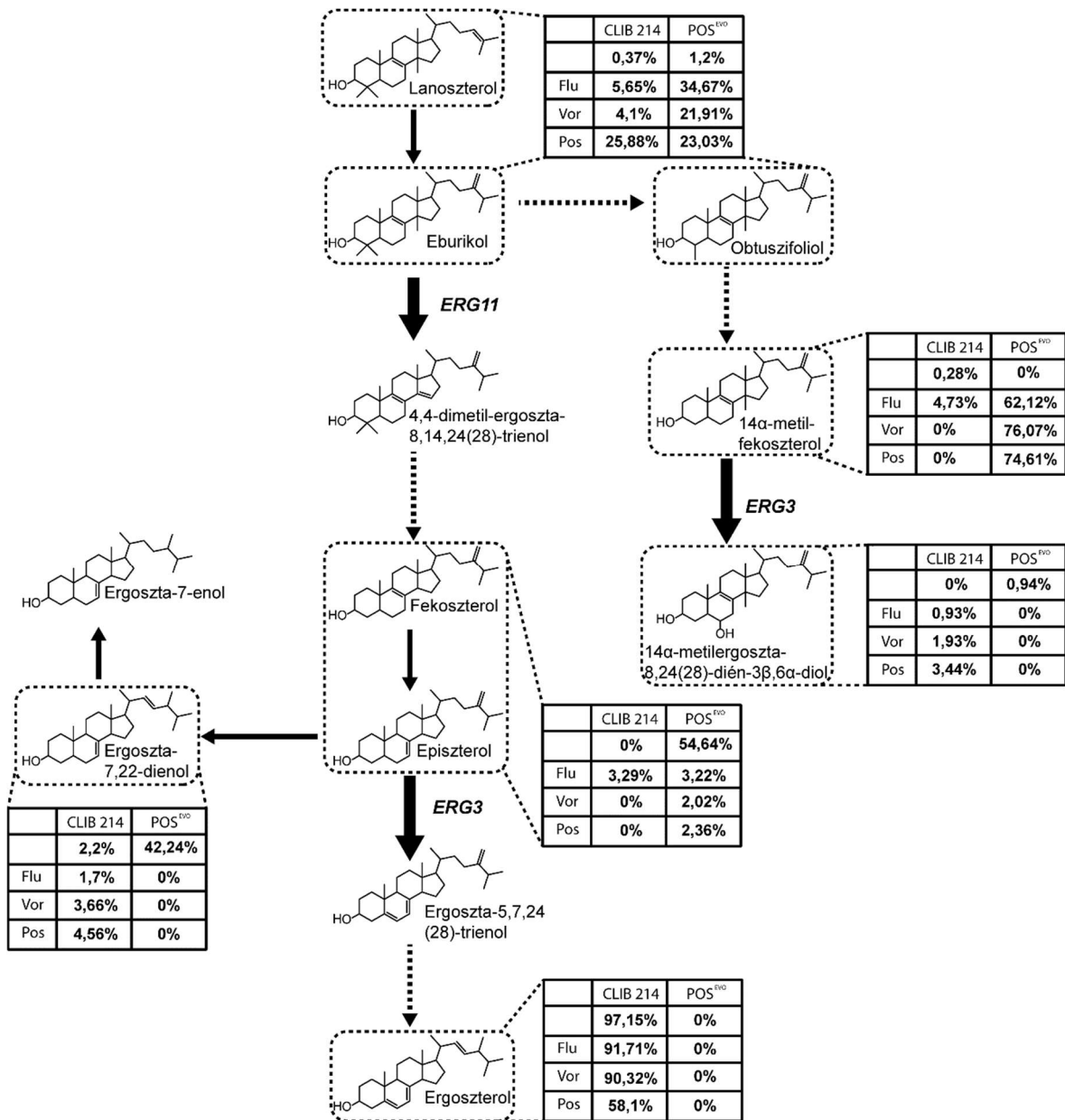
Törzs	Gén	Ortológ gén	Ortológ funkció	Aminosav szubsztitúció
FLU <sup>EVO</sup>	CPAR2_807270	<i>MRR1</i>	Mdr1 efflux pumpa transzkripció aktivátora	A808T
VOR <sup>EVO</sup>				A394T
POS <sup>EVO</sup>	CPAR2_105550	<i>ERG3</i>	$\Delta^5$ szterol-deszaturáz, szerep az ergoszterol bioszintézisben	G14T
	CPAR2_803350	<i>BPHI</i>	szerep a sejtfal szerveződésben, sejten belüli fehérjetranszport	A1006T

### 6.3.6. Különbségek vizsgálata a vad típusú CLIB 214 és POS<sup>EVO</sup> törzsek szterol összetételében

Mivel az ergoszterol bioszintézisben szerepet játszó *ERG3* gén termékében aminosav változást tapasztaltunk a POS<sup>EVO</sup> törzs esetén a szülői CLIB 214 törzshöz viszonyítva, megvizsgáltuk a két törzs szterol összetételét azokkal történő kezelés után (MIC érték felét jelentő koncentrációban alkalmazva) és kezelés hiányában LC-MS segítségével. A különböző szterolszármazékok arányát a görbék alatti területek arányával határoztuk meg. A kísérlet eredményének összefoglalása a **18. ábrán** látható.

Azokkal történő kezelés hiányában a szülői CLIB 214 törzsben túlnyomó mennyiségben ergoszterol képződött (97,15%), emellett 2,2%-ban tartalmazott ergoszta-7,22-dienolt, valamint alacsony mennyiségben lanoszterolt és eburikolt (0,37%), illetve 0,28% 14 $\alpha$ -metil-fekoszterolt (**18. ábra**). Ezzel ellentétben a POS<sup>EVO</sup> törzs azol-kezelés nélkül 54,64%-ban fekoszterolt és episzterolt, 42,24%-ban ergoszta-7,22-dienolt, valamint kis mennyiségben lanoszterolt és eburikolt (1,2%) és 14 $\alpha$ -metil-ergoszta-8,24(28)-dién-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diolt (0,94%) tartalmazott (**18. ábra**).





**18. ábra:** Az ergoszterol bioszintézis útvonala és az útvonal módosulásai azol-kezelés és a bioszintézisben szerepet játszó enzimek defektusainak hatására. A táblázatok a *C. parapsilosis* CLIB 214 és POS<sup>EVO</sup> törzsek szterol profilját tartalmazzák kezelés hiányában, valamint flukonazol, vorikonazol és posakonazol kezelést követően.

A vad típusú CLIB 214 törzs a MIC érték felének megfelelő flukonazol és vorikonazol kezelés hatására továbbra is legnagyobb mennyiségben ergoszterol volt megfigyelhető (91,71% és 90,32%). Emellett a flukonazol és vorikonazol kezelt CLIB 214 sejtek 5,65% és 4,1% lanoszterol/eburikolt, valamint 0,93% és 1,93% toxikus 14 $\alpha$ -metil-ergoszte-8,24(28)-dién-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diolt tartalmaztak (18. ábra). A CLIB 214 törzs posakonazol kezelése esetén az ergoszterol mennyisége jelentősen lecsökkent, már csak az összes szterol

mennyiség 58,1%-át tette ki, emellett nagyobb mennyiségben tartalmazott lanoszterolt/eburikolt (25,88%), kisebb mennyiségben pedig ergoszta-7,22-diolt (4,56%) és 3,44%-ban 14 $\alpha$ -metil-ergoszta-8,24(28)-dién-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diolt. A POS<sup>EVO</sup> törzs esetén sem kezelés nélkül, sem egyik triazol jelenlétében nem termelődött ergoszterol a sejtekben, helyette 14 $\alpha$ -metil-fekoszterol keletkezett a legnagyobb mennyiségben (62,12, 76,07 és 74,61% a különböző kezelések esetén), ezenkívül nagyobb mennyiségben termelődött obtuszifoliol/lanoszterol/eburikol (flukonazol kezelés: 34,67%, vorikonazol-kezelés: 21,91%, posakonazol kezelés: 23,03%) **(18. ábra)**. A CLIB 214 törzsben az ergoszterol mennyisége azol-kezelés hatására a kezeléshez használt, MIC érték felének megfelelő, alacsony drog koncentráció miatt maradhatott a legnagyobb mennyiségben termelődő szterol vegyület.

## 7. Diszkusszió

Munkánk során a *C. parapsilosis* olyan antifungális rezisztencia mechanizmusait vizsgáltuk, amelyek legnagyobb gyakorisággal felelősek a *Candida* fajok antifungális szerekkel szemben mutatott ellenállóképességért. Továbbá azt, hogy ezek a mechanizmusok hogyan hatnak a gomba életképességére a fertőzés során.

Az ABC-transzporterek szerepe az azolokkal szembeni rezisztenciában *C. albicans* (Cdr1, Cdr2) és *C. glabrata* (Cdr1, Cdr2, Snq2) fajok esetén igen lényeges (Chen, és mtsi. 2010; Coleman és Mylonakis 2009; Sanglard, és mtsi. 2009). Ezzel ellentétben a *C. parapsilosis*-ban jelentőségük kevésbé hangsúlyos, mivel a vad típusú törzs flukonazol hatására megállapított MIC értéke (0,5 µg/ml) mindössze a felére csökkent a *CDR1-2* gének hiányában (0,25 µg/ml). Az ABC-transzporterek kisebb jelentőségét az is alátámasztja, hogy a *C. parapsilosis* triazol evolvált törzsekben (FLU<sup>EVO</sup>, VOR<sup>EVO</sup>, POS<sup>EVO</sup>) a *TAC1*-ben, a *CDR* gének transzkripciós aktivátorában, nem jöttek létre funkcionyeréses mutációk, mint ahogy *C. albicans* *TAC1* génjében létrejövő mutációk erőteljesen megemelik a MIC értéket flukonazzal szemben (Coste, és mtsi. 2006; Sasse, és mtsi. 2012). Az MFS-transzporterek családjába tartozó Mdr1 fehérjének nagy szerepe lehet a flukonazol és vorikonazol rezisztenciában, mivel a FLU<sup>EVO</sup> és VOR<sup>EVO</sup> törzsek *MRR1* génjében jött létre pontmutáció. *C. parapsilosis*-ban erre szakirodalmi adatok is egyértelműen utalnak (Branco, és mtsi. 2015; Silva, és mtsi. 2011). Azonban teljes transzkriptom analízis vagy valós idejű kvantitatív PCR szükséges a megnövekedett MDR1 expresszió kimutatására. A FLU<sup>EVO</sup> és VOR<sup>EVO</sup> törzsek egyaránt kereszt-rezisztenciát mutattak flukonazolra és vorikonazolra. Ez arra utal, hogy a két antifungális szer szubsztrátja az Mdr1 transzporter fehérjének. Továbbá az a megfigyelés, hogy ebben a törzsekben a MIC érték nem változott posakonazzal szemben arra enged következtetni, hogy a posakonazol az Mdr1 nem képes kijuttatni a gombasejtből. Ezt az információt a szakirodalom szintén alátámasztja (Cannon, és mtsi. 2009; Li, és mtsi. 2004; Silva, és mtsi. 2011). A *C. albicans* azol-rezisztenciájában gyakran szerepe van az ergoszterol bioszintézisben szerepet játszó gének emelkedett kifejeződésének (Heilmann, és mtsi. 2010; Silva, és mtsi. 2011), amiaz *UPC2* és *NDT80* gének által kódolt transzkripciós faktorokban bekövetkező funkcionyeréses mutációk meglétének köszönhető (Dunkel, és mtsi. 2008; Sellam, és mtsi. 2009). azonban ezen két transzkripciós faktort kódoló gének szekvenciájában nem találtunk mutációkat a triazol szelekció hatására létrejött törzsekben.

A POS<sup>EVO</sup> törzsre jellemző *ERG3* mutáció funkcióvesztéses, mivel azol-kezelés nélkül a POS<sup>EVO</sup> és CLIB 214 törzsek szterol profilját összehasonlítva kiderült, hogy a POS<sup>EVO</sup> törzsben nem megy végbe az ergoszterol bioszintézisének egyik végső lépése, amelyet ez az enzim katalizál (**1. ábra, A**). Ebben az esetben ergoszterol egyáltalán nem keletkezik a POS<sup>EVO</sup> törzsben, míg a CLIB 214 törzsben legnagyobb mennyiségben ez a végtermék keletkezik legnagyobb mennyiségben (**18. ábra**). Az Erg3 azonban nemcsak az ergoszterol szintézisében lényeges, hanem ahogy az már az irodalmi bevezetőben is szóba került, ez az enzim felelős a toxikus szterol szintéziséért azolokkal történő gátlás esetén. Erg3 működésének hiányában vagy elégtelen funkciójának következtében az azolok általi szintetikus útvonal gátlása nem elegendő a gombasejtek növekedésének és osztódásának gátlásához. Mivel a posakonazol nem szubsztrátja az effluxért felelős pumpafehérjéknek, a posakonazol rezisztencia mechanizmus a *C. parapsilosis*-ban az Erg3 hibás működésének következtében nyilvánul meg. Megfontolva azt, hogy az azolok hatásmechanizmusában az Erg3 működése központi helyet foglal el, az Erg3 funkciójának kiesése keresztrezisztenciát okozott az általunk vizsgált összes azol típusú szer közt, sőt még az amfotericin B esetén is csökkent érzékenységet eredményezett. *C. albicans* esetén is ismert az Erg3 funkcióvesztése okán kialakuló általános azol-rezisztencia. Ezekben a klinikai izolátumokban az *ERG3* és *ERG11* génekből több mutációt is megfigyeltek (Martel, és mtsi. 2010b). Érdekes módon a *C. parapsilosis* CLIB 214 törzsben a MIC érték felének megfelelő azol-kezelés hatására csak kis mennyiségben termelődött a toxikus 14 $\alpha$ -metil-ergoszta-8,24(28)-dién-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol, míg hasonló kezelés hatására *C. albicans* vad típusú izolátumaiban ennek a szterolszármazéknak a mennyisége meghaladja az összes szterol mennyiségének negyedét is (Martel, és mtsi. 2010b). Ezért *C. parapsilosis* esetén érdemes lehet a későbbiekben nagyobb koncentrációjú azol kezelés mellett is megvizsgálni a CLIB 214 és POS<sup>EVO</sup> törzsek szterol összetételét.

A *CDR1-2* gének eltávolításának hatására a deléciós törzs megnövekedett virulenciát mutatott mind az *in vitro* gombaeliminációs kísérletekben, mind pedig az *in vivo* egér fertőzési modellben. Az eddig megjelent szakirodalom nem ad közvetlen magyarázatot ennek a jelenségnek a hátterére. *C. albicans*-ban a Cdr1 és Cdr2 proteinek más, antifungális szerek kipumpálásában betöltött szereptől eltérő funkciókkal is rendelkeznek, amelyek befolyással lehetnek a gomba életképességére akár fertőzés során is (Prasad és Goffeau 2012). A gombasejtek plazmamembránjában a különböző foszfolipidek aszimmetrikusan helyezkednek el a membrán külső és belső oldala között: A foszfatidil-etanolamin (PE) és a foszfatidil-szerin (PS) jellemzően a membrán belső rétegében található, míg a külső réteget foszfatidil-kolin (PC), szfingomielin és glikolipidek alkotják (Diaz és Schroit 1996). *C.*

*albicans* Cdr1 és Cdr2 transzporterei képesek a foszfolipidek belülről kifelé történő átmozgatására (floppáz aktivitás) (Egner, és mtsi. 1995; Smriti, és mtsi. 2002) Ez a PS és PE mennyiségének növekedését eredményezi a plazmamembrán külső rétegében, ami jelentős változásokat okozhat a gomba fiziológiájában (Toti, és mtsi. 1997). Az ABC-transzporterek *C. albicans*-ban és *S. cerevisiae*-ben képesek a H<sup>+</sup> sejtből kifelé történő szállítására is. Egy antifungális peptiddel konjugált FMDP (N3-(4-metoxi-fumaroil)-L-2,3-diaminopropánsav) molekula a gombasejtbe peptid permeázok segítségével szállítódik, amelyek működése erős korrelációt mutat a sejten kívüli alacsony pH-val. A bekerülő peptid-FMDP konjugátum gátolja a sejtfal szintézisét, ezáltal pedig a sejt növekedését és osztódását (Milewski, és mtsi. 2001). Makrofágok lizoszómájában leírtak több kationos antimikrobiális peptidet, amelyek képesek a mikroorganizmusok elpusztítására (Rosenberger, és mtsi. 2004; Scott, és mtsi. 2000). Nem kizárható, hogy ezek a makrofágokban sejten belül előforduló peptidek is képesek bejutni gombasejtekbe a korábban említett permeázokon keresztül, amelyet az ABC-transzporterek által befolyásolt H<sup>+</sup> gradiens segít elő. Így elképzelhető, hogy ilyen transzporterek hiányában a módosuló proton koncentráció különbségek a membrán két oldala közt akadályozzák az antimikrobiális peptidek bejutását, azonban ennek bizonyításához további vizsgálatok szükségesek.

Az azokkal evolváló törzsek virulenciája a FLU<sup>EVO</sup> és VOR<sup>EVO</sup> törzsek esetében csökkenést mutatott *in vitro* fagocitózis hatékonysági és *in vivo* *G. mellonella* túlélési kísérletekben egyaránt. Ezzel ellentétben a POS<sup>EVO</sup> törzs elleni *in vitro* fagocitózis hatékonyság a szülői törzshöz képest csökkenést mutatott, vagyis a makrofágok csekélyebb mértékben voltak képesek a törzs sejtjeinek fagocitózisára, ami a törzs hatékonyabb túlélésének lehetőségét veti fel fertőzés során. Azonban a POS<sup>EVO</sup> törzs technikai okokból kifolyóan nem szerepelt az *in vivo* *G. mellonella* túlélési kísérletben, így ezeket a vizsgálatokat erre a törzsre is ki kell terjeszteni, valamint indokolt az *in vivo* fertőzéses kísérleteket egér modellben is végrehajtani. Az evolváló törzsek genomjában több deléción és duplikáción is létrejött a törzsek adaptálódása során, amelyeknek lehetséges, hogy szerepe lehet a tapasztalt virulencia csökkenésben, azonban ezeknek a genetikai változásoknak a szerepe nem tisztázott, kiértékelésük jelenleg is folyamatban van. Ugyanakkor szerepüknek a virulencia csökkenésében ellentmond, hogy a POS<sup>EVO</sup> törzs genomjában is fellelhetőek voltak duplikációk és deléción, azonban ennek a törzsnek a virulenciája nem csökkent úgy, mint a FLU<sup>EVO</sup> és VOR<sup>EVO</sup> törzsek esetében.

A *C. albicans* Erg3 funkcióvesztése a klinikumban nem gyakori, mivel felborítja a sejtek szterol összetételét. Ennek következtében az ilyen sejtek kevésbé képesek életben

maradni a fertőzés során (Vincent, és mtsi. 2013). Mindezek ellenére a POS<sup>EVO</sup> törzsben bekövetkező Erg3 csökkent működése nem okozta *in vitro* körülmények között a törzs virulenciájának visszaesését. Megjegyzésre érdemes viszont, hogy ebben a törzsben a *BPH1* génben is bekövetkezett mutáció, amely felveti annak lehetőségét, hogy az egyébként káros élettani állapotot más mutációk létrejötte képes lehet kompenzálni. Ez a jelenség a baktériumoknál gyakran előfordul a rezisztenciát okozó, ám fitness költséggel járó mutációk esetében (Freihofer, és mtsi. 2016; Handel, és mtsi. 2013).

Az echinokandinokkal evolváló törzsek rezisztenciáját mindhárom törzs esetében az *FKSI* mutációja okozta. Érdekes módon azonban a különböző echinokandin evolváló törzsekben létrejött eltérő aminosav cserék az Fks1 fehérjében más-más mértékben okoztak keresztrezisztenciát a többi echinokandinval, amelyet nem az adott törzs létrehozásánál használtunk. Így például a MIC<sup>EVO</sup> törzs, amelyre az L703F aminosav szubsztitúció volt jellemző, jóval alacsonyabb MIC értékkel bírt caspofunginra és anidulafunginra, mint a CAS<sup>EVO</sup> és AND<sup>EVO</sup> törzsek, amelyekben megtalálható volt a W1370R aminosav csere. Az AND<sup>EVO</sup> törzs Fks1 fehérjében ezenkívül található volt egy S656P szubsztitúció is, de csak heterozigóta formában. *C. albicans*-ban az ezzel egyenértékű aminosav pozícióban létrejövő S645P/F/Y aminosav cserék felelősek a klinikumban előforduló echinokandin-rezisztens törzsek közel felének a létrejöttéért (Perlin 2011)., Esetünkben ez csak egyetlen törzsben fordult elő, ott is csak heterozigóta formában. *C. albicans*-ban a HS1 régióban előforduló aminosav változások okozzák az esetek 88%-ában és legerőteljesebben az echinokandin-rezisztens fenotípust (Perlin 2011). Munkánkban az echinokandin evolváló törzsekben újonnan létrejött homozigóta aminosav cserék a HS2 és HS3 régiókban voltak megtalálhatóak. Erre magyarázatot adhat a *C. parapsilosis* Fks1 enzim topológiájának *in silico* előrejelzése, ugyanis az evolváló törzsekben létrejött aminosav változások (L703F, W1370R) a fehérje extracelluláris és transzmembrán szakaszaira térképeződtek. A modell szerint a fehérje sejten kívüli N- és C- terminális szakaszokkal rendelkezik, valamint a 6-os és 7-es transzmembrán szegmenseket összekötő szakasz is extracellulárisan helyezkedik el, ellentétben a *C. albicans* és *S. cerevisiae* Fks1 fehérjékkel, amelyekben ez az összekötő szakasz intracellulárisan lokalizálódik (Johnson és Edlind 2012). Az általunk létrehozott topológia modell érvényességének megerősítése azonban további kísérleteket igényel.

*C. albicans* esetén ismert, hogy a különböző, a klinikumban előforduló rezisztens izolátumok az Fks1 enzimben található aminosav cseréktől függően csökkent életképességet mutatnak. Az S645P szubsztitúció például az aminosav cserével bíró törzsekben a virulencia drasztikus csökkenésével jár (Anderson 2005; Ben-Ami, és mtsi. 2011). Ez a fitness változás

a különböző aminosav szubsztitúciók esetén eltérő mértékű lehet (Ben-Ami és Kontoyiannis 2012). Ezekben a rezisztens izolátumokban a csökkent virulencia elsősorban a sejtfal kitin tartalmának a megnövekedésére vezethető vissza (Ben-Ami, és mtsi. 2011; Da Silva, és mtsi. 2009). Az echinokandin evolvált törzseink esetén *in vivo* fertőzési modellben csökkent patogenitást tapasztaltunk, vagyis az evolvált törzsekkel történő fertőzés esetén a *G. mellonella* lárvák túlélése magasabb volt a szülői törzssel való fertőzött lárvákéhoz képest. Továbbá az egér fertőzési modellben az állatok szerveiben jelentősen kevesebb kolóniaképző egység volt kimutatható az evolvált törzsekkel való fertőzés után. *C. glabrata* echinokandin-rezisztens izolátumaiban azonban a virulenciának ez a csökkenés nem volt megfigyelhető. A kísérleti körülmények között *G. mellonella* modellszervezetben Fks1/Fks2 aminosav szubsztitúciók jelenlétéből adódó rezisztencia esetén a rezisztens törzsek hasonló mértékben voltak képesek a viaszmosy lárvák elpusztítására (Borghi, és mtsi. 2014).

Kutatásaink során megvizsgáltuk, hogy a *Candida* fajokban leírt leggyakoribb antifungális szerekkel szemben mutatott rezisztencia mechanizmusok milyen mértékben vannak hatással a *C. parapsilosis* azokkal ellenálló képességére. Továbbá összefüggést mutattunk ki ezek a mechanizmusok és a gomba fertőzést kiváltó képessége között. Ez utóbbi az azokkal szembeni rezisztencia esetén újszerű megközelítésnek számít, mivel a rezisztens törzsek virulenciáját mindeddig egyik *Candida* fajban sem vizsgálták. Ezenkívül kimutattuk, hogy az echinokandinokkal szembeni rezisztencia a *C. parapsilosis*-ban a *C. albicans*-hoz hasonlóan befolyásolja a virulenciát.

## 8. Összefoglalás

A gombák által okozott megbetegedések egyre nagyobb jelentőséggel bírnak, mivel számuk és az általuk érintett földrajzi területek mérete is növekszik. Ezek a fertőzést kiváltani képes gombák nagy része opportunistá humánpatogén, vagyis egészséges immunrendszerrel rendelkező egyéneknél nem okoznak kóros folyamatokat, azonban az immunrendszer bármilyen okból történő gyengülése lehetőséget jelent betegség kialakulására. A *Candida* nemzetség fajtái között is találunk több opportunistá patogént, amelyek között a *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei* és *C. tropicalis* a legjelentősebbek. A felsorolt fajok között a *C. albicans* bír a legnagyobb jelentőséggel, azonban az utóbbi évtizedekben az egyéb nem-*albicans Candida* fajok okozta megbetegedések száma is fokozatosan. Ennek hátterében az antifungális szerek egyre inkább elterjedt használata és a különböző *Candida* fajok eltérő antifungális érzékenysége állhat. A *C. glabrata* mellett a *C. parapsilosis* az a két másik faj, amely leginkább teret nyert a *C. albicans* okozta megbetegedésekkel szemben. Ennek oka a *C. glabrata* igen gyakori azol-rezisztenciája és a *C. parapsilosis* eredendően gyenge echinokandin érzékenysége állhat. A *C. parapsilosis* jelentőségét tovább növeli, hogy a kórházi mikrobiális fertőzések egyik leggyakoribb okozója.

A *Candida* fajok okozta megbetegedések esetén az alkalmazott antifungális szerek csoportjainak száma viszonylag korlátozott. Alapvetően poliéneket (amfotericin B), triazolokat (flukonazol, vorikonazol, posakonazol) és echinokandinokat (casposungin, anidulafungin, micafungin) alkalmaznak a fertőzések kezelésére. A poliének a gomba membránjára jellemző ergosterolhoz kötődnek így távolítva el ezt a membrándinamikában fontos szterolt, ami végül a gomba életfolyamatait olyan mértékben érinti, hogy az elpusztul. A különböző azolok a gomba ergosterol bioszintézisét gátolják olyan módon, hogy a szintetikus útvonal toxikus szterolok képződéséhez vezet. Az echinokandinok a gomba sejtfalának szintézisét és ez által a gomba növekedését és osztódását akadályozzák meg. Az antifungális terápia hatékonyságát csökkenti, ha a beteg egy rezisztens törzs által fertőződik. A rezisztencia mechanizmusa alapvetően az adott antifungális szer csoporttal szemben jellemző, így az adott szer csoportjának tagjai között gyakran okoznak keresztrezisztenciát, azonban bizonyos mechanizmusok a különböző csoportok között is létrehozhatják ezt. A különböző mechanizmusok elsősorban a *C. albicans*-szal és *C. glabrata*-val végzett kutatásokból ismertek. Ezekben a fajokban az azolokkal szembeni rezisztencia leggyakoribb oka a különböző efflux pumpa fehérjék (ABC-transzporterek, MFS-transzporterek)



mennyiségi megemelkedése a plazmamembránban. Ezen kívül előfordul az is, hogy az Erg11 aminosav sorrendjének megváltozása és az Erg3 funkcióvesztése következtében alakul ki az azol-rezisztencia. A poliének elleni rezisztenciát az ergosterol bioszintézis enzimeiben bekövetkező aminosav sorrendbeli változások okozzák, amelyek más, az ergosteroltól eltérő szterolok létrejöttét eredményezik, melyekhez a poliének jelentősen kisebb hatékonysággal képesek kapcsolódni. Az echinokandinokkal szembeni rezisztenciáért az echinokandinok által gátolt Fks1 fehérjében létrejövő aminosav cserék tehetők felelőssé.

Munkánk során *C. parapsilosis*-ban vizsgáltuk a különböző triazolokkal és echinokandinokkal szembeni rezisztencia mechanizmusok kialakulását és a mechanizmusok a gomba életképességére, valamint virulenciájára gyakorolt hatását. Ennek érdekében létrehoztunk egy *CDR1* és *CDR2* kettős deléciós *C. parapsilosis* törzset, három, a különböző triazolok jelenlétében és három, az echinokandinok jelenlétében direkt szelekciós eljárással létrehozott *C. parapsilosis* törzset (FLU<sup>EVO</sup>, VOR<sup>EVO</sup>, POS<sup>EVO</sup>, CAS<sup>EVO</sup>, AND<sup>EVO</sup>, MIC<sup>EVO</sup>). A törzsek létrehozása után megvizsgáltuk azok érzékenységét antifungális szerekkel (amfotericin B, flukonazol, vorikonazol, posakonazol, itraconazol, caspofungin, anidulafungin, micafungin) szemben. A *CDR1-2* deléciós *C. parapsilosis* kis mértékben érzékenyebbé vált flukonazolra és caspofunginra, a különböző triazol evolvált törzsek mindegyike rezisztenssé vált flukonazolra. A FLU<sup>EVO</sup> és VOR<sup>EVO</sup> törzsek keresztrezisztenciát mutattak flukonazzal és vorikonazzal szemben, azonban posakonazzal és itraconazzal szemben nem. A POS<sup>EVO</sup> törzs minden azollal szemben erőteljes rezisztenciát mutatott és az összes azollal szemben ez a törzs bírt a legmagasabb MIC értékekkel. Továbbá az echinokandinokkal szembeni MIC értékek a triazol evolvált törzsek közül a POS<sup>EVO</sup> esetén erőteljes emelkedést mutattak. A teljes genomszekvenálásból nyert adatok arra mutattak rá, hogy a FLU<sup>EVO</sup> és VOR<sup>EVO</sup> törzsek keresztrezisztenciáját flukonazolra és vorikonazolra az *Mrr1* funkciónyeréses mutációja következtében fellépő megnövekedett *MDR1* expresszió okozza, míg az összes azollal való keresztrezisztenciát a POS<sup>EVO</sup> törzs esetén az Erg3 funkcióvesztése hozta létre ezt. A megfigyelést a CLIB 214 és POS<sup>EVO</sup> törzsek szterol összetételének összehasonlítása is alátámasztotta. Az azollokkal szembeni érzékenységi adataink és a különböző törzsek rezisztencia mechanizmusai egybevágnak azzal a megfigyeléssel, miszerint a posakonazol az effluxért felelős pumpa fehérjék nem képesek kijuttatni a gombasejtekből.

A *CDR1-2* hiányos *C. parapsilosis* törzs virulenciája *in vitro* és *in vivo* kísérletek alapján is megemelkedett, míg a FLU<sup>EVO</sup> és VOR<sup>EVO</sup> törzsek virulenciája, amelyekben a

rezisztenciát feltehetően az *MDR1* túlműködése okozta, csökkenést mutatott. Ez az eredmény arra utal, hogy a *C. parapsilosis*-ban az efflux pumpák túlzott működése negatívan befolyásolja a gomba fertőzőképességét, míg *C. albicans*-ra ennek éppen az ellenkezője jellemző. A POS<sup>EVO</sup> törzs virulenciája *in vitro* nem mutatott csökkenést a virulenciában, azonban szükségesnek látjuk további *in vivo* kísérletek végrehajtását is.

Az echinokandin evolvált törzsek érzékenységi adatai alapján az adott echinokandinnal történő szelekció meghatározza az antifungális szercsoporton belül az echinokandinok közötti keresztrezisztenciát, mivel a CAS<sup>EVO</sup> és AND<sup>EVO</sup> törzsek mindhárom echinokandinnal szemben rezisztenssé váltak. Ezzel szemben a MIC<sup>EVO</sup> törzsben kizárólag micafunginra alakult ki rezisztencia. Az echinokandinokkal történő direkt szelekció nem befolyásolta az érzékenységet más antifungális szerekre. Az echinokandin evolvált törzsek mindegyikében az Fks1  $\beta$ -1,3-glükán szintáz enzimet kódoló génben történt olyan mutáció, amely a fehérje elsődleges szerkezetében idézett elő változást a szülői törzshöz képest. A különböző evolvált törzsekben létrejött aminosav szubsztitúciók korrelációt mutattak a törzsekben kialakuló keresztrezisztencia meglétével, mivel a CAS<sup>EVO</sup> és AND<sup>EVO</sup> törzsre jellemző W1370R aminosav csere nem volt jelen a MIC<sup>EVO</sup> törzsben, amelyet az L703F jellemezett. Ezek alapján az Fks1-ben létrejövő mutációk pontos helye meghatározza, hogy az adott mutációt hordozó törzs mely echinokandinokkal szemben lesz rezisztens. Az echinokandin evolvált törzsek virulenciája és életképessége egyaránt csökkenést mutatott mindhárom törzs esetében *in vivo* fertőzési modellben, amely feltehetően a sejtek sejtfalában lévő belső réteget alkotó kitin és  $\beta$ -1,3-glükán megnövekedett felszíni megjelenésére volt visszavezethető.

**Eredményeink jelentősen bővítik a *C. parapsilosis* antifungális rezisztenciájának kialakulásában szerepet játszó folyamatokkal kapcsolatos ismereteinket. Bemutattuk, hogy az egyes antifungális szerekkel és szercsoportokkal szemben melyek a fajra jellemző legfontosabb mechanizmusok, valamint azt, hogy ezek milyen befolyással bírnak a gomba virulenciájára és életképességére különböző környezeti körülmények között. Továbbá azt, hogy ezek a megváltozott tulajdonságok a gomba mely életfolyamataiban bekövetkező változásokra vezethetők vissza. Tudomásunk szerint munkánk során először került tanulmányozásra a rezisztencia és a virulencia részletes összefüggéseinek vizsgálata *C. parapsilosis*-ban.**

## 9. Summary

Fungal diseases are becoming increasingly important as their numbers and the size of the affected geographic areas are increasing. Most of these fungi are opportunistic pathogens, as they do not cause abnormalities in healthy individuals, however as the immune system become compromised for any reason these organisms are able to develop disease. Among the genera of the *Candida* genus there are several opportunistic pathogens, of which *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei* and *C. tropicalis* are the most significant. Among the listed species, *C. albicans* is the most important, but in the last decades, the number of infections with other non-*albicans* *Candida* species has also increased to an increasing extent at the expense of *C. albicans*. The most likely reason for this is the widespread use of antifungal agents and the different antifungal sensitivity of different *Candida* species. *C. glabrata* and *C. parapsilosis* are the two species that are most gain relevance at the expense of *C. albicans* caused diseases, which is most probably due to the very frequent resistance of *C. glabrata* to azole type antifungals and the inherently higher echinocandin MIC values of *C. parapsilosis*. The importance of *C. parapsilosis* is further enhanced by the fact that it is one of the most common cause of nosocomial infections, which is contributed by the fact that *C. parapsilosis* is the most commonly isolated yeast from the hands of hospital workers.

In the case of *Candida* species, the number of antifungal agents used is relatively limited, basically polyenes (amphotericin B), triazoles (fluconazole, voriconazole, posaconazole) and echinocandins (caspofungin, anidulafungin, micafungin) are applied in treatment of invasive candidiasis. Polyenes bind to ergosterol that is characteristic of the membrane of the fungus thus removing important steroids from the fungal plasma membrane which ultimately causes damage in life processes of the fungal cell resulting in cell death. Different azoles are inhibiting the ergosterol biosynthesis of fungus and hijacking the biosynthetic pathway to form toxic sterols. Echinocandins inhibit the synthesis of the cell wall of the fungus and thereby prevent the growth and budding of the fungal cells. The effectiveness of antifungal therapy is reduced when the patient is infected with a strain resistant to the applied antifungal agent. The mechanism of resistance is typically characteristic of the given antifungal agent group, so these mechanisms often cause cross resistance to the members of the specific group of agents, but certain mechanisms may also contribute to cross resistance between different groups. The various mechanisms are known primarily from studies with *C. albicans* and *C. glabrata*. The most common cause of

resistance to azoles in these species is the increase in the amount of efflux pump proteins (ABC-transporters, MFS-transporters) in the plasma membrane, but changes in the order of the amino acids of Erg11 enzyme and the loss of function of Erg3 also result in azol resistance. Resistance to polyenes is caused by the amino acid sequence changes in the different enzymes of ergosterol biosynthesis resulting in the formation of alternative sterols other than the ergosterol, to which the polyenes can be attached with significantly less efficacy. Amino acid substitutions in the echinocandin targeted Fks1 enzyme are the most important cause of echinocandin resistance.

In our study we aimed to investigate the development of resistance mechanisms against various triazoles and echinocandins in *C. parapsilosis* and dissect the effect of these mechanisms on fitness and virulence. Thus, we created a *CDR1* and *CDR2* double deletion *C. parapsilosis* strain. *C. parapsilosis* evolved strains were created in the presence of different triazoles and in the presence of different echinocandins (FLU<sup>EVO</sup>, VOR<sup>EVO</sup>, POS<sup>EVO</sup>, CAS<sup>EVO</sup>, AND<sup>EVO</sup>, MIC<sup>EVO</sup>) by direct selection to the resistant phenotype. After the strains were developed we determined the susceptibility of the strains to the most important antifungal agents (amphotericin B, fluconazole, voriconazole, posaconazole, itraconazole, caspofungin, anidulafungin, micafungin). *C. parapsilosis CDR1-2* deletion mutant became more susceptible to fluconazole and caspofungin, and each triazole evolved strain became resistant to fluconazole. The FLU<sup>EVO</sup> and VOR<sup>EVO</sup> strains showed cross resistance to fluconazole and voriconazole, but not posaconazole and itraconazole, the POS<sup>EVO</sup> strain showed strong resistance to all azoles and additionally we detected the highest echinocandin MIC values in the case of this strain among the triazol evolved strains. Data from whole genome sequencing indicate that the cross-resistance of FLU<sup>EVO</sup> and VOR<sup>EVO</sup> strains to fluconazole and voriconazole is caused by the increased *MDR1* expression due to the gain of function mutation in *MRR1*, whereas in the case of the POS<sup>EVO</sup> the Erg3 loss of the function is responsible for the cross-resistance to all azoles, which is supported by the data of comparison of the sterol composition of CLIB 214 and POS<sup>EVO</sup> strains. The sensitivity data to the azoles and the resistance mechanisms of the different strains coincide with the observations in literature that posaconazole is not a substrate for efflux-pump proteins in the fungal cells. The virulence of *CDR1-2* deficient *C. parapsilosis* strain increased in *in vitro* and *in vivo* infection models, while the virulence of FLU<sup>EVO</sup> and VOR<sup>EVO</sup> strains was reduced, in which resistance was presumably due to *MDR1* overexpression. This finding suggests that in *C. parapsilosis* the excessive functioning of efflux pumps negatively influences the fungus ability to survive in the host, whereas in the

case of *C. albicans* this phenomenon is exactly the opposite. The POS<sup>EVO</sup> strain *in vitro* did not show decrease in virulence, however we also must consider necessity to include this strain in further *in vivo* experiments.

Based on the sensitivity data of the echinocandin evolved strains, selection with a specific echinocandin determines the cross resistance to echinocandins within the antifungal agent group as the CAS<sup>EVO</sup> and AND<sup>EVO</sup> strains became resistant to all three echinocandins whereas MIC<sup>EVO</sup> strain was only resistant to micafungin. Direct selection with echinocandins did not affect sensitivity to other antifungal agents. In each of the echinocandin evolved strains, mutations in the gene encoding the Fks1  $\beta$ -1,3-glucan synthase enzyme resulted in amino acid change in the protein relative to the parent strain were the cause of echinocandin resistance, but the amino acid substitutions in the various evolved strains showed correlation with the presence of cross resistance in the strains, since the substitution of W1370R amino acid residue of CAS<sup>EVO</sup> and AND<sup>EVO</sup> strain was not presented in the MIC<sup>EVO</sup> strain which harbored L703F amino acid change. Accordingly, the exact location of the mutations in Fks1 in the resistant, mutation bearing strain determines the resistance to specific echinocandins. Both of virulence and fitness of echinocandin evolved strains decreased during *in vivo* infection in the case of all three echinocandin evolved strains, which may be traced back to the increased exposure of chitin and  $\beta$ -1,3-glucan forming the inner layer of the fungal cell wall.

**Our results significantly increased the knowledge of the mechanisms involved in the development of *C. parapsilosis* resistance. It has been shown that with respect to certain antifungal agents and drug groups which are the most important resistance mechanisms characteristic to the species and how these mechanisms influence the virulence and viability of the fungus under different conditions. We also examined how these changed properties could be traced back to different life processes. To our best knowledge, we were the first, who studied the detailed correlations between resistance and virulence in *C. parapsilosis*.**

## 10. Irodalomjegyzék

- Abe, F., Usui, K., Hiraki, T.  
2009 Fluconazole modulates membrane rigidity, heterogeneity, and water penetration into the plasma membrane in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* 48(36):8494-504.
- Akins, R. A.  
2005 An update on antifungal targets and mechanisms of resistance in *Candida albicans*. *Med Mycol* 43(4):285-318.
- Anderson, J. B.  
2005 Evolution of antifungal-drug resistance: mechanisms and pathogen fitness. *Nat Rev Microbiol* 3(7):547-56.
- Anderson, T. M., Clay, M. C., Cioffi, A. G., Diaz, K. A., Hisao, G. S., és mtsi.  
2014 Amphotericin forms an extramembranous and fungicidal sterol sponge. *Nat Chem Biol* 10(5):400-6.
- Armstrong, P. A., Jackson, B. R., Haselow, D., Fields, V., Ireland, M., és mtsi.  
2018 Multistate Epidemiology of Histoplasmosis, United States, 2011-2014. *Emerg Infect Dis* 24(3):425-431.
- Bal, A. M.  
2010 The echinocandins: three useful choices or three too many? *Int J Antimicrob Agents* 35(1):13-8.
- Ballot, D. E., Bosman, N., Nana, T., Ramdin, T., Cooper, P. A.  
2013 Background changing patterns of neonatal fungal sepsis in a developing country. *J Trop Pediatr* 59(6):460-4.
- Ben-Ami, R., Garcia-Effron, G., Lewis, R. E., Gamarra, S., Leventakos, K., és mtsi.  
2011 Fitness and virulence costs of *Candida albicans* *FKSI* hot spot mutations associated with echinocandin resistance. *J Infect Dis* 204(4):626-35.
- Ben-Ami, R., Kontoyiannis, D. P.  
2012 Resistance to echinocandins comes at a cost: the impact of *FKSI* hotspot mutations on *Candida albicans* fitness and virulence. *Virulence* 3(1):95-7.
- Bertini, A., De Bernardis, F., Hensgens, L. A., Sandini, S., Senesi, S., és mtsi.  
2013 Comparison of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* adhesive properties and pathogenicity. *Int J Med Microbiol* 303(2):98-103.
- Bolger, A. M., Lohse, M., Usadel, B.  
2014 Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30(15):2114-20.
- Borghi, E., Andreoni, S., Cirasola, D., Ricucci, V., Sciota, R., és mtsi.  
2014 Antifungal resistance does not necessarily affect *Candida glabrata* fitness. *J Chemother* 26(1):32-6.
- Branco, J., Silva, A. P., Silva, R. M., Silva-Dias, A., Pina-Vaz, C., és mtsi.  
2015 Fluconazole and Voriconazole Resistance in *Candida parapsilosis* Is Conferred by Gain-of-Function Mutations in *MRR1* Transcription Factor Gene. *Antimicrob Agents Chemother* 59(10):6629-33.
- Brown, G. D., Denning, D. W., Gow, N. A., Levitz, S. M., Netea, M. G., és mtsi.  
2012 Hidden killers: human fungal infections. *Sci Transl Med* 4(165):165rv13.
- Brunke, S., Hube, B.  
2013 Two unlike cousins: *Candida albicans* and *C. glabrata* infection strategies. *Cell Microbiol* 15(5):701-8.
- Butler, G., Rasmussen, M. D., Lin, M. F., Santos, M. A., Sakthikumar, S., és mtsi.

- 2009 Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. *Nature* 459(7247):657-62.
- Cabib, E., Duran, A.  
2005 Synthase III-dependent chitin is bound to different acceptors depending on location on the cell wall of budding yeast. *J Biol Chem* 280(10):9170-9.
- Cannon, R. D., Lamping, E., Holmes, A. R., Niimi, K., Baret, P. V., és mtsi.  
2009 Efflux-mediated antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev* 22(2):291-321, Table of Contents.
- Chamany, S., Mirza, S. A., Fleming, J. W., Howell, J. F., Lenhart, S. W., és mtsi.  
2004 A large histoplasmosis outbreak among high school students in Indiana, 2001. *Pediatr Infect Dis J* 23(10):909-14.
- Chandrasekar, P. H., Sobel, J. D.  
2006 Micafungin: a new echinocandin. *Clin Infect Dis* 42(8):1171-8.
- Chen, L. M., Xu, Y. H., Zhou, C. L., Zhao, J., Li, C. Y., és mtsi.  
2010 Overexpression of *CDR1* and *CDR2* genes plays an important role in fluconazole resistance in *Candida albicans* with G487T and T916C mutations. *J Int Med Res* 38(2):536-45.
- Chen, S. C., Slavin, M. A., Sorrell, T. C.  
2011 Echinocandin antifungal drugs in fungal infections: a comparison. *Drugs* 71(1):11-41.
- CLSI  
2008 Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard-Third Edition. CLSI document M27-A3 (ISBN 1-56238-666-2) Wayne, PA, USA: Clinical and Laboratory Standard Institute.
- Coleman, J. J., Mylonakis, E.  
2009 Efflux in fungi: la piece de resistance. *PLoS Pathog* 5(6):e1000486.
- Colombo, A. L., Tobon, A., Restrepo, A., Queiroz-Telles, F., Nucci, M.  
2011 Epidemiology of endemic systemic fungal infections in Latin America. *Med Mycol* 49(8):785-98.
- Cornely, O. A., Maertens, J., Winston, D. J., Perfect, J., Ullmann, A. J., és mtsi.  
2007 Posaconazole vs. fluconazole or itraconazole prophylaxis in patients with neutropenia. *N Engl J Med* 356(4):348-59.
- Costa-de-Oliveira, S., Marcos Miranda, I., Silva, R. M., Pinto, E. Silva A., Rocha, R., és mtsi.  
2011 *FKS2* mutations associated with decreased echinocandin susceptibility of *Candida glabrata* following anidulafungin therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 55(3):1312-4.
- Coste, A., Turner, V., Ischer, F., Morschhauser, J., Forche, A., és mtsi.  
2006 A mutation in *Tac1p*, a transcription factor regulating *CDR1* and *CDR2*, is coupled with loss of heterozygosity at chromosome 5 to mediate antifungal resistance in *Candida albicans*. *Genetics* 172(4):2139-56.
- Cowen, L. E., Lindquist, S.  
2005 Hsp90 potentiates the rapid evolution of new traits: drug resistance in diverse fungi. *Science* 309(5744):2185-9.
- Cowen, L. E., Sanglard, D., Howard, S. J., Rogers, P. D., Perlin, D. S.  
2014 Mechanisms of Antifungal Drug Resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med* 5(7):a019752.
- Cuenca-Estrella, M., Rodriguez, D., Almirante, B., Morgan, J., Planes, A. M., és mtsi.

- 2005 *In vitro* susceptibilities of bloodstream isolates of *Candida* species to six antifungal agents: results from a population-based active surveillance programme, Barcelona, Spain, 2002-2003. *J Antimicrob Chemother* 55(2):194-9.
- Da Silva, C. A., Chalouni, C., Williams, A., Hartl, D., Lee, C. G., és mtsi.  
2009 Chitin is a size-dependent regulator of macrophage TNF and IL-10 production. *J Immunol* 182(6):3573-82.
- Delarze, E., Sanglard, D.  
2015 Defining the frontiers between antifungal resistance, tolerance and the concept of persistence. *Drug Resist Updat* 23:12-19.
- Denning, D. W.  
2003 Echinocandin antifungal drugs. *Lancet* 362(9390):1142-51.
- Denning, D. W., Pleuvry, A., Cole, D. C.  
2011 Global burden of chronic pulmonary aspergillosis as a sequel to pulmonary tuberculosis. *Bull World Health Organ* 89(12):864-72.
- Denning, D. W., Pleuvry, A., Cole, D. C.  
2013a Global burden of allergic bronchopulmonary aspergillosis with asthma and its complication chronic pulmonary aspergillosis in adults. *Med Mycol* 51(4):361-70.
- Denning, D. W., Pleuvry, A., Cole, D. C.  
2013b Global burden of chronic pulmonary aspergillosis complicating sarcoidosis. *Eur Respir J* 41(3):621-6.
- Diaz, C., Schroit, A. J.  
1996 Role of translocases in the generation of phosphatidylserine asymmetry. *J Membr Biol* 151(1):1-9.
- Dibble, C. C., Manning, B. D.  
2013 Signal integration by mTORC1 coordinates nutrient input with biosynthetic output. *Nat Cell Biol* 15(6):555-64.
- Diekema, D., Arbefeville, S., Boyken, L., Kroeger, J., Pfaller, M.  
2012 The changing epidemiology of healthcare-associated candidemia over three decades. *Diagn Microbiol Infect Dis* 73(1):45-8.
- Dunkel, N., Liu, T. T., Barker, K. S., Homayouni, R., Morschhauser, J., és mtsi.  
2008 A gain-of-function mutation in the transcription factor Upc2p causes upregulation of ergosterol biosynthesis genes and increased fluconazole resistance in a clinical *Candida albicans* isolate. *Eukaryot Cell* 7(7):1180-90.
- Dupont, S., Lemetais, G., Ferreira, T., Cayot, P., Gervais, P., és mtsi.  
2012 Ergosterol biosynthesis: a fungal pathway for life on land? *Evolution* 66(9):2961-8.
- Eddouzi, J., Parker, J. E., Vale-Silva, L. A., Coste, A., Ischer, F., és mtsi.  
2013 Molecular mechanisms of drug resistance in clinical *Candida* species isolated from Tunisian hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 57(7):3182-93.
- Egner, R., Mahe, Y., Pandjaitan, R., Kuchler, K.  
1995 Endocytosis and vacuolar degradation of the plasma membrane-localized Pdr5 ATP-binding cassette multidrug transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 15(11):5879-87.
- Erwig, L. P., Gow, N. A.  
2016 Interactions of fungal pathogens with phagocytes. *Nat Rev Microbiol* 14(3):163-76.
- Estrada-Mata, E., Navarro-Arias, M. J., Perez-Garcia, L. A., Mellado-Mojica, E., Lopez, M. G., és mtsi.



- 2015 Members of the *Candida parapsilosis* Complex and *Candida albicans* are Differentially Recognized by Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Front Microbiol* 6:1527.
- Fanos, V., Cataldi, L.  
2000 Amphotericin B-induced nephrotoxicity: a review. *J Chemother* 12(6):463-70.
- Fell, J. W., Meyer, S. A.  
1967 Systematics of yeast species in the *Candida parapsilosis* group. *Mycopathol Mycol Appl* 32(3):177-93.
- Fitzpatrick, D. A., Logue, M. E., Stajich, J. E., Butler, G.  
2006 A fungal phylogeny based on 42 complete genomes derived from supertree and combined gene analysis. *BMC Evol Biol* 6:99.
- Flowers, S. A., Barker, K. S., Berkow, E. L., Toner, G., Chadwick, S. G., és mtsi.  
2012 Gain-of-function mutations in *UPC2* are a frequent cause of *ERG11* upregulation in azole-resistant clinical isolates of *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* 11(10):1289-99.
- Fraser, V. J., Jones, M., Dunkel, J., Storfer, S., Medoff, G., és mtsi.  
1992 Candidemia in a tertiary care hospital: epidemiology, risk factors, and predictors of mortality. *Clin Infect Dis* 15(3):414-21.
- Freifeld, A. G., Bow, E. J., Sepkowitz, K. A., Boeckh, M. J., Ito, J. I., és mtsi.  
2011 Clinical practice guideline for the use of antimicrobial agents in neutropenic patients with cancer: 2010 update by the infectious diseases society of america. *Clin Infect Dis* 52(4):e56-93.
- Freihofer, P., Akbergenov, R., Teo, Y., Juskeviciene, R., Andersson, D. I., és mtsi.  
2016 Nonmutational compensation of the fitness cost of antibiotic resistance in mycobacteria by overexpression of tlyA rRNA methylase. *RNA* 22(12):1836-1843.
- 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(1):117-21.
- Gacser, A., Trofa, D., Schafer, W., Nosanchuk, J. D.  
2007 Targeted gene deletion in *Candida parapsilosis* demonstrates the role of secreted lipase in virulence. *J Clin Invest* 117(10):3049-58.
- Gafter-Gvili, A., Vidal, L., Goldberg, E., Leibovici, L., Paul, M.  
2008 Treatment of invasive candidal infections: systematic review and meta-analysis. *Mayo Clin Proc* 83(9):1011-21.
- Gantner, B. N., Simmons, R. M., Underhill, D. M.  
2005 Dectin-1 mediates macrophage recognition of *Candida albicans* yeast but not filaments. *EMBO J* 24(6):1277-86.
- Garcia-Effron, G., Katiyar, S. K., Park, S., Edlind, T. D., Perlin, D. S.  
2008 A naturally occurring proline-to-alanine amino acid change in Fks1p in *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* accounts for reduced echinocandin susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother* 52(7):2305-12.
- Garcia-Effron, G., Lee, S., Park, S., Cleary, J. D., Perlin, D. S.  
2009a Effect of *Candida glabrata* *FKS1* and *FKS2* mutations on echinocandin sensitivity and kinetics of 1,3-beta-D-glucan synthase: implication for the existing susceptibility breakpoint. *Antimicrob Agents Chemother* 53(9):3690-9.
- Garcia-Effron, G., Park, S., Perlin, D. S.  
2009b Correlating echinocandin MIC and kinetic inhibition of fks1 mutant glucan synthases for *Candida albicans*: implications for interpretive breakpoints. *Antimicrob Agents Chemother* 53(1):112-22.

- Garcia-Solache, M. A., Casadevall, A.  
2010 Global warming will bring new fungal diseases for mammals. *MBio* 1(1).
- Garrison, E, Marth, G  
2012 Haplotype-based variant detection from short-read sequencing. arXiv:1207.3907 [q-bio.GN].
- Gow, N. A., van de Veerdonk, F. L., Brown, A. J., Netea, M. G.  
2011 *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. *Nat Rev Microbiol* 10(2):112-22.
- Graham, L. M., Tsoni, S. V., Willment, J. A., Williams, D. L., Taylor, P. R., és mtsi.  
2006 Soluble Dectin-1 as a tool to detect beta-glucans. *J Immunol Methods* 314(1-2):164-9.
- Gruszecki, W. I., Gagos, M., Herec, M., Kernen, P.  
2003 Organization of antibiotic amphotericin B in model lipid membranes. A mini review. *Cell Mol Biol Lett* 8(1):161-70.
- Hall, R. A., Gow, N. A.  
2013 Mannosylation in *Candida albicans*: role in cell wall function and immune recognition. *Mol Microbiol* 90(6):1147-61.
- Handel, N., Schuurmans, J. M., Brul, S., ter Kuile, B. H.  
2013 Compensation of the metabolic costs of antibiotic resistance by physiological adaptation in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 57(8):3752-62.
- Hawksworth, D. L., Lucking, R.  
2017 Fungal Diversity Revisited: 2.2 to 3.8 Million Species. *Microbiol Spectr* 5(4).
- Healey, K. R., Zhao, Y., Perez, W. B., Lockhart, S. R., Sobel, J. D., és mtsi.  
2016 Prevalent mutator genotype identified in fungal pathogen *Candida glabrata* promotes multi-drug resistance. *Nat Commun* 7:11128.
- Heilmann, C. J., Schneider, S., Barker, K. S., Rogers, P. D., Morschhauser, J.  
2010 An A643T mutation in the transcription factor Upc2p causes constitutive *ERG11* upregulation and increased fluconazole resistance in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 54(1):353-9.
- Hidron, A. I., Edwards, J. R., Patel, J., Horan, T. C., Sievert, D. M., és mtsi.  
2008 NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007. *Infect Control Hosp Epidemiol* 29(11):996-1011.
- Hull, C. M., Bader, O., Parker, J. E., Weig, M., Gross, U., és mtsi.  
2012 Two clinical isolates of *Candida glabrata* exhibiting reduced sensitivity to amphotericin B both harbor mutations in *ERG2*. *Antimicrob Agents Chemother* 56(12):6417-21.
- Jiang, C., Dong, D., Yu, B., Cai, G., Wang, X., és mtsi.  
2013 Mechanisms of azole resistance in 52 clinical isolates of *Candida tropicalis* in China. *J Antimicrob Chemother* 68(4):778-85.
- Johnson, M. E., Edlind, T. D.  
2012 Topological and mutational analysis of *Saccharomyces cerevisiae* Fks1. *Eukaryot Cell* 11(7):952-60.
- Johnson, M. E., Katiyar, S. K., Edlind, T. D.  
2011 New Fks hot spot for acquired echinocandin resistance in *Saccharomyces cerevisiae* and its contribution to intrinsic resistance of *Scedosporium species*. *Antimicrob Agents Chemother* 55(8):3774-81.
- Katiyar, S. K., Alastruey-Izquierdo, A., Healey, K. R., Johnson, M. E., Perlin, D. S., és mtsi.

- 2012 Fks1 and Fks2 are functionally redundant but differentially regulated in *Candida glabrata*: implications for echinocandin resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 56(12):6304-9.
- Kofteridis, D. P., Lewis, R. E., Kontoyiannis, D. P.  
2010 Caspofungin-non-susceptible *Candida* isolates in cancer patients. *J Antimicrob Chemother* 65(2):293-5.
- Kontoyiannis, D. P., Marr, K. A., Park, B. J., Alexander, B. D., Anaissie, E. J., és mtsi.  
2010 Prospective surveillance for invasive fungal infections in hematopoietic stem cell transplant recipients, 2001-2006: overview of the Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET) Database. *Clin Infect Dis* 50(8):1091-100.
- Kreusch, A., Karstaedt, A. S.  
2013 Candidemia among adults in Soweto, South Africa, 1990-2007. *Int J Infect Dis* 17(8):e621-3.
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G., Sonnhammer, E. L.  
2001 Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol* 305(3):567-80.
- LaFayette, S. L., Collins, C., Zaas, A. K., Schell, W. A., Betancourt-Quiroz, M., és mtsi.  
2010 PKC signaling regulates drug resistance of the fungal pathogen *Candida albicans* via circuitry comprised of Mkc1, calcineurin, and Hsp90. *PLoS Pathog* 6(8):e1001069.
- Laffey, S. F., Butler, G.  
2005 Phenotype switching affects biofilm formation by *Candida parapsilosis*. *Microbiology* 151(Pt 4):1073-81.
- Lenardon, M. D., Munro, C. A., Gow, N. A.  
2010 Chitin synthesis and fungal pathogenesis. *Curr Opin Microbiol* 13(4):416-23.
- Lesage, G., Bussey, H.  
2006 Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 70(2):317-43.
- Li, H  
2013 Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM. arXiv:1303.3997v1 [q-bio.GN].
- Li, X., Brown, N., Chau, A. S., Lopez-Ribot, J. L., Ruesga, M. T., és mtsi.  
2004 Changes in susceptibility to posaconazole in clinical isolates of *Candida albicans*. *J Antimicrob Chemother* 53(1):74-80.
- Liu, T. T., Znaidi, S., Barker, K. S., Xu, L., Homayouni, R., és mtsi.  
2007 Genome-wide expression and location analyses of the *Candida albicans* Tac1p regulon. *Eukaryot Cell* 6(11):2122-38.
- Logue, M. E., Wong, S., Wolfe, K. H., Butler, G.  
2005 A genome sequence survey shows that the pathogenic yeast *Candida parapsilosis* has a defective *MTLa1* allele at its mating type locus. *Eukaryot Cell* 4(6):1009-17.
- Lupetti, A., Danesi, R., Campa, M., Del Tacca, M., Kelly, S.  
2002a Molecular basis of resistance to azole antifungals. *Trends Mol Med* 8(2):76-81.
- Lupetti, A., Tavanti, A., Davini, P., Ghelardi, E., Corsini, V., és mtsi.  
2002b Horizontal transmission of *Candida parapsilosis* candidemia in a neonatal intensive care unit. *J Clin Microbiol* 40(7):2363-9.
- Marakalala, M. J., Vautier, S., Potrykus, J., Walker, L. A., Shepardson, K. M., és mtsi.

- 2013 Differential adaptation of *Candida albicans in vivo* modulates immune recognition by dectin-1. *PLoS Pathog* 9(4):e1003315.
- Martel, C. M., Parker, J. E., Bader, O., Weig, M., Gross, U., és mtsi.  
2010a A clinical isolate of *Candida albicans* with mutations in *ERG11* (encoding sterol 14 $\alpha$ -demethylase) and *ERG5* (encoding C22 desaturase) is cross resistant to azoles and amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother* 54(9):3578-83.
- Martel, C. M., Parker, J. E., Bader, O., Weig, M., Gross, U., és mtsi.  
2010b Identification and characterization of four azole-resistant *erg3* mutants of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 54(11):4527-33.
- Martin, D. E., Hall, M. N.  
2005 The expanding TOR signaling network. *Curr Opin Cell Biol* 17(2):158-66.
- Martin, S. W., Konopka, J. B.  
2004 Lipid raft polarization contributes to hyphal growth in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* 3(3):675-84.
- Milewski, S., Mignini, F., Prasad, R., Borowski, E.  
2001 Unusual susceptibility of a multidrug-resistant yeast strain to peptidic antifungals. *Antimicrob Agents Chemother* 45(1):223-8.
- Mirza, S. A., Phelan, M., Rimland, D., Graviss, E., Hamill, R., és mtsi.  
2003 The changing epidemiology of cryptococcosis: an update from population-based active surveillance in 2 large metropolitan areas, 1992-2000. *Clin Infect Dis* 36(6):789-94.
- Mora-Montes, H. M., Bates, S., Netea, M. G., Diaz-Jimenez, D. F., Lopez-Romero, E., és mtsi.  
2007 Endoplasmic reticulum alpha-glycosidases of *Candida albicans* are required for N glycosylation, cell wall integrity, and normal host-fungus interaction. *Eukaryot Cell* 6(12):2184-93.
- Mora-Montes, H. M., Netea, M. G., Ferwerda, G., Lenardon, M. D., Brown, G. D., és mtsi.  
2011 Recognition and blocking of innate immunity cells by *Candida albicans* chitin. *Infect Immun* 79(5):1961-70.
- Moran, C., Grussemeier, C. A., Spalding, J. R., Benjamin, D. K., Jr., Reed, S. D.  
2009 *Candida albicans* and non-*albicans* bloodstream infections in adult and pediatric patients: comparison of mortality and costs. *Pediatr Infect Dis J* 28(5):433-5.
- Morio, F., Loge, C., Besse, B., Hennequin, C., Le Pape, P.  
2010 Screening for amino acid substitutions in the *Candida albicans* Erg11 protein of azole-susceptible and azole-resistant clinical isolates: new substitutions and a review of the literature. *Diagn Microbiol Infect Dis* 66(4):373-84.
- Morschhauser, J., Barker, K. S., Liu, T. T., Bla, B. Warmuth J., Homayouni, R., és mtsi.  
2007 The transcription factor Mrr1p controls expression of the *MDR1* efflux pump and mediates multidrug resistance in *Candida albicans*. *PLoS Pathog* 3(11):e164.
- Munro, C. A., Gow, N. A.  
2001 Chitin synthesis in human pathogenic fungi. *Med Mycol* 39 Suppl 1:41-53.
- Muskett, H., Shahin, J., Eyres, G., Harvey, S., Rowan, K., és mtsi.  
2011 Risk factors for invasive fungal disease in critically ill adult patients: a systematic review. *Crit Care* 15(6):R287.
- Nawrot, U., Pajaczowska, M., Fleischer, M., Przondo-Mordarska, H., Samet, A., és mtsi.  
2013 Candidaemia in polish hospitals - a multicentre survey. *Mycoses* 56(5):576-81.
- Nemeth, T., Toth, A., Szenzenstein, J., Horvath, P., Nosanchuk, J. D., és mtsi.

- 2013 Characterization of virulence properties in the *C. parapsilosis sensu lato* species. PLoS One 8(7):e68704.
- Netea, M. G., Brown, G. D., Kullberg, B. J., Gow, N. A.  
2008 An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. Nat Rev Microbiol 6(1):67-78.
- Nguyen, M. H., Peacock, J. E., Jr., Tanner, D. C., Morris, A. J., Nguyen, M. L., és mtsi.  
1995 Therapeutic approaches in patients with candidemia. Evaluation in a multicenter, prospective, observational study. Arch Intern Med 155(22):2429-35.
- Nosek, J., Holesova, Z., Kosa, P., Gacser, A., Tomaska, L.  
2009 Biology and genetics of the pathogenic yeast *Candida parapsilosis*. Curr Genet 55(5):497-509.
- Nucci, M., Colombo, A. L., Silveira, F., Richtmann, R., Salomao, R., és mtsi.  
1998 Risk factors for death in patients with candidemia. Infect Control Hosp Epidemiol 19(11):846-50.
- Nucci, M., Queiroz-Telles, F., Alvarado-Matute, T., Tiraboschi, I. N., Cortes, J., és mtsi.  
2013 Epidemiology of candidemia in Latin America: a laboratory-based survey. PLoS One 8(3):e59373.
- Odds, F. C., Brown, A. J., Gow, N. A.  
2003 Antifungal agents: mechanisms of action. Trends Microbiol 11(6):272-9.
- Orlean, P.  
2012 Architecture and biosynthesis of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. Genetics 192(3):775-818.
- Orozco, A. S., Higginbotham, L. M., Hitchcock, C. A., Parkinson, T., Falconer, D., és mtsi.  
1998 Mechanism of fluconazole resistance in *Candida krusei*. Antimicrob Agents Chemother 42(10):2645-9.
- Ostrosky-Zeichner, L., Casadevall, A., Galgiani, J. N., Odds, F. C., Rex, J. H.  
2010 An insight into the antifungal pipeline: selected new molecules and beyond. Nat Rev Drug Discov 9(9):719-27.
- Pammi, M., Holland, L., Butler, G., Gacser, A., Bliss, J. M.  
2013 *Candida parapsilosis* is a significant neonatal pathogen: a systematic review and meta-analysis. Pediatr Infect Dis J 32(5):e206-16.
- Pappas, P. G., Kauffman, C. A., Andes, D. R., Clancy, C. J., Marr, K. A., és mtsi.  
2016 Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis 62(4):e1-50.
- Patil, A., Majumdar, S.  
2017 Echinocandins in antifungal pharmacotherapy. J Pharm Pharmacol 69(12):1635-1660.
- Perea, S., Lopez-Ribot, J. L., Kirkpatrick, W. R., McAtee, R. K., Santillan, R. A., és mtsi.  
2001 Prevalence of molecular mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* strains displaying high-level fluconazole resistance isolated from human immunodeficiency virus-infected patients. Antimicrob Agents Chemother 45(10):2676-84.
- Perlin, D. S.  
2011 Current perspectives on echinocandin class drugs. Future Microbiol 6(4):441-57.
- Perlin, D. S.  
2015 Mechanisms of echinocandin antifungal drug resistance. Ann N Y Acad Sci 1354:1-11.
- Perlroth, J., Choi, B., Spellberg, B.

- 2007 Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis, and treatment. *Med Mycol* 45(4):321-46.
- Pfaller, M. A., Castanheira, M., Lockhart, S. R., Ahlquist, A. M., Messer, S. A., és mtsi.  
2012 Frequency of decreased susceptibility and resistance to echinocandins among fluconazole-resistant bloodstream isolates of *Candida glabrata*. *J Clin Microbiol* 50(4):1199-203.
- Pfaller, M. A., Castanheira, M., Messer, S. A., Moet, G. J., Jones, R. N.  
2010a Variation in *Candida* spp. distribution and antifungal resistance rates among bloodstream infection isolates by patient age: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008-2009). *Diagn Microbiol Infect Dis* 68(3):278-83.
- Pfaller, M. A., Diekema, D. J.  
2004 Twelve years of fluconazole in clinical practice: global trends in species distribution and fluconazole susceptibility of bloodstream isolates of *Candida*. *Clin Microbiol Infect* 10 Suppl 1:11-23.
- Pfaller, M. A., Diekema, D. J.  
2007 Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* 20(1):133-63.
- Pfaller, M. A., Diekema, D. J., Gibbs, D. L., Newell, V. A., Ellis, D., és mtsi.  
2010b Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: a 10.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* Species to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion. *J Clin Microbiol* 48(4):1366-77.
- Pfaller, M. A., Diekema, D. J., Messer, S. A., Boyken, L., Hollis, R. J.  
2003 Activities of fluconazole and voriconazole against 1,586 recent clinical isolates of *Candida* species determined by Broth microdilution, disk diffusion, and Etest methods: report from the ARTEMIS Global Antifungal Susceptibility Program, 2001. *J Clin Microbiol* 41(4):1440-6.
- Pfaller, M. A., Messer, S. A., Boyken, L., Tendolkar, S., Hollis, R. J., és mtsi.  
2008 Selection of a surrogate agent (fluconazole or voriconazole) for initial susceptibility testing of posaconazole against *Candida* spp.: results from a global antifungal surveillance program. *J Clin Microbiol* 46(2):551-9.
- Pfaller, M. A., Moet, G. J., Messer, S. A., Jones, R. N., Castanheira, M.  
2011 *Candida* bloodstream infections: comparison of species distributions and antifungal resistance patterns in community-onset and nosocomial isolates in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2008-2009. *Antimicrob Agents Chemother* 55(2):561-6.
- Pinhati, H. M., Casulari, L. A., Souza, A. C., Siqueira, R. A., Damasceno, C. M., és mtsi.  
2016 Outbreak of candidemia caused by fluconazole resistant *Candida parapsilosis* strains in an intensive care unit. *BMC Infect Dis* 16(1):433.
- Prasad, R., Goffeau, A.  
2012 Yeast ATP-binding cassette transporters conferring multidrug resistance. *Annu Rev Microbiol* 66:39-63.
- Pryszcz, L. P., Nemeth, T., Gacser, A., Gabaldon, T.  
2013 Unexpected genomic variability in clinical and environmental strains of the pathogenic yeast *Candida parapsilosis*. *Genome Biol Evol* 5(12):2382-92.
- Puig-Asensio, M., Padilla, B., Garnacho-Montero, J., Zaragoza, O., Aguado, J. M., és mtsi.  
2014 Epidemiology and predictive factors for early and late mortality in *Candida* bloodstream infections: a population-based surveillance in Spain. *Clin Microbiol Infect* 20(4):O245-54.

- Rajasingham, R., Smith, R. M., Park, B. J., Jarvis, J. N., Govender, N. P., és mtsi.  
2017 Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. *Lancet Infect Dis* 17(8):873-881.
- Rella, A., Farnoud, A. M., Del Poeta, M.  
2016 Plasma membrane lipids and their role in fungal virulence. *Prog Lipid Res* 61:63-72.
- Robbins, N., Caplan, T., Cowen, L. E.  
2017 Molecular Evolution of Antifungal Drug Resistance. *Annu Rev Microbiol* 71:753-775.
- Robbins, N., Wright, G. D., Cowen, L. E.  
2016 Antifungal Drugs: The Current Armamentarium and Development of New Agents. *Microbiol Spectr* 4(5).
- Robenshtok, E., Gafter-Gvili, A., Goldberg, E., Weinberger, M., Yeshurun, M., és mtsi.  
2007 Antifungal prophylaxis in cancer patients after chemotherapy or hematopoietic stem-cell transplantation: systematic review and meta-analysis. *J Clin Oncol* 25(34):5471-89.
- Romani, L., Montagnoli, C., Bozza, S., Perruccio, K., Spreca, A., és mtsi.  
2004 The exploitation of distinct recognition receptors in dendritic cells determines the full range of host immune relationships with *Candida albicans*. *Int Immunol* 16(1):149-61.
- Rosenberger, C. M., Gallo, R. L., Finlay, B. B.  
2004 Interplay between antibacterial effectors: a macrophage antimicrobial peptide impairs intracellular *Salmonella* replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(8):2422-7.
- Ruhnke, M.  
2006 Epidemiology of *Candida albicans* infections and role of non-*Candida albicans* yeasts. *Curr Drug Targets* 7(4):495-504.
- Sanglard, D., Coste, A., Ferrari, S.  
2009 Antifungal drug resistance mechanisms in fungal pathogens from the perspective of transcriptional gene regulation. *FEMS Yeast Res* 9(7):1029-50.
- Sanglard, D., Ischer, F., Parkinson, T., Falconer, D., Bille, J.  
2003 *Candida albicans* mutations in the ergosterol biosynthetic pathway and resistance to several antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother* 47(8):2404-12.
- Sasse, C., Dunkel, N., Schafer, T., Schneider, S., Dierolf, F., és mtsi.  
2012 The stepwise acquisition of fluconazole resistance mutations causes a gradual loss of fitness in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* 86(3):539-56.
- Saville, S. P., Lazzell, A. L., Monteagudo, C., Lopez-Ribot, J. L.  
2003 Engineered control of cell morphology *in vivo* reveals distinct roles for yeast and filamentous forms of *Candida albicans* during infection. *Eukaryot Cell* 2(5):1053-60.
- Scott, M. G., Rosenberger, C. M., Gold, M. R., Finlay, B. B., Hancock, R. E.  
2000 An alpha-helical cationic antimicrobial peptide selectively modulates macrophage responses to lipopolysaccharide and directly alters macrophage gene expression. *J Immunol* 165(6):3358-65.
- Sellam, A., Tebbji, F., Nantel, A.  
2009 Role of Ndt80p in sterol metabolism regulation and azole resistance in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* 8(8):1174-83.
- Shapiro, R. S., Robbins, N., Cowen, L. E.

- 2011 Regulatory circuitry governing fungal development, drug resistance, and disease. *Microbiol Mol Biol Rev* 75(2):213-67.
- Shekhar-Guturja, T., Gunaherath, G. M., Wijeratne, E. M., Lambert, J. P., Averette, A. F., és mtsi.
- 2016 Dual action antifungal small molecule modulates multidrug efflux and TOR signaling. *Nat Chem Biol* 12(10):867-75.
- Silva, A. P., Miranda, I. M., Guida, A., Synnott, J., Rocha, R., és mtsi.
- 2011 Transcriptional profiling of azole-resistant *Candida parapsilosis* strains. *Antimicrob Agents Chemother* 55(7):3546-56.
- Skrzypek, M. S., Binkley, J., Sherlock, G.
- 2018 Using the *Candida* Genome Database. *Methods Mol Biol* 1757:31-47.
- Smriti, Krishnamurthy, S., Dixit, B. L., Gupta, C. M., Milewski, S., és mtsi.
- 2002 ABC transporters Cdr1p, Cdr2p and Cdr3p of a human pathogen *Candida albicans* are general phospholipid translocators. *Yeast* 19(4):303-18.
- Spellberg, B. J., Filler, S. G., Edwards, J. E., Jr.
- 2006 Current treatment strategies for disseminated candidiasis. *Clin Infect Dis* 42(2):244-51.
- Tavanti, A., Davidson, A. D., Gow, N. A., Maiden, M. C., Odds, F. C.
- 2005 *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. *J Clin Microbiol* 43(1):284-92.
- Taylor, L. H., Latham, S. M., Woolhouse, M. E.
- 2001 Risk factors for human disease emergence. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 356(1411):983-9.
- Tortorano, A. M., Prigitano, A., Lazzarini, C., Passera, M., Deiana, M. L., és mtsi.
- 2013 A 1-year prospective survey of candidemia in Italy and changing epidemiology over one decade. *Infection* 41(3):655-62.
- Toth, R., Toth, A., Papp, C., Jankovics, F., Vagvolgyi, C., és mtsi.
- 2014 Kinetic studies of *Candida parapsilosis* phagocytosis by macrophages and detection of intracellular survival mechanisms. *Front Microbiol* 5:633.
- Toti, F., Schindler, V., Riou, J. F., Lombard-Platet, G., Fressinaud, E., és mtsi.
- 1997 Another link between phospholipid transmembrane migration and ABC transporter gene family, inferred from a rare inherited disorder of phosphatidylserine externalization. *Biochem Biophys Res Commun* 241(2):548-52.
- Trofa, D., Gacser, A., Nosanchuk, J. D.
- 2008 *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. *Clin Microbiol Rev* 21(4):606-25.
- Tsirigos, K. D., Peters, C., Shu, N., Kall, L., Elofsson, A.
- 2015 The TOPCONS web server for consensus prediction of membrane protein topology and signal peptides. *Nucleic Acids Res* 43(W1):W401-7.
- Vandeputte, P., Tronchin, G., Larcher, G., Ernoult, E., Berges, T., és mtsi.
- 2008 A nonsense mutation in the *ERG6* gene leads to reduced susceptibility to polyenes in a clinical isolate of *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother* 52(10):3701-9.
- Vincent, B. M., Lancaster, A. K., Scherz-Shouval, R., Whitesell, L., Lindquist, S.
- 2013 Fitness trade-offs restrict the evolution of resistance to amphotericin B. *PLoS Biol* 11(10):e1001692.
- Weete, J. D., Abril, M., Blackwell, M.
- 2010 Phylogenetic distribution of fungal sterols. *PLoS One* 5(5):e10899.
- White, T. C., Marr, K. A., Bowden, R. A.



- 1998 Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev* 11(2):382-402.
- Wiederhold, N. P., Lewis, J. S., 2nd  
2007 The echinocandin micafungin: a review of the pharmacology, spectrum of activity, clinical efficacy and safety. *Expert Opin Pharmacother* 8(8):1155-66.
- Wisplinghoff, H., Bischoff, T., Tallent, S. M., Seifert, H., Wenzel, R. P., és mtsi.  
2004 Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis* 39(3):309-17.
- Yapar, N.  
2014 Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. *Ther Clin Risk Manag* 10:95-105.
- Zonios, D. I., Bennett, J. E.  
2008 Update on azole antifungals. *Semin Respir Crit Care Med* 29(2):198-210.

## 11. Köszönetnyilvánítás

Elsősorban szeretnék köszönetet mondani Prof. Dr. Vágvölgyi Csabának, a Szegedi Tudományegyetem Természettudományi és Informatikai Kar Mikrobiológiai Tanszék vezetőjének, hogy munkámat szakdolgozó és doktorandusz hallgatói éveim alatt is a tanszéken végezhettem.

Köszönöm továbbá témavezetőmnek, Prof. Dr. Gácsér Attilának, hogy a csoportjának tagja lehetek már egészen szakdolgozó koromtól kezdve, biztosítva ezzel a biológia tudomány műveléséhez nélkülözhetetlen alapokat, valamint köszönettel tartozom azért, hogy lehetőséget biztosított számomra, hogy tudományos munkát végezhessek külföldi kollaborátoraink laborjaiban.

Accordingly, I would like to thank to our foreigner collaborators Joshua D. Nosanchuk and Leonardo Nimrichter for the opportunity to work in their laboratory. That unique experiences gave me the ability to work completely independently and to lay out own independent research plans.

I also would like to thank to Toni Gabaldon and Hector Mora Montes for the analysis of whole genome sequencing and for the examination of cell wall composition. Their work gave a great impact to my thesis.

Köszönet illeti Dr. Szekeres Andrást és Dr. Varga Mónikát a szterol összetétel mérésében nyújtott nélkülözhetetlen segítségükért, valamint Dr. Bodai Lászlót a törzsek genomjának szekvenálásáért.

Köszönetet mondanék továbbá Lele Máriának és Deákné Kulcsár Melindának az általuk nyújtott technikai segítségért és azért, hogy mindig fordulhattam hozzájuk segítségért munkával kapcsolatos problémák esetén.

Köszönetemet szeretném kifejezni minden korábbi és jelenlegi kollégámnak: Dr. Tóth Adélnak, Dr. Grózer Zsuzsannának, Dr. Tóth Renátának, Dr. Németh Tibornak, Dr. Horváth Péternek, Dávid Edinának, Szenzenstein Juditnak, Csonka Katalinnak, Pál Sárának, Bohner Flórának, Zajta Eriknek, Vadovics Máténak, Takács Tamásnak, Tanmoy Chakraborty-nak, Dhirend N. Singh-nek, Kocsis Katicának, Bernátsky Reginának, Balla Benediktának, Homolya Mónikának, Molnár Gergőnek, Drabbant Gergőnek, Halmos Emesének, Tasi Zsoltnak, Csikós Máténak és Horváth Mártonnak, hogy segítségemre voltak, amikor szükséges volt és hogy biztosították az egészséges munkavégzéshez nélkülözhetetlen kellemes légkört a laborban.

Köszönet illet még a Mikrobiológiai Tanszék minden munkatársát és azokat is, akik bármilyen módon hozzájárultak munkám sikeréhez.

Szeretném köszönetemet kifejezni családomnak: testvéremnek, anyukámnak, apukámnak, nagyszüleimnek és dédnagyszüleimnek, nagybátyáimnak és nagynénéimnek, unokatestvéreimnek és minden más rokonomnak a támogatást és a lelkesítést mind PhD-s, mind szakdolgozó éveim alatt. Szeretném megköszönni páromnak, Ámon Juditnak a biztatását és hogy elviselte a dolgozat elkészülésével járó mellékhatásokat. Szeretném továbbá köszönetemet kifejezni barátaimnak: Somogyi Gergelynek, Kapás Lilinek, Hevér Dórának és Mikó Péternek, Kormányos Eszternek és Budai Lászlónak, Rózsa Adriennek és Tóth Zoltánnak, valamint családi barátainknak hosszú ideje tartó barátságukat és bátorításukat.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni általános iskolai biológia és kémia tanáraimnak, Karaszné Varga Magdolnának és Oskovics Katalinnak, hogy elindítottak a természettudományok irányába, valamint középiskolai tanáraimnak, Dr. Gál Bélának, Bán Sándornak (biológia, biokémia), Csányi Sándornak (fizika) és Prókai Szilveszternek (kémia), hogy elmélyítették ismereteimet a természettudományok terén és megtanítottak arra a gondolkodásmódra, amely rendkívül fontos a természettudományos munka során.

Jelen kutatás megvalósítása a GINOP-2.3.2-15-2016-00035 és a GINOP-2.3.3-15-2016-00006 azonosító számú kiemelt projektek keretében zajlott.