

OTKA PD 73250 A *Candida parapsilosis* virulenciájának vizsgálata.
Zárójelentés

OTKA PD 73250

***A Candida parapsilosis* virulenciájának vizsgálata**

Zárójelentés

**Gácsér Attila
SZTE TTIK
Mikrobiológiai Tanszék**

**Szeged
2011**

A *Candida parapsilosis* virulenciájának vizsgálata

Az invazív candidémiák általános egészségügyi problémát jelentenek világszerte, az opportunistá patogén *Candida parapsilosis* jelenleg a második-harmadik leggyakrabban izolált fajok közé tartozik [1, 2]. A *C. parapsilosis* elsősorban az intenzív osztályok nozokómiális fertőzéseikért, illetve immunológiailag károsodott páciensek és újszülött csecsemők gombás megbetegedéseikért felelős [2-4]. Annak ellenére, hogy az évek során fokozatosan emelkedik a *Candida* fertőzések esetszáma, és ennek következtében az egészségügyi ellátás anyagi kiadásai is egyre nőnek, meglehetősen keveset tudunk a gomba virulencia faktorairól, a betegség lefolyásáról, illetve a gazda esetleges *C. parapsilosis* specifikus válaszárol. Fontos megjegyezni, hogy a sokkal alaposabban tanulmányozott *C. albicans* vonatkozásában végzett kutatások ugyan iránymutatóak lehetnek, azonban nem helyettesítik a *C. parapsilosis* célzott vizsgálatát. A két faj biológiai jellemzőiben és az általuk kiváltott megbetegedés lefolyásában ugyanis számos és jelentős eltérés mutatkozik. Az emberi szervezetet mint életteret használó opportunistá patogének túlélési stratégiái rendkívül változatosak, így az ellenük történő védekezési mechanizmusok patogén-specifikusságot mutatnak. A *C. parapsilosis* túlélési stratégiáinak egyike, hogy magas glükóz és lipid koncentrációjú közegben is képes túlélni [1, 2]. Klinikai vizsgálatok bizonyítják, hogy az alacsony születési súlyú csecsemők jelentősen érzékenyebbek a *C. parapsilosis* fertőzésekkel szemben, mint a felnőttek [3-6]. A *C. parapsilosis* előfordulási aránya felnőtt candidémiák esetében 12-21% között variál [7], míg ez az arány csecsemők esetében akár 42% [4, 8] is lehet. Még ennél is lényegesebb azonban, hogy a halálozási ráta drasztikusan megemelkedik ez utóbbi korcsoportban. Míg a felnőtt páciensek esetében a halálozási ráta 2-8% [9, 10], addig a csecsemők esetében a *C. parapsilosis* okozta candidémia halálozási rátája a 39%-ot is elérheti [4]. A *C. parapsilosis* által kiváltott megbetegedések nagy része nozokómiális eredetű [2], azaz a fertőzés külső forrásból származik, például az ápolást végző személyzet kezéről. Ez a jelenség egyedi és eltér a *C. albicans* fertőzések endogén eredetétől. Általánosságban a patogén számos olyan tulajdonsággal rendelkezik, amely lehetővé teszi számára az emberi szervezetben történő túlélést és szaporodást. Ezeket a tulajdonságokat virulencia faktoroknak nevezzük. A gazdaszervezet a virulencia faktorok ellen ható mechanizmusok mozgósításával igyekszik eliminálni vagy kordában tartani a mikroba szaporodását. A patogén virulencia faktorainak evolválódása, valamint a gazdaszervezet patogénspecifikus védekező mechanizmusainak kialakulása folyamatos fejlődés alatt áll a gazda és a patogén kölcsönhatásai révén [11]. Opportunistá patogének esetében, a gazdaszervezet

védekező rendszere alkalmas arra, hogy a mikroba szaporodását kontrollálja, a gazda számára károsodást még nem okozó szinten tartsa. Ha ezen egyensúlyi helyzet a gazdaszervezet gyengülése miatt felborul, az teret enged a patogén kóros kolonizációjának, egy betegség kialakulásának, majd végsősoron a mikroba teljes szervezetet érintő disszeminációjának. A kölcsönható rendszerek komponensei, a patogén virulencia faktorai, illetve a gazda védekező rendszerének mechanizmusai. Virulencia faktorok lehetnek a morfológiai dimorfizmusra való képesség (az élesztő formájú növekedésből a hifa vagy pszeudohifa formájú növekedésbe való átalakulás), az adhézio képessége, a szövetekbe történő inváziós képesség, szekretált hidrolitikus enzimek termelése, az immunrendszer támadása elleni védekezés képessége. A gazdaszervezet oldaláról az immunvédekezés a felismerést, a fagocita sejtek mozgósítását, valamint citokinek, illetve egyéb immunmoduláló molekulák (kemokinek, prosztanoidok, prosztaglandinok stb.) termelésével a fagocitózist és végső soron a patogén eliminációját jelenti. A mindkét egyensúlyi helyzetet befolyásoló rendszer komplex és különösen a *C. parapsilosis* vonatkozásában felderítetlen. Mindezek alapján az OTKA PD projekt keretein belül a *C. parapsilosis* virulencia faktorainak szerkezeti és funkcionális vizsgálatát, a gazda-patogén kölcsönhatás elemzését tűztük ki célul.

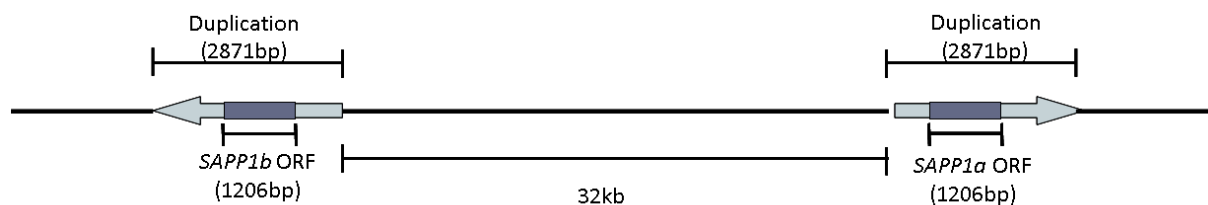
A pályázat célkitűzéseinek megvalósítása:

1. SAPP1a és SAPP1b proteináz gén kiütése a mutánsok jellemzése:

A hidrolitikus enzimek közül a szekretált lipázok, foszfolipázok és savas (aszpartil) proteinázok termelése tölti be a legfontosabb szerepet. A *C. albicans* tíz szekretált aszpartil proteináz (*SAP1-10*) génnel rendelkezik, amelyek által kódolt fehérjék szerepe intenzíven tanulmányozott. Szerepet játszanak a szöveti megtapadás folyamatában, képesek a szöveti integritás megbontására, valamint a komplement rendszer fehérjéit is képesek bontani, ezáltal elősegítik a fertőzés terjedését. *C. parapsilosis* esetén három ortológ aszpartil proteinázt kódoló gént írtak le, ezek a *SAPP1*, *SAPP2*, és a *SAPP3*. Ellentétben a *C. albicans*-sal, *C. parapsilosis* esetén ezek a proteázok kevésbé tanulmányozottak mind a gazda-patogén kölcsönhatás tekintetében, mind a gomba virulenciájában betöltött szerepüket illetően. Ezidáig csupán a Sapp1 valamint a Sapp2 enzimek azok, melyek érése és katalitikus tulajdonságai ismertek. Mindkét fehérje preproenzim formában szintetizálódik, melyeket egy szignál peptidáz hasít, majd szekréció előtt egy újabb hasításon esnek át egy membrán kötött fehérje, a Kex-2 által. Kimutatták, hogy a két enzim közül a szekretált Sapp1 mennyisége egy nagyságrenddel nagyobb a Sapp2-vel összevetve, valamint subsztrátspecifitása és az enzim aktivitása is jóval nagyobb.

Munkánk során a *C. parapsilosis* Sapp1 virulenciában betöltött szerepét tanulmányoztuk. Ezen faktor pontos szerepének megismerése érdekében *SAPP1* deléciós törzseket hoztunk létre.

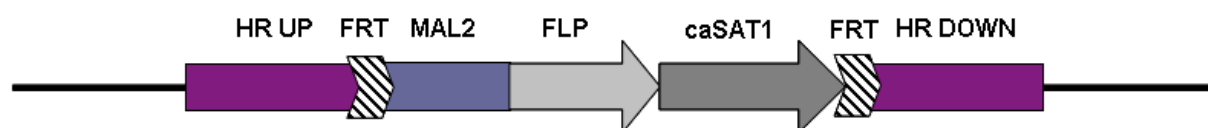
Előzetes *in silico* analízisünk során egy 2871 bp méretű genomi régiót találtunk duplikálódott formában, egymástól 32 kb távolságra, amely régió teljes egészében tartalmazta a *SAPP1* ORF-et, így a két kópiát *SAPP1a* és *SAPP1b* néven különítettük el egymástól (1. ábra).



1. ábra

A *SAPP1a* és *SAPP1b* génkópiák egymáshoz viszonyított helyzete.

A deléciós mutánsok létrehozásához *C. albicans*-ban kifejlesztett, majd *C. parapsilosis*-ra optimalizált *caSAT1* konstrukciót alkalmaztunk. A deléciós konstrukció egy domináns szelektív markert, nourseothricin (NAT) rezisztencia markert tartalmaz. A konstrukció tartalmaz továbbá egy flippáz gént, egy maltózzal indukálható promóter szabályozása alatt. A konstrukció upstream és downstream vége egy-egy FRT motívumot tartalmaz, amely a flippáz enzim specifikus hasítóhelyei. Hogy a deléciós konstrukció specifikus beépülését biztosítani tudjuk, a célzott gén upstream és downstream homológ régióit a deléciós konstrukciónk két végére klónoztuk (2. ábra).

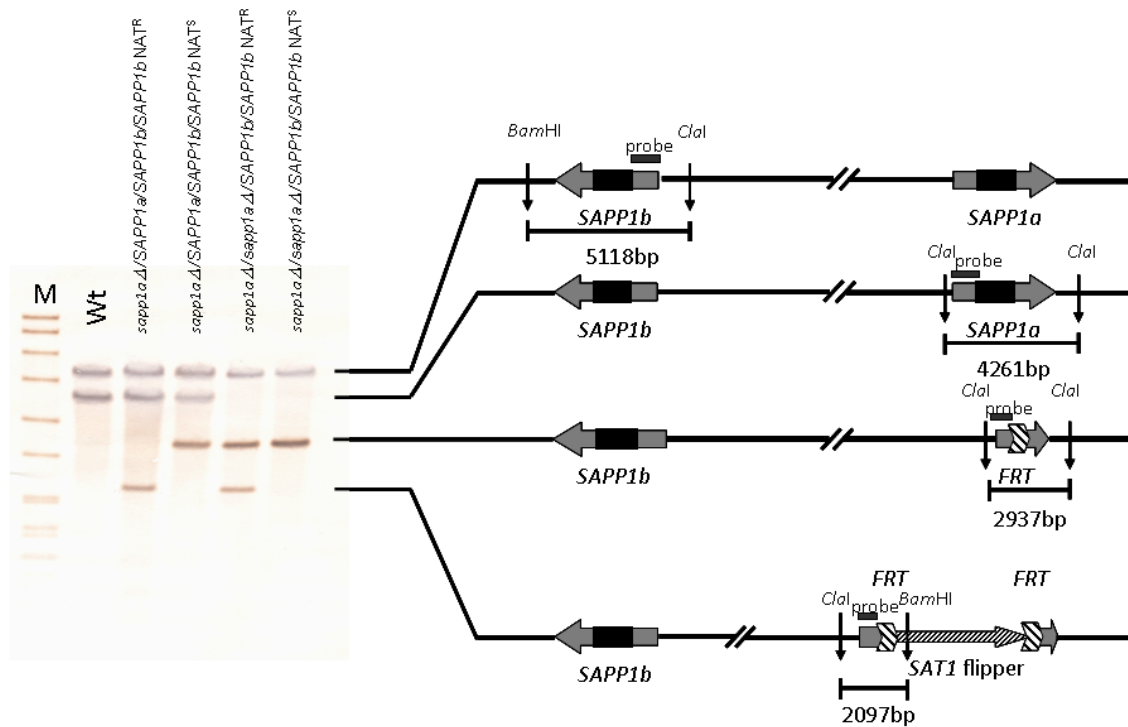


2. ábra

A *caSAT1* konstrukció felépítése

HR UP, HR DOWN: upstream és downstream homológ régió, MAL2: Maltóz promóter, FLP: Flippáz gén, *caSAT1*: Nourseothricin rezisztencia marker.

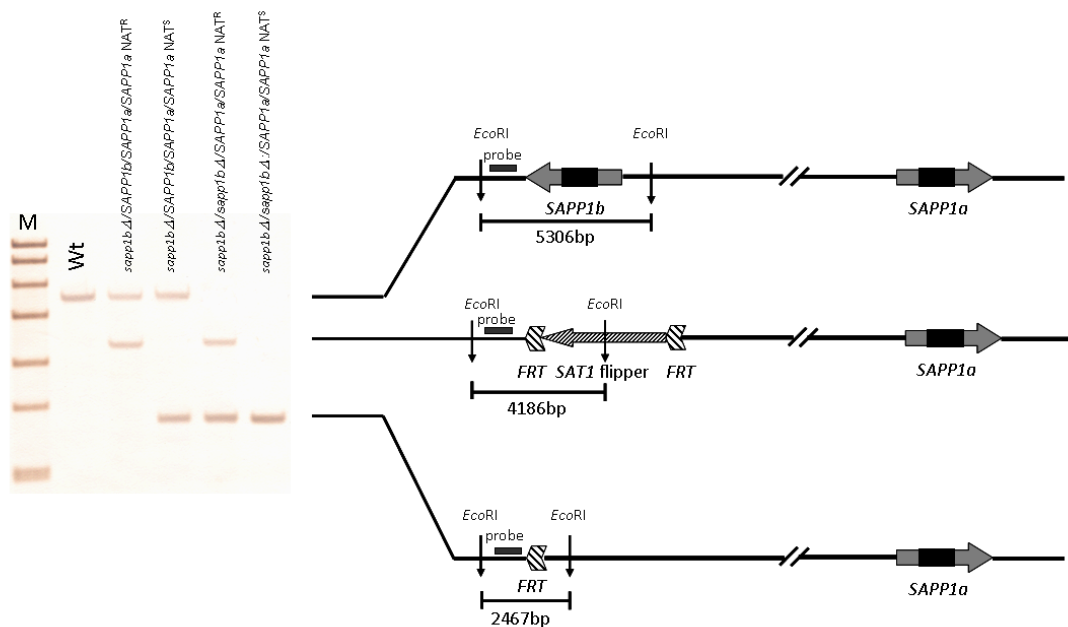
Annak érdekében, hogy a rezisztencia markert a genomból elimináljuk, a sikeres transzformáció után a kapott NAT rezisztens transzformánsokat YNB (élesztő nitrogén bázis) tenyészetben neveltük 2% maltóz jelenlétében, melynek hatására a flippáz gén átíródott és a kazetta két végén lévő FRT motívumokat elhasította, ezáltal kivágva a genomból a konstrukciót. A rendszer ismételt alkalmazásával sikeresen állítottunk elő homozigóta *SAPP1a*, *SAPP1b*, valamint homozigóta *SAPP1a/SAPP1b* deléciós törzseket. A deléció folyamatát Southern hibridizáció segítségével követtük (3., 4., 5. ábra).



Genomi DNS Southern blot analízise (*ClaI* – *Bam*HI emésztett): *C. p.* vad típus, heterozigóta NAT rezisztens (NAT^R) *SAPP1a* mutáns: *sapp1a*Δ::*FRT*-*SAT1*-*FRT*/*SAPP1a*/*SAPP1b*/*SAPP1b*, heterozigóta NAT szenzitív (NAT^S) *SAPP1a* mutáns: *sapp1a*Δ::*FRT*/*SAPP1a*/*SAPP1b*/*SAPP1b*, homozigóta NAT rezisztens (NAT^R) *SAPP1a* mutáns: *sapp1a*Δ::*FRT*/*sapp1a*Δ::*FRT*-*SAT1*-*FRT*/*SAPP1b*/*SAPP1b*, homozigóta NAT szenzitív (NAT^S) *SAPP1a* mutáns: *sapp1a*Δ::*FRT*/*sapp1a*Δ::*FRT*/*SAPP1b*/*SAPP1b*.

3. ábra

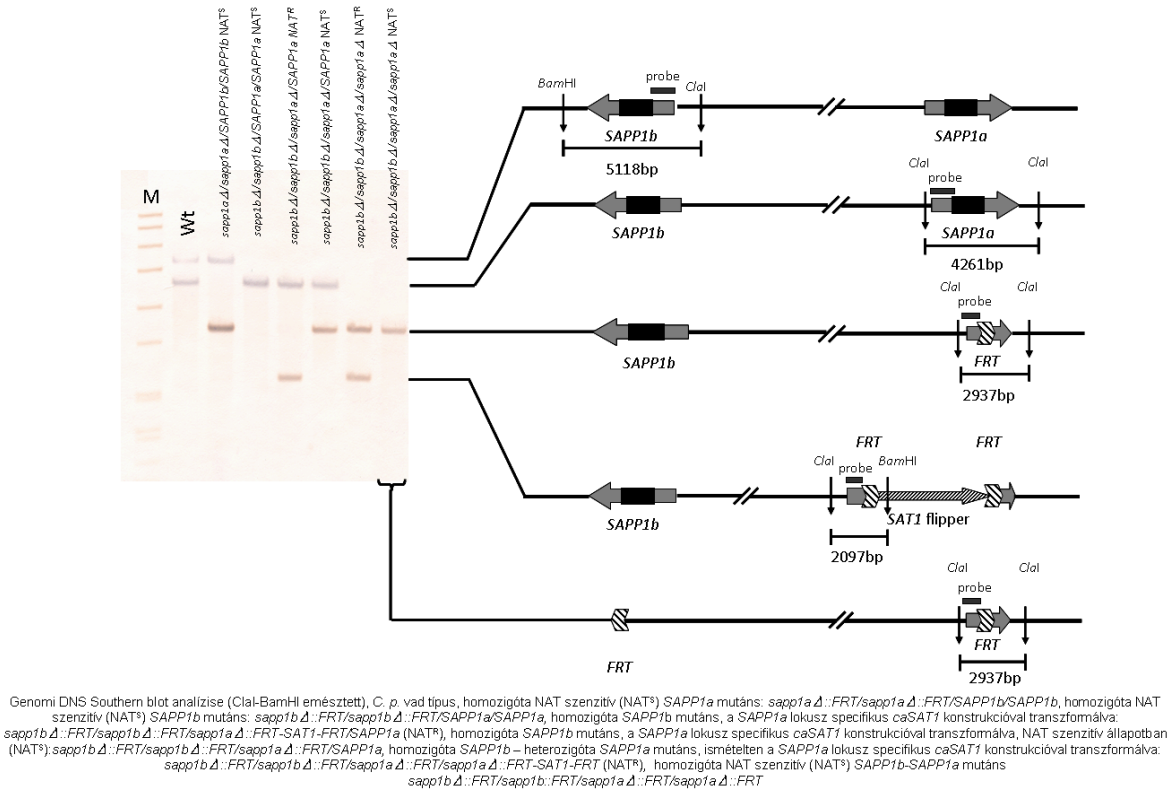
A homozigóta *SAPP1a* mutáns létrehozásának folyamata. Hibridizációs próbaként a *SAPP1a* gén homolog régióját használtuk.



Genomi DNS Southern blot analízise (*Eco*RI emésztett) *C. p.* vad típusból izolálva, heterozigóta NAT rezisztens (NAT^R) *SAPP1b* mutáns: *sapp1b*Δ::*FRT*-*SAT1*-*FRT*/*SAPP1b*/*SAPP1a*/*SAPP1a*, heterozigóta NAT szenzitív (NAT^S) *SAPP1b* mutáns: *sapp1b*Δ::*FRT*/*SAPP1b*/*SAPP1a*/*SAPP1a*, homozigóta NAT rezisztens (NAT^R) *SAPP1b* mutáns: *sapp1b*Δ::*FRT*/*sapp1b*Δ::*FRT*-*SAT1*-*FRT*/*SAPP1a*/*SAPP1a*, homozigóta NAT szenzitív (NAT^S) *SAPP1b* mutáns: *sapp1b*Δ::*FRT*/*sapp1b*Δ::*FRT*/*SAPP1a*/*SAPP1a*.

4. ábra

A homozigóta *SAPP1b* mutáns létrehozásának folyamata. Hibridizációs próbaként a *SAPP1b* duplikálódott régiójához tartozó downstream régiót használtuk fel.

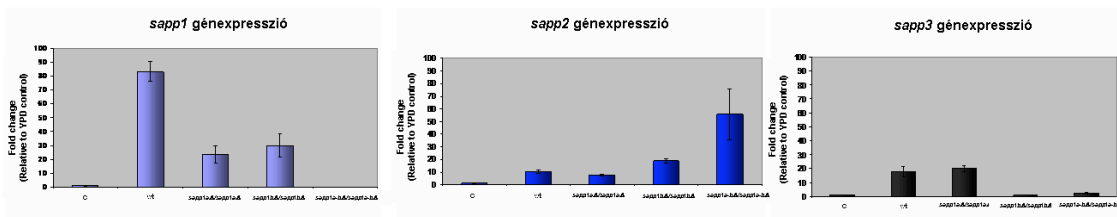


5. ábra

A kettős homozigóta *SAPP1a-SAPP1b* mutáns létrehozásának folyamata. Hibridizációs próbaként a *SAPP1a* gén upstream régióját használtuk fel.

A mutánsok sikeres létrehozása után *in vitro* géneexpressziós vizsgálatokat hajtottunk végre a vad típus, valamint a három homozigóta mutáns törzs bevonásával. Vizsgálataink során a *C. parapsilosis* három *SAPP* génjének (*SAPP1*, *SAPP2*, *SAPP3*) expressziós szintjét mértük kvantitatív real time PCR segítségével. A törzseket indukzív körülmények között, YCB (yeast carbon base) és 2% BSA jelenlétében tenyésztettük 30°C-on. Kontrollként vad típusú törzset használtunk, melyet YPD tápoldatban neveltünk, azonos hőmérsékleten. Eredményeink alapján a *SAPP1* gén expressziója mintegy 50%-os csökkenést mutatott a vad típusú törzshöz képest a homozigóta *SAPP1a* és *SAPP1b* törzsekben, míg a *SAPP1a-SAPP1b* dupla deléciós mutáns esetén az adott gén expressziója megszűnt. A *SAPP2* gén expressziója ezzel ellentétben a vad típusú törzshöz képest a homozigóta *SAPP1a* és *SAPP1b* törzsekben átlagosan 50%-os emelkedést, míg a *SAPP1a-SAPP1b* dupla deléciós mutáns esetén átlagosan ötszörös emelkedést mutatott, tehát ebben a törzsből a *SAPP2* gén overexpressziójával próbálja a mikroba kompenzálni a *SAPP1* gén elvesztését. A *SAPP3* gén expressziós vizsgálata nem mutatott az

előző két génhez mérhető egyértelmű változást, ám a dupla deléciós mutánsban az expressziója nagymértékben lecsökkent (6. ábra).

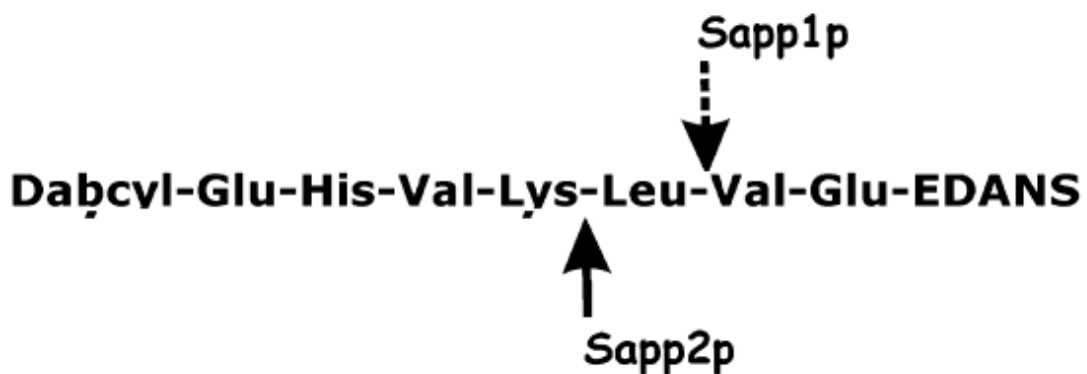


C. p. vad típus, a homozigóta *sapp1a* Δ /*sapp1a* Δ , *sapp1b* Δ /*sapp1b* Δ és *sapp1a-b* Δ /*sapp1a-b* Δ mutánsok *in vitro* génexpressziós szintjei. A törzseket overnight 1x YCB+2%BSA tápközegben, 30°C-on neveltük, majd a három szekretált aszpartil proteáz gén (*SAPP1*, *SAPP2*, *SAPP3*) expressziós szintjeit mértük. Vad típusú törzs YPD-ben nevelve szolgált kontrollként.

6. ábra

A három szekretált aszpartil proteináz gén (*SAPP1*, *SAPP2*, *SAPP3*) expressziós változásai vad típusú, valamint mutáns törzsekben, induktív körülmények között.

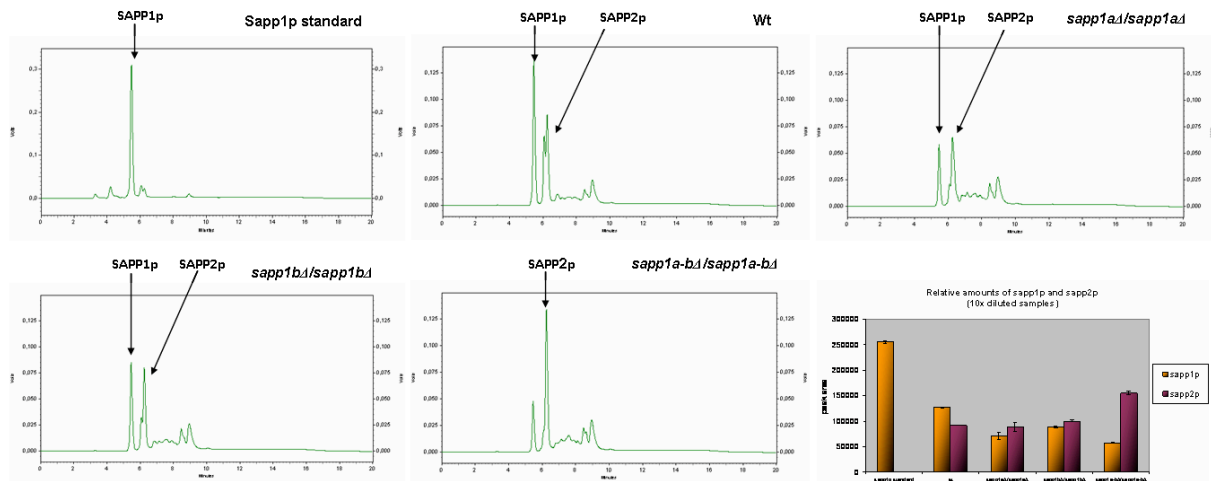
A génexpressziós vizsgálatok mellett fehérje szinten is vizsgáltuk a vad típusú, valamint a mutáns törzsek Sapp1 és Sapp2 proteinjeinek termelését. Ennek érdekében a törzseket 50ml YCB+ 2% BSA közegben neveltük. A felüliszót sejtmentesre szűrtük, majd 10kDa ultraszűrő (Millipore) segítségével 2ml térfogatra töményítettük. Az így nyert mintákból egy fluoreszcens reakciót mértünk össze. Fluoreszcens szubsztrátként Dabcyl-Glu-His-Val-Lys-Leu-Val-Glu-EDANS (5mg/ml, DMSO-ban oldva) szolgált. A szubsztrát specifikus hasítóhelyeket tartalmaz, melyeket a Sapp1p és a Sapp2p képes felismerni és hasítani (7. ábra).



7. ábra

A Sapp1p és Sapp2p specifikus hasítóhelyei

150µl reakcióelegy tipikusan 5µl fluoreszcens szubsztrátot, valamint 20µl fehérjemintát tartalmazott, melyet az adott térfogatra 100 mM-os Na-acetát pufferrel egészítettünk ki. Kontroll reakcióként 20µl tisztított Sapp1p fehérjét tartalmazó reakciót mértünk össze. A reakciót 37°C-on overnight inkubáltuk, majd 20% TFA-val (trifluor ecetsav) állítottuk le a reakciót. A mintákat ezután fluoreszcens detektorral felszerelt HPLC készülékkel vizsgáltuk (phenomenex prodigy C18 oszlop) (8. ábra). A gerjesztési hullámhossz 360nm, az emissziós hullámhossz 485nm volt.



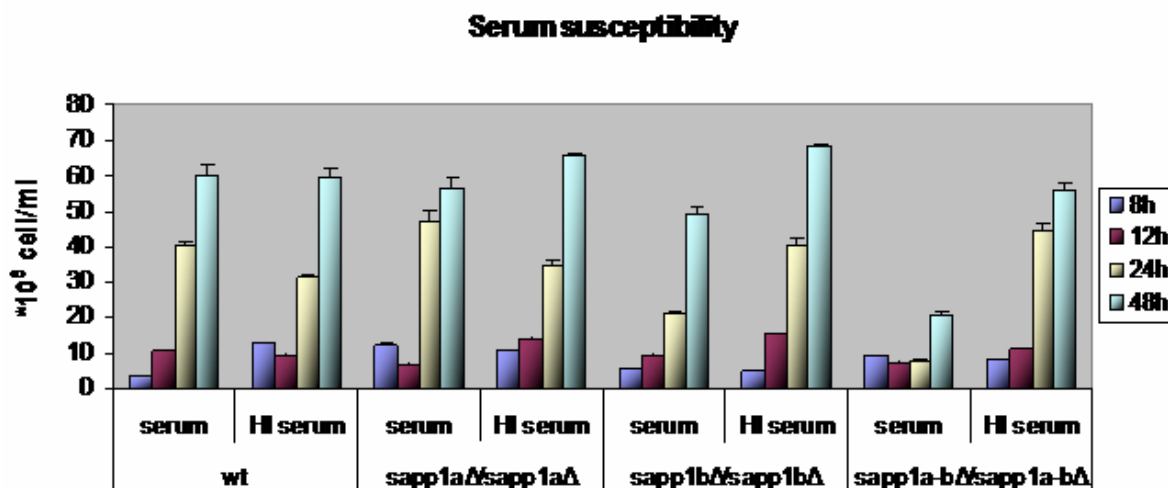
Sapp1p és Sapp2p fehérjék HPLC vizsgálata. A vad típusú és mutáns törzseket YCB+BSA médiumban (30°C overnight) neveltük.

8. ábra

A két fehérje HPLC analízise alátámasztotta real time-PCR eredményeinket, miszerint a *SAPP1* gén elvesztésével a *SAPP2* gén expressziós szintje megemelkedik. Korábbi tanulmányok megmutatták, hogy a dupla deléciós mutáns törzsben megfigyelhető, Sapp1p helyén lévő csúcs nem a Sapp1p hasításának következménye.

Génexpressziós és fehérje vizsgálataink után munkánk további részében a törzsek gazda-patogén interakcióit vizsgáltuk.

Vizsgáltuk az egyes törzsek szérumerzékenységét, melyhez 20% humán szérumot alkalmaztunk, hővel inaktívál és nem inaktívált formában PBS-ben hígítva. A vad típusú és mutáns törzsekből 3×10^4 /ml sejtszámot alkalmaztunk kiindulásnak, majd 8, 12, 24 és 48 óra elteltével meghatároztuk az élő sejtek számát, három párhuzamos mintát alkalmazva (9. ábra).



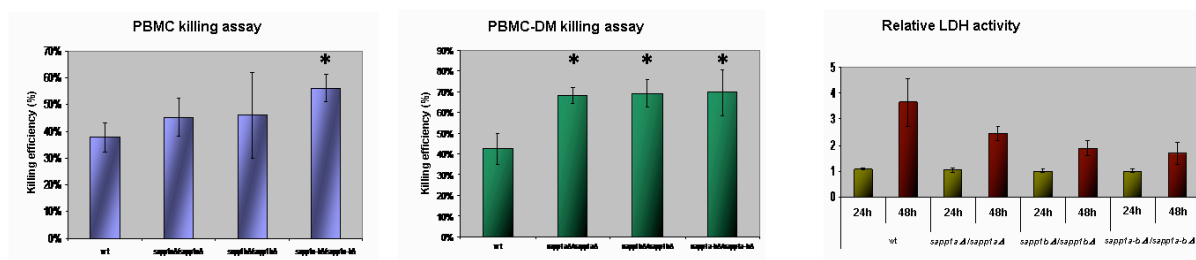
9. ábra

Vad típusú és mutáns törzsek szérum érzékenységének vizsgálata.

Eredményeink szerint az élő sejtszám tekintetében jelentős eltérést a kettős deléciós mutáns törzs adott nem hőinaktivált humán szérum jelenlétében, amely a komplement rendszer komponenseinek sejtkárosító hatásával hozható összefüggésbe.

Humán perifériális mononukleáris sejtek (PBMC) és ezekből differenciáltatott makrofágok (PBMC-DM) segítségével killing assay-t végeztünk, hogy megállapíthassuk, hogy milyen határfokkal képesek a vad típusú és mutáns törzseket eliminálni. Ehhez ismert számú gazda sejtet fertőztünk ötszörös mennyiségű élesztő sejtrel, majd 3 órán keresztül 37°C-on, 5%-os CO₂ tartalom és 100%-os relatív páratartalom mellett inkubáltuk a tenyészeteket, 3 párhuzamos mintát használva. Kontrollként a gazda sejtekhez képest ötszörös mennyiségű élesztő sejtet inkubáltunk a gazda sejteknek megfelelő médiumban azonos körülmények között, szintén 3 párhuzamos minta alkalmazásával. Az inkubációs idő letelte után a gazda sejteket injekciós tű segítségével szétroncsoltuk, majd ismert számú élesztő sejtet YPD csészére szélesztettünk, mintánként 3 párhuzamosban. A kontroll csészén felnőtt telepek számát a gazda sejtekkel együtt inkubált mintákból származó telepek számával összevetve megállapítható az egyes törzsekkel szembeni gombaölési hatékonyság. Ezzel párhuzamosan a gazda sejtek gomba általi károsodásának mértékét is mértük. Ehhez szintén ismert számú gazda sejtet (PBMC-DM) fertőztünk ötszörös mennyiségű élesztő sejtrel, majd 37°C-on, 5%-os CO₂ tartalom és 100%-os relatív páratartalom mellett inkubáltuk a tenyészeteket, 3 párhuzamos mintát használva. 24 és 48 óra elteltével felülúszót gyűjtöttünk, majd a felülúszók laktát-dehidrogenáz (LDH) aktivitását mértük. Kontrollként a gazda sejteknek szükséges steril médiumot használtunk (RPMI 1640, 10% hőinaktivált humán szérum, 1% penstrep). A laktát-dehidrogenáz egy intracelluláris enzim,

amely a gazda sejtek pusztulásakor szabadul ki a sejtéből, ezáltal a sejtkárosodás mértékével korrelál. Ezen kísérletek eredményeit a 10. ábra foglalja össze.

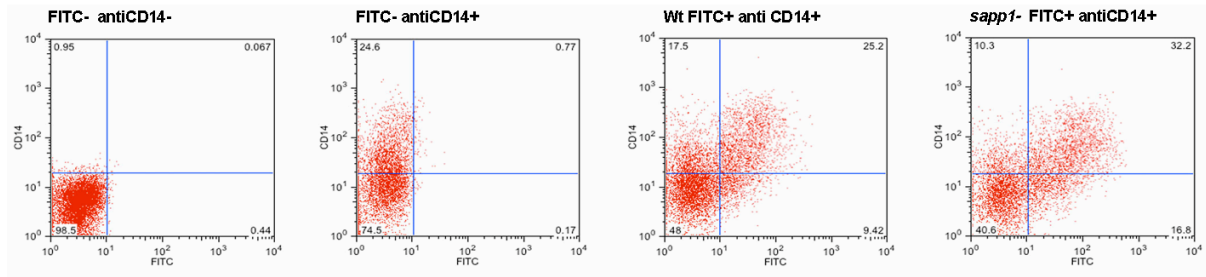


10. ábra

Killing assay eredmények PBMC és PBMC-DM sejtek (gazda) valamint *C. parapsilosis* vad típus és mutáns törzsek (patogén) felhasználásával (első két diagram). A harmadik diagram a gazda sejtek (PBMC-DM) károsodásának mértékét reprezentálja.

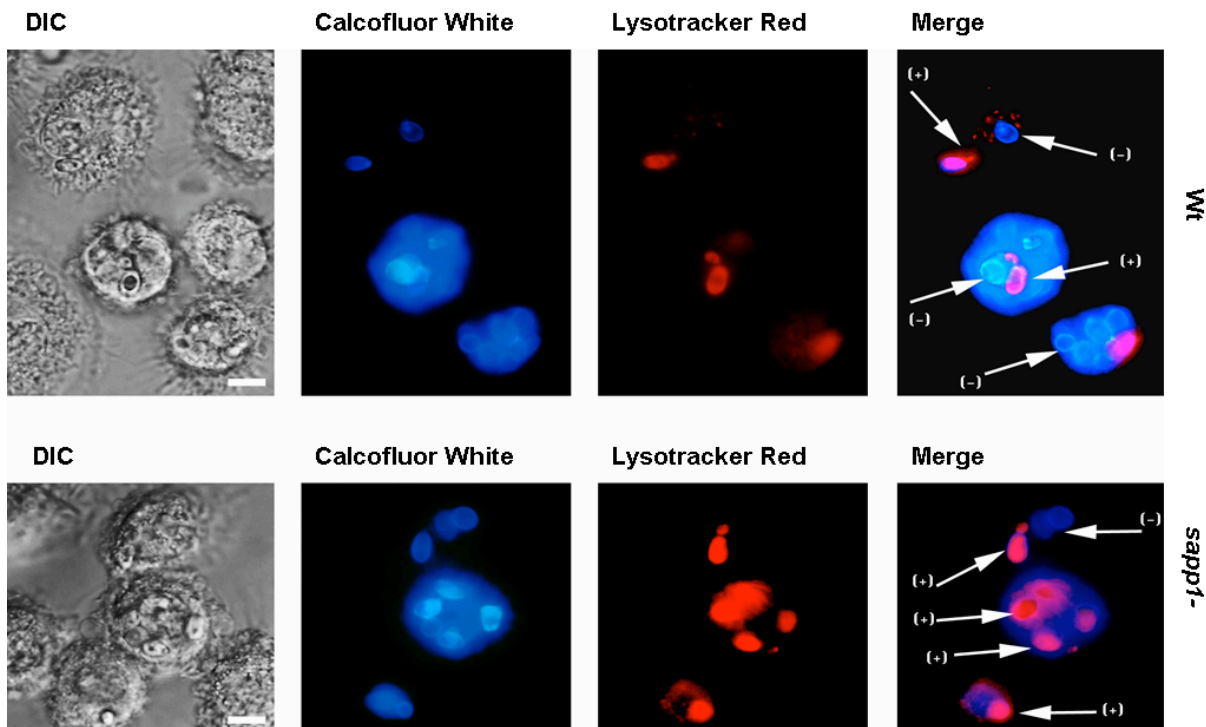
PBMC sejteket felhasználva a killing assay eredményeink jól mutatják, hogy a kettős deléciós mutáns törzs esetén a gazda sejtek jóval nagyobb hatásfokkal voltak képesek a patogén eliminációjára, mint a vad típusú törzs esetén (wt: átlag 40%-os ölési hatékonyság, *SAPP1a*/*SAPP1b* ölési hatékonyság: átlag 58%), amely eredmény szignifikánsnak tekinthető (*: $p < 0,05$). Ugyanezen vizsgálatot PBMC-DM sejtekkel elvégezve azt kaptuk, hogy a gazda sejtek a vad típushoz képest mindhárom mutáns törzset közel azonos hatékonysággal voltak képesek eliminálni (wt: átlag 40%-os, mutáns törzsek: átlag 70%-os ölési hatékonyság). Ez az ölési hatékonyság különbség szintén szignifikáns (*: $p < 0,05$). Ezzel összhangban 48 órás inkubációt követően a gomba általi gazdasejt károsító hatás a mutáns sejtek esetén jelentősen csökkent.

Annak érdekében, hogy meghatározzuk a *C. parapsilosis* vad típusának és *SAPP1a*-*SAPP1b* deléciós mutáns törzsének fagocitózis százalékát, áramlási citometriás vizsgálatokat végeztünk. Ehhez a vad típusú és deléciós törzset FITC (fikoeritrin) festékekkel jelöltük, majd a PBMC-DM sejteket ötszörös mennyiségű gomba sejtrel fertőztük és 37°C-on 5%-os CO₂ tartalom és 100%-os relatív páratartalom mellett 3 órán át inkubáltuk. A tenyésztő well-ekbe letapadt gazda sejteket tripszines kezelésnek vetettük alá, majd CD-14 elleni antitesttel festettük. Kontrollként nem fertőzött, jelöletlen makrofág populációt, valamint anti CD-14 ellenanyaggal festett makrofágokat használtunk, amelyeket jelöletlen vad típusú törzsszel fertőztünk. Eredményeink 10%-os fagocitózis növekedést mutattak a deléciós törzs esetén, a vad típushoz képest (11. ábra).



11. ábra

A vad típusú és a dupla deléciós törzs további, fluoreszcens mikroszkópos vizsgálata során nagyobb arányú fago-lizozóma fúziót figyeltünk meg a mutáns törzsben. Fluoreszcens vizsgálataink során az élesztő sejteket még fertőzés előtt Calcofluor white festékekkel festettük, majd hasonlóan fertőztük a PBMC-DM gazdasejteket, mint a korábbi kísérletekben. A Calcofluor white egy sejtfalra specifikus, membrán impermeábilis festék, kék fluoreszcenciával. Az inkubációs idő elteltével a co-kultúrát lysotracker red festékekkel is megfestettük, amely a makrofág sejtek lizozómáira specifikus, piros fluoreszcenciát adó festék. Eredményeinket a 12. ábra szemlélteti.



12. ábra

PBMC-DM sejtek *C. parapsilosis* vad típusú törzsével és *SAPPIa-SAPPIb* mutáns törzssel fertőzve (Calcofluor white-Lysotracker red festés). A két fluoreszcens kép egymásra vetítése (Merge) megadja a csak fagoszómában lévő és fago-lizozóma fúzió átesett, fagocitált sejtek megoszlását. (-): negatív kolokalizáció (fagoszóma), (+): pozitív kolokalizáció (fagolizozóma fúzió).

További terveink közt szerepel a mutáns törzsben megfigyelt emelkedett fagolizozóma fúzió pontos okának tisztázása. Ennek érdekében a korai és kései fagoszómákra és lizoszómákra specifikus markerek (LAMP-1, EEA-1, Cathepsin-B) meglétének vizsgálata, valamint a Sapp1 fehérje fagolizozóma érésre gyakorolt hatása adhat választ.

Összegzésként megállapítható, hogy a *C. parapsilosis* Sapp1 fehérjéje fontos szerepet játszik a mikroba virulenciájának kialakításában. A Sapp1 fehérjét nem termelő mutáns törzs mind a humán szérummal szemben, mind PBMC és PBMC-DM sejtekkel szemben jelentősen érzékenyebbnek bizonyult, ugyanakkor a gazda sejtekre gyakorolt sejtkárosító hatása csökkent.

2. Egy új és hatékony RNS interferencián alapuló génmanipulációs technika kidolgozása *C. parapsilosis*-ra.

Az RNS interferencián alapuló géncsillapítás céljára speciális vektort klónoztunk. A rendszer teszteléséhez az URA3 gént választottuk, ennek indoka az, hogy az URA auxotróf törzsek könnyen szelektálhatók FOA alkalmazásával, így a rendszer hatékonysága egyszerűen tesztelhető. Kísérleteink első évében az URA3 gént kódoló szekvenciát sense és antisense orientációban klónoztuk caSat1 rezisztenciát hordozó vektorba. A két ellenkező irányú szekvenciát egy 200 bp méretű nem homológ szakasz választja el, amely lehetővé teszi az RNS átíródása során egy speciális hajtű struktúra kialakulását. Ez a másodlagos szerkezet képes lehet indukálni az RNS interferencia mechanizmust, amely lehetővé teszi a specifikus, esetünkben URA3 mRNS lebontását. Az URA3 gén csillapítására létrehozott konstrukciók tesztelését elvégeztük. A FOA szelekció nem eredményezett rezisztens mutánsokat, arra utalva, hogy az esetleges géncsillapítás mértéke nem volt elegendő a túléléshez. A továbbiakban más target géneket választottunk. Az általunk kidolgozott egyszerű lipáz aktivitási tesztek lehetőségét kihasználva a LIP2 génre siRNS konstrukciót terveztünk. A tervezésnél figyelembe vettük a Drinnenberg és mtsi által 2009 októberében a Science-ben publikált adatokat, miszerint az siRNS molekuláris mechanizmusa a sarjadzó élesztők csoportjában is lehetséges (*Saccharomyces castellii*). *In silico* vizsgálatokkal igazoltuk, hogy az új típusú RNaseIII dicer funkciókat ellátó fehérjét kódoló gének ortológjai a *C. parapsilosis*-ban is előfordulnak így egy castelii-szerű mechanizmus a *C. parapsilosis*-ban is lehetségesnek tűnik. Jelenleg egy LIP2 gén csillapítására alkalmas konstrukció klónozását végezzük. A transzformálást követően szeretnénk elemezni a génextpressziót lipáz tesztekkel és qRT-PCR segítségével.

3. Az aszpirin extracelluláris lipáz gátló hatásának vizsgálata, illetve *in vitro* *Candida* fertőzésekre gyakorolt hatása.

Az acetyl szalicil sav gombaellenes hatását vizsgáltuk az általunk kifejlesztett és *C. parapsilosis*-

ra optimalizált *in vitro* szövetfertőzéses rendszer segítségével. Kísérletesen igazoltuk, hogy az aszpirin terápiás koncentrációban képes csökkenteni a patogén által okozott szövetkárosodást. Bizonyítottuk, hogy speciális oliva olajjal, illetve magas lipid tartalmú klinikumban alkalmazott intraperitoneális tápoldattal (intralipid) kiegészített minimál tápoldatban aszpirin hatására a *C. parapsilosis* és a *C. albicans* törzsek jelentősen alacsonyabb növekedési képességet mutattak. Eredményeink arra utaltak, hogy az aszpirin védő hatása részben az extracelluláris lipázok gátlásából származhat. Ennek igazolására tisztított *C. antarctica* és *C. cylindracea* lipázokat alkalmaztunk és igazoltuk az aszpirin *in vitro* lipázgátló tulajdonságát. Hatásmechanizmus vizsgálatokhoz a *C. parapsilosis* lipáz 2 szerkezetének számítógépes modeljét használtuk. Igazoltuk a lehetséges kölcsönhatást az enzim szubsztrát kötő helye és az aszpirin között. (Eredményeinket 2009-ben közzétettük: *Microbes Infect.* 2009 Dec;11(14-15):1131-9. Epub 2009 Aug 22. Trofa D, Agovino M, Stehr F, Schäfer W, Rykunov D, Fiser A, Hamari Z, Nosanchuk JD, Gácsér A. Acetylsalicylic acid (aspirin) reduces damage to reconstituted human tissues infected with *Candida* species by inhibiting extracellular fungal lipases.)

4. Emberi dendritikus sejtek *in vitro* válasza *C. parapsilosis* vad típusú és lipáz defficiens sejtekkel történő stimulusra.

Korábbi munkánk bebizonyította, hogy a *Candida* által szekretált hidrolitikus enzimek virulencia faktorok lehetnek. Annak ellenére, hogy a dendritikus sejtek mint a természetes immunitás sejtjei, nagyon fontos szerepet töltenek be a gombák elleni védekezésben, keveset tudunk azok szerepéről *C. parapsilosis* fertőzések során. Ezért célul tűztük ki a dendritikus sejtek válaszána vizsgálatát *in vitro* fertőzési rendszerekben, illetve a gomba által termelt lipázok szerepének vizsgálatát a gazda-patogén interakciók során. Eredményeink alapján a monocitákból differenciáltatott érett és éretlen dendritikus sejtek (DC) is képesek voltak opszonizáció nélkül hatékonyan fagocitálni mind a vad típusú mind a lipáz defficiens mutáns *C. parapsilosis* sejteket. Gombaölő képesség vizsgálataink, illetve a fagocita index meghatározása során megállapítottuk, hogy mind az éretlen, mind az érett DCk hatékonyabban képesek a lipáz defficiens gombasejteket eliminálni, mint a vad típus sejtjeit. Mindezek mellett a mutáns *C. parapsilosis* sejtek magasabb génextpressziót indukáltak a gyulladáshoz kapcsolódó citokinek génjeiben, amely megemelkedett citokin koncentrációt eredményezett fehérje szinten is az *in vitro* fertőzést követő 24 és 48 órában. Kimutattuk tehát, hogy a dendritikus sejtek hatékonyan aktiválódnak *C. parapsilosis* fertőzést követően és igazoltuk a gomba szekretált lipázainak a gazda immunválaszát befolyásoló hatását. (Eredményeinket 2011-ben közzétettük: Nagy I, Filkor K, Nemeth T, Hamari Z, Vagvolgyi C, Gácsér A: *In vitro* interactions of *C. parapsilosis* wild type and lipase deficient mutants with human monocyte derived dendritic cells, *BMC Microbiology*

2011, 11:122doi:10.1186/1471-2180-11-122, 2011)

Irodalomjegyzék

1. Trofa, D., A. Gacser, and J.D. Nosanchuk, *Candida parapsilosis, an emerging fungal pathogen*. Clin Microbiol Rev, 2008. **21**(4): p. 606-25.
2. van Asbeck, E.C., K.V. Clemons, and D.A. Stevens, *Candida parapsilosis: a review of its epidemiology, pathogenesis, clinical aspects, typing and antimicrobial susceptibility*. Crit Rev Microbiol, 2009. **35**(4): p. 283-309.
3. Benjamin, D.K., Jr., H. Garges, and W.J. Steinbach, *Candida bloodstream infection in neonates*. Semin Perinatol, 2003. **27**(5): p. 375-83.
4. Clerihew, L., et al., *Candida parapsilosis infection in very low birthweight infants*. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed, 2007. **92**(2): p. F127-9.
5. Burwell, L.A., et al., *Antifungal prophylaxis to prevent neonatal candidiasis: a survey of perinatal physician practices*. Pediatrics, 2006. **118**(4): p. e1019-26.
6. Duran, E., et al., [*Candidemia: Candida parapsilosis in a neonatology unit*]. Rev Iberoam Micol, 2005. **22**(1): p. 64.
7. Ruan, S.Y. and P.R. Hsueh, *Invasive candidiasis: an overview from Taiwan*. J Formos Med Assoc, 2009. **108**(6): p. 443-51.
8. Smith, P.B., W.J. Steinbach, and D.K. Benjamin, Jr., *Neonatal candidiasis*. Infect Dis Clin North Am, 2005. **19**(3): p. 603-15.
9. Pappas, P.G., et al., *A prospective observational study of candidemia: epidemiology, therapy, and influences on mortality in hospitalized adult and pediatric patients*. Clin Infect Dis, 2003. **37**(5): p. 634-43.
10. Almirante, B., et al., *Epidemiology and predictors of mortality in cases of Candida bloodstream infection: results from population-based surveillance, barcelona, Spain, from 2002 to 2003*. J Clin Microbiol, 2005. **43**(4): p. 1829-35.
11. Hospenthal, D.R. and A.L. Rogers, *Immunology of fungal infection*. Curr Top Med Mycol, 1995. **6**: p. 127-88.