

**OXIDATÍV STRESSZ TOLERÁNS *CANDIDA ALBICANS*
MUTÁNSOK MORFOLÓGIAI ÉS ÉLETTANI
VIZSGÁLATA**

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

KÉSZÍTETTE: Fekete Andrea
molekuláris biológus (genetikus)

TÉMAVEZETŐK: Dr. Pócsi István
Habilitált egyetemi docens
Prof. Dr. Gergely Lajos
Egyetemi tanár

Készült a Debreceni Egyetem Természettudományi Karának Mikrobiális Biotechnológiai és
Sejtbiológiai Tanszékén és az OEC Orvosi Mikrobiológia Intézetében

Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőimnek, Dr. Pócsi Istvánnak és Prf. Dr. Gergely Lajosnak segítségükért, szakmai irányításukért, hasznos tanácsaikért;

Dr. Emri Tamás egyetemi docensnek az enzimológiai és sok egyéb kísérletben nyújtott nélkülözhetetlen segítségéért;

Dr. Majoros László egyetemi adjunktusnak (DE OEC Orvosi Mikrobiológia Intézet) a klinikai *C. albicans* törzsekért, az antimikotikumokkal szembeni érzékenység vizsgálatában való segítségéért és az ott dolgozó Pappné Falus Erzsébetnek, aki a laboratóriumi munkákban mindig segítségemre volt;

Prf. Dr. Pesti Miklós tanszékvezető egyetemi tanárnak (PTE Általános és Környezeti Mikrobiológiai Tanszék), hogy lehetővé tette számomra, hogy laborjában dolgozzak, támogatta szakmai fejlődésemet és Dr. Gazdag Zoltánnak, aki ott lelkiismeretesen segítette munkámat, a klinikai törzsek antimikotikumokkal szembeni érzékenységének meghatározásáért és egyéb kísérleteben való részvételért;

Dr. Varga Zsuzsa tudományos főmunkatársnak (DE OEC I. Belgyógyászati Klinika) a lipidösszetétel meghatározásában, Dr. Balla József egyetemi docensnek (DE OEC I. Belgyógyászati Klinika, Nephrológiai Nem Önálló Tanszék) és Dr. Nagy Emőkének a lipidperoxidációs munkákban nyújtott segítségükért;

Prf. Dr. Emődy Levente emeritus professzornak (PTE ÁOK Orvosi Mikrobiológiai és Immunitástani Intézet) a patogenitási kísérletek elvégzéséért;

Prf. Dr. Antal Miklós egyetemi tanárnak (DE OEC Anatómia Intézet) a transzmissziós elektronmikroszkóp használatának lehetőségéért és Dr. Cserhádi Csabának (DE Szilárdtest Fizikai Tanszék) a scanning elektronmikroszkópos munkában nyújtott segítségéért;

Karányi Zsoltnak (DE. I. Belgyógyászati Klinika) a klinikai törzsek statisztikai munkáinak elvégzéséért.

Köszönettel tartozom a DE Mikrobiális Biotechnológiai és Sejtbiológiai Tanszék valamennyi munkatársának -kiemelve Pócsi Imre technikust, aki nélkülözhetetlen segítségem volt a kísérletes munkáim során- és Dr. Gyetvai Ágnesnek a baráti légkörért és a sok apró segítségért.

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések	6
2. Bevezetés	8
3. Célküszések	11
4. Anyagok és módszerek	13
4.1. A <i>t</i>-BOOH toleráns <i>C. albicans</i> mutáns törzsek létrehozása a <i>C. albicans</i> ATCC 14053 szülői törzs és klinikai <i>C. albicans</i> izolátumok felhasználásával	13
4.1.1. Felhasznált törzsek és azok fenntartása	13
4.1.2 A <i>t</i> BOOH MIC (Minimális gátló koncentráció, <u>M</u> inimal <u>I</u> nhibitory <u>C</u> oncentration) érték meghatározása	14
4.1.3 A <i>t</i> BOOH toleráns <i>Candida albicans</i> mutáns törzsek létrehozása	15
4.1.4. A <i>t</i> BOOH toleráns fenotípus stabilitásának vizsgálata	15
4.1.5. Specifikus glutation reduktáz enzim aktivitásának meghatározása	16
4.1.6. A telepmorfológia meghatározása	16
4.1.7. A növekedés vizsgálta SDB tápoldatban	16
4.2. A <i>C. albicans</i> ATCC 14053 szülői törzs és <i>C. albicans</i> AF06 mutáns törzs illetve a klinikai izolátumok és a belőlük létrehozott mutánsok morfológiai és élettani összehasonlítása	17
4.2.1. A patogenitás, in vitro virulencia faktorok és antigenicitás meghatározása a <i>C. albicans</i> törzseknél	17
4.2.1.1. A <i>C. albicans</i> ATCC 14053 szülői törzs és <i>C. albicans</i> AF06 mutáns törzs patogenitásának vizsgálata állatkísérletben	17
4.2.1.1.1. A kontroll és a <i>t</i> BOOH toleráns mutáns LD ₅₀ értékének meghatározása egér modellben	17
4.2.1.1.2. Egér intraperitoneális oltás	18
4.2.1.2. <i>In vitro</i> virulencia faktorok vizsgálata	18
4.2.1.2.1. Csírázás vizsgálata birka szérum jelenlétében a <i>C. albicans</i> ATCC 14053 szülői és <i>C. albicans</i> AF06 mutáns törzseknél	18
4.2.1.2.2. Az extracelluláris aszpartát proteáz (EAP) aktivitás meghatározása a <i>C. albicans</i> ATCC 14053 szülői és <i>C. albicans</i> AF06 mutáns törzseknél	18
4.2.1.2.3. Az extracelluláris foszfolipáz (EP) aktivitás meghatározása a <i>C. albicans</i> törzseknél	19

4.2.1.2.4. Pszeudohifa és klamidospóra képzés vizsgálata kukoricaliszt táptalajon a <i>C. albicans</i> törzseknél	19
4.2.1.2.5. Hifázó képesség vizsgálata Spider táptalajon a <i>C. albicans</i> törzseknél	19
4.2.1.2.6. A polimorfonukleáris leukociták (PMNL) szuperoxid termelésének vizsgálata a <i>Candida albicans</i> ATCC 14053 szülői és <i>Candida albicans</i> AF06 mutáns törzs hatására	20
4.2.2. A <i>C. albicans</i> törzsek sejttani és fiziológiai vizsgálata	21
4.2.2.1. A <i>C. albicans</i> ATCC 14053 szülői és <i>C. albicans</i> AF06 törzsek sejtméretének meghatározása scanning elektronmikroszkóp segítségével	21
4.2.2.2. A <i>C. albicans</i> ATCC 14053 szülői és <i>Candida albicans</i> AF06 törzsek sejtjeinek szerkezeti felépítésének vizsgálata transzmissziós elektronmikroszkóppal	21
4.2.2.3. A <i>C. albicans</i> ATCC 14053 szülői és <i>C. albicans</i> AF06 törzsek mitokondriumainak morfológiai és funkcionális vizsgálata	21
4.2.2.4. A <i>C. albicans</i> törzsek oxidatív stresszt kiváltó anyagokkal és antimikotikumokkal szembeni érzékenységének vizsgálata	22
4.2.2.4.1. A H ₂ O ₂ , menadion nátrium biszulfid (MSB) és NaOCl MIC értékének meghatározása	22
4.2.2.4.2. Az antifungális anyagok (flukonazol, vorikonazol, 5-fluorocitozin, amphotericin B) MIC értékének meghatározása	22
4.2.3. Az antioxidáns védelmi rendszer elemeinek és a ROS termelésének meghatározása a <i>C. albicans</i> törzseknél	23
4.2.3.1. Specifikus antioxidáns enzimaktivitások meghatározása	23
4.2.3.2. Az oxidált és redukált glutation mennyiségének meghatározása	24
4.2.3.3 A szuperoxid és peroxid tartalom meghatározása	25
4.2.4. A zsírsavösszetétel és a lipidperoxidációs termékek meghatározása	25
4.2.4.1. A zsírsavösszetételben és neutrális lipidekben bekövetkezett változások vizsgálata	25
4.2.4.2. A lipidperoxidációs termékek mennyiségi és minőségi meghatározása	26
4.2.5 Légzés vizsgálata a <i>Candida albicans</i> törzsekben	26
4.3. Statisztikai módszerek	27
4.4. Felhasznált vegyszerek	27
5. Eredmények	28

5.1. A <i>t</i>-BOOH toleráns <i>C. albicans</i> mutáns törzsek létrehozása és ezen törzsek összehasonlítása az ATCC 14053 törzssel	28
5.1.1. A szülői és mutáns törzsek <i>t</i> BOOH MIC értékének és GR aktivitásának meghatározása	28
5.1.2. A szülői és mutáns törzsek telepméretének és hifázó képességének jellemzése	29
5.2. Az AF06 <i>t</i>BOOH toleráns mutáns törzs és az ATCC 14053 szülői <i>C. albicans</i> törzs patogenitási, morfológiai és fiziológiai jellemzése	29
5.2.1. A <i>t</i> BOOH tolerancia hatása a növekedésre	29
5.2.2. A <i>t</i> BOOH tolerancia kialakulása megváltoztatta az <i>in vitro</i> virulencia faktorokat, mérsékelte a patogenitást, azonban az antigenicitásra nem volt hatással	30
5.2.2.1. A virulencia faktorokban bekövetkező változások vizsgálata	30
5.2.2.1.1. A csírázási képesség vizsgálata birka szérumban	30
5.2.2.1.2. Az extracelluláris aszpartát proteáz és a szekretált foszfolipáz aktivitások	30
5.2.2.1.3. Pseudohifázó képesség és klamidospóra képzés kukoricaliszt táptalajon	30
5.2.2.1.4. Hifázóképesség vizsgálata Spider táptalajon	30
5.2.2.2. A polimorfonukleáris leukociták (PMNL) szuperoxid termelésének vizsgálata	33
5.2.2.3. A patogenitás vizsgálata állatkísérletben	34
5.2.2.3.1. A kontroll és a <i>t</i> BOOH toleráns mutáns törzsek LD ₅₀ értékének meghatározása	34
5.2.2.3.2. A két törzs sejtjeinek intraperitoneális infekciót követő vizsgálata	34
5.2.3. A <i>t</i> BOOH tolerancia nincs hatással a sejtméretre és az élesztősejtek morfológiájára	36
5.2.3.1. A sejtméret meghatározása scanning elektron mikroszkóp segítségével	36
5.2.3.2. A sejtek ultrastuktúrájának összehasonlítása transzmissziós elektron mikroszkóp segítségével	36
5.2.3.3. A mitokondriumok morfológiai és funkcionális vizsgálata	37
5.2.4. A <i>t</i> BOOH tolerancia megnövelte az ellenálló képességet az egyéb oxidálószerekkel és antifungális szerekkel szemben	38
5.2.5. A <i>t</i> BOOH tolerancia az antioxidáns védelmi rendszer folyamatos indukcióját eredményezte	39
5.2.5.1. A specifikus antioxidáns enzimaktivitások meghatározása	39
5.2.5.2. A GSH, GSSG, peroxid és szuperoxid termelés mennyiségi összehasonlítása	39
5.2.6. A <i>t</i> BOOH tolerancia megváltoztatta a lipidösszetételt és jelentősen növelte a lipid peroxidációs termékek mennyiségét	42
5.2.6.1. A lipidösszetételében bekövetkező változások vizsgálata	42

5.2.6.2. A lipid peroxidációs termékek vizsgálata	44
5.2.7. A tBOOH tolerancia csökkent cianid-érzékeny és fokozott alternatív légzést eredményezett	45
5.3. Klinikai izolátumok (<i>C. albicans</i>) élettani vizsgálata, új tBOOH toleráns <i>C. albicans</i> mutánsok létrehozása	46
5.3.1. A klinikai izolátum <i>C. albicans</i> -ok MIC _{tBOOH} , MIC _{H₂O₂} , GR, GPx és G6PD enzimaktivitásainak meghatározása	46
5.3.2. Új tBOOH toleráns mutáns törzsek létrehozása a klinikai izolátumokból és azok összehasonlítása a szülői törzseikkel	46
6. Eredmények összegzése	55
7. Irodalom	59
8. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények és előadások	65

1. Rövidítések

ATCC	<u>A</u> merican <u>T</u> ype <u>C</u> ulture <u>C</u> ollection
AOX	alternatív oxidáz
DCF	2',7'-diklorofluorescein
Et	etidium ion
G6PD	glükóz-6-foszfát dehidrogenáz
GPx	glutation peroxidáz
GR	glutation reduktáz
GSH	redukált glutation
GST	glutation S-transzferáz
GSSG	oxidált glutation
γGT	γ-glutamiltranzspeptidáz
MIC	minimális gátló koncentráció (<u>m</u> inimal <u>i</u> nhibitory <u>c</u> oncentration)
MPO	mieloperoxidáz
MSB	menadion nátrium biszulfid
MUFA	egyszeresen telítetlen zsírsav (<u>m</u> onoun <u>s</u> aturated <u>f</u> atty <u>a</u> cid)
NBT	<u>N</u> itro <u>B</u> lue <u>T</u> etrazolium
PBS	0,9% NaCl-ot tartalmazó foszfát puffer (<u>p</u> hosphate <u>b</u> uffer <u>s</u> aline)
PMNL	polimorfonukleáris leukocita
PMSF	<u>f</u> enil- <u>m</u> etil- <u>s</u> ulfonil- <u>f</u> luorid
PUFA	többszörösen telítetlen zsírsav (<u>p</u> olyun <u>s</u> aturated <u>f</u> atty <u>a</u> cid)
RNI	reaktív nitrogén intermedier
ROS	reaktív oxigén részecskék (<u>r</u> eactive <u>o</u> xxygen <u>s</u> pecies)
SDA	Sabouraud dextróz agar
SDB	Sabouraud dextróz tápoldat
SFA	telített zsírsav (<u>s</u> aturated <u>f</u> atty <u>a</u> cid)
SHAM	szalicil-hidroxamát

SOD	szuperoxid dizmutáz
TBA	tiobarbitur sav
TBARS	tiobarbitur sav-reaktív származékok
<i>t</i> BOOH	<i>tert</i> -butil-hidroperoxid

2. Bevezetés

A kommenzalistaként élő *Candida albicans* (Mavor és mtsai, 2005) rezisztensebb az oxidatív stresszre, mint a *Saccharomyces cerevisiae* (Jamieson és mtsai, 1996) és *Schizosaccharomyces pombe* (Smith és mtsai, 2004) élesztők, és képes *in vitro* adaptálódni a különböző oxidánsok által előidézett oxidatív stresszhez (Jamieson és mtsai, 1996). A *C. albicans* által termelt erőteljes antioxidánsok képesek megbirkózni a polimorfonukleáris leukociták (PMNL) és a makrofágok által termelt reaktív oxigén részecskékkel (ROS)(szuperoxid, peroxid, hipoklorit) továbbá a reaktív nitrogén intermedierekkel (RNIs) (nitrogén-oxid /NO/, peroxinitrit), melyek akkor keletkeznek, amikor a gombasejtek belépnek a véráramba és megfertőzik a szöveteket (Vázquez-Torres és Balish, 1997; Mavor és mtsai, 2005). A gomba antioxidáns védelemi rendszeréhez tartoznak a nagy ROS semlegesítő potenciállal rendelkező kis molekulatömegű metabolitok pld: a d-eritroaszcorbinsav (Huh és mtsai, 2001) és 2,4-(hidroxi)fenil-etanol (Cremer és mtsai, 1999), valamint azon potens enzimek, amelyek neutralizálják a ROS-t (kataláz, GPx, SOD, tioredoxin, tioredoxin reduktáz és metionin-szulfoxid reduktáz) és az RNIs-t (NO-responsive flavohemoglobin) (Enjalbert és mtsai, 2003; Fradin és mtsai, 2005; Ullmann és mtsai, 2004; Hromatka és mtsai, 2005). Ezen enzimrendszer fokozott működését mutatták be a *C. albicans* sejtekben, amikor az élesztősejteket a teljes vér vagy a szeparált PMNL-k (Fradin és mtsai, 2003, 2005), valamint a makrofágok hatásainak tették ki (Lorenz és mtsai, 2004). A fertőzés korai szakaszában a gombaellenes védekezésben a veleszületett immunrendszer, főként a PMNL-k szerepe a döntő, míg a monocitáknak és makrofágoknak inkább a szepszisek későbbi fázisaiban van kulcsfontosságú feladata (Vázquez-Torres és Balish, 1997).

Bár a patogén gombák antioxidatív enzimeit a "túlélés faktorainak" tekintjük (Mavor és mtsai, 2005), azáltal azonban, hogy elősegítik ezen mikroorganizmusok életben maradását a telepképzés és szövetek fertőzése közben, szűkebb értelemben véve mégis a virulencia faktorok közé sorolhatjuk (Hamilton és Holdom, 1999) és jelentőségük a gombák -különösen a mélyebb szövetek és a véredények irányába történő- elterjedésében és a folyamatosan változó környezethez való alkalmazkodásában felbecsülhetetlen (Hube, 2004). A *C. albicans* számos transzkripció programmal rendelkezik, beleértve az antioxidáns védelmi rendszer szabályozását is, amellyel lehetővé teszik, hogy a gomba ellenálljon a gazdaszervezet immunrendszere folyamatos támadásának (Lorenz és Fink, 2001; Fradin és mtsai, 2003, 2005;

Lorenz és mtsai, 2004; Smith és mtsai, 2004; Enjalbert és mtsai, 2006). Mindezek ismeretében érthető, hogy ha ezen kulcsfontosságú antioxidatív enzimek génjeinek a kódolásában valamilyen hiba keletkezik, akkor lelassulhat a növekedés [például a réz- és cinktartalmú szuperoxid dizmutáz (SOD1) esetében] (Hwang és mtsai, 2002), mérséklődhet a virulencia (például a SOD1 génben) (Hwang és mtsai, 2002) és csökkenhet a kórokozó életképessége a teljes vér vagy a PMNL-k jelenlétében [például SOD5 esetében, amely egy glikozil-foszfatidil-inozitolhoz (GPI) kötött SOD (Fradin és mtsai, 2005)].

A *C. albicans* bizonyos jellemző tulajdonságait virulencia faktoroknak tekintik. Az egyik ilyen virulencia tulajdonság a fenotípusos variabilitás (élesztő-hifa átalakulás lehetősége), hiszen mindkét morfológiai forma szerepet játszik a gomba életben maradásában, illetve a gazdaszervezet kolonizációjában. A morfogenezis létfontosságú a makrofágokban a *C. albicans* túlélése szempontjából, ugyanis fagocitózis után a gombasejtek csíratömlőt képeznek, amely a gazdasejt repedését idézheti elő és ezáltal a gomba ismételten kijuthat a véráramba (Lo és mtsai, 1997). A gombák által termelt extracelluláris proteázokat [például az aszpartát proteázok (Sap)] szintén lehetséges virulencia faktorokként tartják számon, amelyek különböző módon járulnak hozzá a kórokozó patogenitásához, és legalább részleges szerepet játszanak a hámréteg károsításában, hogy a gomba beléphessen a véráramba (Naglik és mtsai, 2004). Eddigi ismereteink alapján a Sap fehérjéket tíz homológ génből álló géncsalád kódolja, melyek tagjai a fertőzés során nem azonos szabályozás alatt állnak, ezáltal is hangsúlyozva, hogy az egyes izoenzimek egyéni speciális funkciókat látnak el (Naglik és mtsai, 2003). A Sap fehérjék közül a Sap1-3, amelyek mind az élesztő formában és a hifákban is megtalálhatóak, a nyálkahártyák fertőzéséhez szükségesek, míg a Sap4-6 fehérjék a hifákban vannak jelen, és inkább a szisztémás fertőzésekben játszanak szerepet (Felk és mtsai, 2002; Schaller és mtsai, 1999). A foszfolipázok megkönnyítik a gazdaszervezet fertőzését azáltal, hogy szerepet játszanak a sejtmembrán-komponensek degradációjában. A foszfolipáz gén (PLB1) erőteljesebben expresszálódik, amikor a gomba élesztő vagy pszeudohifa morfológiát mutat, mint a hifázó formában. A *plb1* null mutáns törzsek virulenciája csökkent mértékű (Leidlich és mtsai, 1998). Az invazív *C. albicans* törzsek több foszfolipázt termelnek, mint a nem invazív törzsek vagy kommenzalistaként élők (Ibrahim és mtsai, 1995).

Korábbi kutatások igazolták, hogy ha a *C. albicans* sejteket az immunrendszer hatásainak tesszük ki, akkor oxidatív stresszválaszt váltunk ki és ez gátló hatással van a gomba hifázó képességére (Fradin és mtsai, 2003, 2005), amely -mint már korábban említettem- egy rendkívül fontos virulencia faktor, ugyanis segíti a kórokozót abban, hogy kilépjen a véredényekből és a megtámadja a mélyebb szöveteket (Calderone és Fonzi, 2001;

Mavor és mtsai, 2005). Munkánk során megvizsgáltuk azt a feltételezést, hogy a krónikus oxidatív stresszhez való adaptálódás csökkenti a hífázó képességet és ezáltal csökken a patogenitás (Frandin és mtsai, 2003, 2005). Ennek érdekében a *C. albicans* sejteket növekvő koncentrációjú *t*-butil-hidroperoxiddal (*t*BOOH) kezeltük, amely egy oxidatív stresszt kiváltó vegyület (Emri és mtsai, 1999) és gyorsítja a lipidek peroxidációját a biológiai membránokban (Greenly és Daves, 1992). A biológiai membránokon a *t*BOOH által keletkezett oxidatív sérülések nagyon hasonlóak lehetnek a fagociták NADPH-oxidáz-mieloperoxidáz (MPO) rendszer okozta károsodásokhoz. A fagocita sejtek az MPO-t használják a kórokozók elpusztításához. A NADPH-oxidáz-MPO rendszer sokféle ROS-t, OCl⁻-t, tirozil-gyököt és nitrát intermediereket termel (Brennan és mtsai, 2001), amelyek a *t*BOOH-hoz hasonlóan eredményesen változtatják és oxidálják a lipideket a lipidperoxidációs útvonalakon keresztül (Savenkova és mtsai, 1994; Byun és mtsai, 1999). Fontos megjegyeznünk, hogy a *t*BOOH és H₂O₂ (a fagocita sejtek NADPH-oxidáza általi szuperoxid termelés egyik toxikus bomlásterméke) élettani és transzkripciós hatásai nagyon hasonlóknak tűntek a korábban megfigyelt oxidatív stressz válaszokkal és érzékenységgel *C. albicans*-ban (Singh és mtsai, 2004; Smith és mtsai, 2004; Enjalbert és mtsai, 2006).

3. Célkitűzések

Mint ahogy a bevezetőben már említettem, az egészséges egyének bőr és nyálkahártyáinak felszínén (szájüreg, bélrendszer, hüvely) bizonyos *Candida* fajok (például *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*) a normál mikrobiális flóra tagjaiként gyakran megtalálhatóak (Mavor és mtsai, 2005). A humán szervezet gombákkal szembeni immunválaszában a fagocita sejtek jelentős szerepet játszanak, mivel peroxidok termelésével pusztítják el a behatoló mikroorganizmusokat. Azonban a *C. albicans* laboratóriumi körülmények között képes adaptálódni a különböző oxidánsok által kiváltott oxidatív stresszhez.

Annak érdekében, hogy a krónikus oxidatív stressz által előidézett változásokat tanulmányozhassuk a *C. albicans*ban, *tBOOH* toleráns *C. albicans* mutánsokat hoztunk létre.

A doktori munkámban a következőket vizsgáltam meg:

- (1) Változik-e a létrehozott *tBOOH* toleráns *C. albicans* mutánsok (AF01-10) kialakult oxidatív stressz toleranciája a tárolás, az átoltások vagy passzálások hatására? (MIC_{tBOOH} érték és a GR enzimaktivitás vizsgálata alapján)
- (2) A krónikus oxidatív stresszhez történő adaptálódás *C. albicans* esetében gátolja-e az élesztő→hifa morfológiai átalakulást?
- (3) A *tBOOH* tolerancia kialakulása okozott-e változást az *in vitro* virulencia faktorokban (csírázási képesség, aszpartát proteáz aktivitás, foszfolipáz aktivitás, pszeudohifa és klamidospóra képzés) és hatással van-e az antigenicitásra?
- (4) Hogyan változik a *tBOOH* toleráns AF06 mutáns patogenitása egérben a *C. albicans* ATCC 14053 szülői törzshöz viszonyítva?
- (5) A *tBOOH* tolerancia hatással volt-e a sejtméretre és az élesztősejtek morfológiájára az AF06 mutánsban?
- (6) A *tBOOH* tolerancia mellett az egyéb oxidálószerekkel és az antifungális szerekkel szembeni ellenállóképesség változott-e az AF06 mutánsban?
- (7) Milyen változásokat tapasztalunk a GSH metabolizmusában a krónikus oxidatív stressznek kitett ATCC14053 *C. albicans*ban, illetve a stressztoleráns AF06 mutánsban?

- (8) Mivel a *t*BOOH a biológiai membránokban gyorsítja a lipidperoxidációs láncreakciókat, ezért megnéztük, hogy milyen hatással van a lipidösszetételre szülői (ATCC14053 *C. albicans*) és mutáns (AF06) törzsekben?
- (9) A *t*BOOH tolerancia hatással van-e a sejtlégzésre az AF06 *C. albicans*ban?
- (10) Klinikai izolátum *C. albicans* minták felhasználásával új *t*BOOH toleráns *C. albicans* mutánsok létrehozása, majd azok morfológiai és fiziológiai jellemzése annak érdekében, hogy megnézzük, hogy az AF06 törzs fenotípusa mennyire tekinthető általánosnak illetve könnyen kialakulnak-e az AF06 mutánshoz hasonló oxidatív stressz toleráns törzsek.
- (11) Végül klinikai izolátumok vizsgálatával igyekeztünk megválaszolni azt a kérdést, hogy milyen valószínűséggel jelenhet meg a természetben oxidatív stressz toleráns *C. albicans* mutáns?

4. Anyagok és módszerek

4.1. A *t*-BOOH toleráns *C. albicans* mutáns törzsek létrehozása a *C. albicans* ATCC 14053 szülői törzs és klinikai *C. albicans* izolátumok felhasználásával

4.1.1. Felhasznált törzsek és azok fenntartása

Kísérleteinkben először a *C. albicans* ATCC 14053 törzset használtuk a *t*-BOOH toleráns *C. albicans* (AF 01-10) törzsek létrehozásához, majd a későbbiekben kontroll törzsként a fiziológiai és virulencia vizsgálatokban. A további kísérletekben a következő táblázatban felsorolt 46 véletlenszerűen kiválasztott klinikai *C. albicans* izolátummal dolgoztunk, melyek a Debreceni Egyetem OEC Orvosi Mikrobiológia Intézetének gyűjteményéből származtak. A klinikai izolátum törzsek az emberi szervezet különböző helyeiről lettek izolálva. A szülői és mutáns törzsek fenntartása egyaránt Sabouraud táptalajon történt. A törzseket +4°C-on tároltuk és két-három havonta átoltottuk.

A Sabouraud táptalaj összetétele:

2% (w/v) glükóz

1% (w/v) pepton

2% (w/v) agar

pH=5.6

Sorszám	Beteg kora és neme	Mintavétel helye
8812	48 éves férfi	vér
19627	34 éves férfi	vér
7111	54 éves nő	vér
9076	76 éves nő	vér
21187	53 éves férfi	vér
3666	48 éves férfi	vér
10598	59 éves férfi	vér
9341	3 éves lány	vér
9522	3 éves lány	vér
9054	3 éves lány	vér
19368	31 éves nő	vér
17905	31 éves nő	vér
13092	12 éves fiú	vér
19888	59 éves nő	vér
10920	45 éves nő	vér
10477	82 éves férfi	vér
4780	42 éves nő	vér
16053	10 éves lány	vér
17471	35 éves férfi	vér
22497	26 éves nő	hüvely váladék
22748	20 éves nő	hüvely váladék
22570	8 éves fiú	torok váladék
22109	25 éves nő	torok váladék

Sorszám	Beteg kora és neme	Mintavétel helye
22179	1 napos fiú	fül
22173	23 éves nő	hüvely váladék
22893	65 éves nő	torok váladék
22761	71 éves nő	légcső
23733	57 éves nő	torok váladék
23838	3 hónapos fiú	torok váladék
23919	50 éves nő	hasi drénből
23943	26 éves nő	hólyagkatéter
23603	78 éves férfi	légcső
23685	57 éves férfi	légcső
23752	82 éves férfi	köpet
23918	50 éves nő	Kanül
24038	5 éves lány	hasüri drain
24596	1 napos fiú	gyomor
19890	59 éves nő	sebváladék
10934	45 éves nő	kanül
10668	82 éves férfi	sebváladék
4774	42 éves nő	vizelet
8387	10 éves lány	szájüreg
4278	48 éves férfi	vizelet
20072	34 éves férfi	hasüri drain
13637	3 éves lány	punktátum
17433	35 éves férfi	kanül

4.1.2 A *t*BOOH MIC (Minimális gátló koncentráció, Minimal Inhibitory Concentration) érték meghatározása

A törzsek *t*BOOH MIC értékét mikrodilúciós módszerrel határoztuk meg (Pócsi és mtsai, 2005). A *C. albicans* sejteket SBD tápoldatban (2% (w/v) glükóz, 1% (w/v) pepton; pH=5.6) tenyésztettük 17 órán keresztül, majd friss SBD tápoldatban készítettünk egy 0.1 optikai denzitású szuszpenziót 640nm-en (OD₆₄₀). Ebből a sejtuszuszpenzióból 5-5 ml-t mértünk kémcsövekbe és ezekhez adtuk hozzá a *t*BOOH-t 0-24 mmolL⁻¹ végkoncentrációban. A kémcsöveket forgó inkubátorba helyeztük és 28°C-on 72 órán keresztül figyelemmel kísértük a sejtek szaporodását. Azt a legkisebb koncentrációt, amely teljesen gátolta a sejtek szaporodását, a törzs MIC értékének tekintettük. A törzs tényleges MIC értékét a 48 órás adatok eredményezték.

4.1.3 A *t*BOOH toleráns *Candida albicans* mutáns törzsek létrehozása

A *t*BOOH toleráns mutánsokat a *Candida albicans* ATCC 14053 törzs és néhány véletlenszerűen kiválasztott klinikai izolátum (4774, 8387, 10934, 19890, 20072) egyre növekvő *t*BOOH koncentrációjú tápoldatban történő folyamatos tenyésztésével hoztuk létre (Fekete-Forgács és mtsai, 2000). A szülői törzsek sejtjeit 5ml SBD tápoldatban 17 órán keresztül növesztettük, majd friss SBD tápoldatban készítettünk egy 0,1 optikai denzitású szuszpenziót 640 nm-en. Ebből 20 ml-t egy 100ml-s lombikba mértünk és 10 órán keresztül 28°C-on 140rpm-en inkubáltuk. Ezt követően 2mmol L⁻¹ végkoncentrációban *t*BOOH-t adtunk a tenyészethez és további 14 órán keresztül inkubáltuk. Majd a *t*BOOH-t tartalmazó tenyészet sejtjeit még egymás után három alkalommal oltottuk át 2mmol L⁻¹ *t*BOOH-t tartalmazó SBD tápoldatba, és minden esetben 24 órán keresztül 28°C-on 140rpm-en inkubáltuk. A harmadik inkubálást követően a sejteket friss SBD tápoldatba helyeztük, amely szintén 2mmol L⁻¹ *t*BOOH-t tartalmazott és az optikai denzitást 0,1-re állítottuk $\lambda=640$ nm hullámhosszon, majd 10 óra elteltével a *t*BOOH koncentrációját 4 mmol L⁻¹-re növeltük és további 14 órás inkubálás következett. Ezt követően a sejteket ismét háromszor átoltottuk friss SBD tápoldatba, amely tartalmazta 4 mmol L⁻¹ végkoncentrációban a *t*BOOH-t és az átoltások között 28°C-on 24-24 óráig inkubáltunk.

A továbbiakban a *t*BOOH tartalmat az előzőekben leírt módon folyamatosan növeltük a 2 mmol L⁻¹-16 mmol L⁻¹ tartományban. A végső koncentráció, amelyet még az élesztősejtek elviseltek a 8 mmol L⁻¹. Ebből a kultúrából származó sejteket SDA lemezre szélesztettük, majd egy különálló telepet izoláltunk és azt neveztük el az azonosításhoz és MIC_{tBOOH} meghatározás után a *t*BOOH toleráns mutánsnak. Ezt a folyamatot egymással párhuzamosan 10 lombikban végeztük el a *Candida albicans* ATCC14053 törzssel és így kaptuk meg az AF 01-10 elnevezésű *t*BOOH toleráns mutáns törzseket. A klinikai izolátumokból pedig a 4774T, 8387T, 10934T, 19890T és 20072T mutáns törzseket hoztuk létre. Az azonosítást az API ID32C kit (bioMérieux) és CHROMagar *Candida* (Becton Dickinson) segítségével végeztük el. Minden új mutáns törzs *C. albicans*nak bizonyult.

4.1.4. A *t*BOOH toleráns fenotípus stabilitásának vizsgálata

A *t*BOOH toleráns mutánsokat 10 alkalommal egymás után SDA lemezre oltottuk és végül a 10. átoltást követően meghatároztuk a MIC_{tBOOH}-t. Minden mutáns törzs megtartotta a korábban meghatározott MIC_{tBOOH} értékét.

4.1.5. Specifikus glutation reduktáz enzim aktivitásának meghatározása

Az törzseket 5ml SDB tápoldatban egy éjszakán keresztül előtenyésztettük. Ezt követően egy 500ml-es lombikba 100 ml friss SDB-t mértünk, majd az előtenyésztett friss sejtekkel 640 nm-en 0,1-re állítottuk be az optikai denzitását. Az így elkészített tenyészetet 17 órán keresztül 28°C-on 140rpm-en inkubáltuk. Ezt követően a sejteket centrifugáltuk (4000 rpm, 10 perc, 4°C), majd háromszor mostuk 0.1 mol L⁻¹ K-foszfát puffer-rel (pH 7.0). Végül a sejteket 10 ml K-foszfát pufferben szuszpendáltuk és lefagysztottuk -20°C-on. A fagyasztott mintákat X 25 típusú X-press (AB Biox, Göteborg, Svédország) segítségével tártuk fel, majd centrifugáltuk és az így nyert sejtmentes felülúszót használtuk az enzimaktivitás meghatározásához (Emri és mtsai, 1999) A specifikus GR aktivitás meghatározása Pinto és munkatársai (1984) módszere szerint történt, az eredményt mkat(kg protein)⁻¹ mértékegységben adtuk meg. A fehérje koncentrációt Lowry módszere alapján (Peterson, 1983) határoztuk meg.

4.1.6. A telepmorfológia meghatározása

Annak érdekében, hogy megnézzük milyen hatással van a krónikus oxidatív stressz a *Candida albicans* telepek formájára és méretére, 50 µL gombaszuszpenziót (kb. 100 db sejtet tartalmazott) SDA-ra szélesztettünk. A telepek növekedését egy hétig 28°C-on követtük, közben a 3. és 6. napon megmértük az átmérőjüket és fényképeket készítettünk róluk. Minden törzs esetében 5 párhuzamos kísérletet végeztünk.

4.1.7. A növekedés vizsgálta SDB tápoldatban

A szülői és mutáns törzsek növekedését SDB tápoldatban is összehasonlítottuk. Ehhez a törzseket előtenyésztettük, majd egy 100 ml-es lombikban 20 ml (OD₆₄₀=0,1) sejtuszuszpenziót mértünk és 25 órán keresztül 140 rpm fordulattal rázattuk. A vizsgálat során a sejtek szaporodását spektrofotometriásan (OD₆₄₀) folyamatosan nyomon követtük

4.2. A *C. albicans* ATCC 14053 szülői törzs és *C. albicans* AF06 mutáns törzs illetve a klinikai izolátumok és a belőlük létrehozott mutánsok morfológiai és élettani összehasonlítása

A 10 létrehozott *t*BOOH toleráns mutáns közül kiválasztottunk egyet (AF 06), amely átlagos *t*BOOH toleráns tulajdonságokkal rendelkezett és a további vizsgálatok során ezen törzs tulajdonságait hasonlítottuk össze a szülői törzssel. Az AF 06 elnevezésű törzset a Debreceni Egyetem Mikrobiális Biotechnológiai és Sejtbiológiai Tanszékének gyűjteményébe helyeztük el.

4.2.1. A patogenitás, in vitro virulencia faktorok és antigenicitás meghatározása a *C. albicans* törzseknél

4.2.1.1. A *C. albicans* ATCC 14053 szülői törzs és *C. albicans* AF06 mutáns törzs patogenitásának vizsgálata állatkísérletben

4.2.1.1.1. A kontroll és a *t*BOOH toleráns mutáns LD₅₀ értékének meghatározása egér modellben

Az élesztősejteket egy éjszakán keresztül 5 ml SDB tápoldatban, 28°C-on tenyésztettük, majd a sejteket háromszor steril foszfát pufferrel (PBS; 0.2 molL⁻¹ Na₂HPO₄ / NaH₂PO₄ és 0.15 molL⁻¹ NaCl, pH 7.2) mostuk, majd végül steril PBS-ben szuszpendáltuk azokat. Bürker kamra segítségével megszámloltuk a sejteket és megfelelő hígítással elkészítettük az oltáshoz szükséges sejtsuszpenziókat. A kísérletben 13-17g tömegű nőstény NMRI-SPF egereket (Charles River Kft., Magyarország, Budapest) használtunk. Állatonként 0,5 ml *C. albicans* szuszpenziót fecskendeztünk a farok vénába, amely 1 x10⁷, 2 x10⁶, 4 x10⁵, 8 x10⁴, 1,6 x10⁴ vagy 3,2 x10³ számú élesztősejtet tartalmazott. Koncentrációnként és törzsenként 5-5 egeret használtunk. Az egerek túlélését két héten keresztül, napi ellenőrzéssel végeztük. A kontroll és mutáns törzs LD₅₀ értékének meghatározásához Spearman-Kärber módszerét (Kärber, 1931) alkalmaztuk.

4.2.1.1.2. Egér intraperitoneális oltás

A sejteket a 2.1.1.1. pontban leírt módon előkészítettük és 2×10^6 db sejt/ml-es szuszpenziót készítettünk. Ebből a szuszpenzióból 0,5 ml-t fecskendeztünk az egerek intraperitoneális üregébe. Törzsenként 4-4 egeret használtunk. Az oltást követő 4. és 24. órában 2-2 egeret elpusztítottunk és a peritoneális üregüket 1ml PBS-sel kimostuk. Majd a mosófolyadékból SDA lemezre szélesztettünk a sejtszám meghatározása érdekében. Mindkét időpontban az egerek veséit is kipreparáltuk, formalinnal fixáltuk és paraffinba ágyasztuk. A hisztológiai vizsgálathoz, hogy a *C. albicans* sejtek jelenlétét igazolhassuk és a morfológiájukat megfigyelhessük, ezen mintákat perjódsavas-Schiff technikával (Frankel és mtsai, 1970) megfestettük.

4.2.1.2. *In vitro* virulencia faktorok vizsgálata

4.2.1.2.1. Csírázás vizsgálata birka szérumban a *C. albicans* ATCC 14053 szülői és *C. albicans* AF06 mutáns törzseknél

A sejteket egy éjszakán keresztül 5 ml SDB tápoldatban, 28°C-on tenyésztettük. Centrifugáltuk (4000rpm, 10 perc), majd háromszor mostuk steril desztillált vízzel. A sejtkoncentrációt steril desztillált vízben 5×10^7 db sejt/ml-re állítottuk be, majd ebből a sejtsuszpenzióból 0,25 ml-t egy kémcsőbe mértünk és hozzáadtunk 2,25ml birka szérumot. Ezt követően 37°C-on 180 percig rázó inkubátorban helyeztük. A tenyészetekből 30, 60, 120 és 180 perc elteltével mintát vettünk és mikroszkóp segítségével meghatároztuk a csírázó sejtek arányát.

4.2.1.2.2. Az extracelluláris aszpartát proteáz (EAP) aktivitás meghatározása a *C. albicans* ATCC 14053 szülői és *C. albicans* AF06 mutáns törzseknél

Az élesztősejteket a 2.1.2.1. pontban leírtak alapján előkészítettük. Mosás után a sejtkoncentrációt 1×10^6 db sejt mL^{-1} -re állítottuk steril desztillált vízben. 50 μl -t ebből a sejtsuszpenzióból 5 ml 0.2 w/v % borjú szérumban albumint (BSA) és 1.2 w/v % yeast carbon base-t (YBC) tartalmazó tápoldatba (pH 4.0) mértünk, majd rázatva 72 órán keresztül 28°C-on tenyésztettük. Centrifugálással eltávolítottuk a sejteket és a méréshez a sejtmentes felülúszót használtuk. Az enzimaktivitás meghatározását Remold módszere (1968) szerint

végeztük. Ennek megfelelően 0,5ml felülúszót 2 ml 2 w/v %-os BSA-oldattal (pH 3.2) 37°C-on 1 órán keresztül rázattuk, majd a reakciót 5 ml 5 w/v % triklór-ecetsav-oldat hozzáadásával állítottuk le. Centrifugálás után (10000 rpm, 10 perc, 4°C) a proteolitikus termékek mennyiségét 280 nm-en történő fotometrálassal határoztuk meg.

4.2.1.2.3. Az extracelluláris foszfolipáz (EP) aktivitás meghatározása a *C. albicans* törzseknél

A *C. albicans* sejteket a 2.1.2.1. pontban leírtak alapján előkészítettük. Ezt követően a sejtszámot fiziológias (0,9% (w/v)) sóoldatban 1×10^7 db sejt/ml-re állítottuk. A szuszpenzióból 5 μ l-t cseppentettünk tojássárgája-agar [5,85% (w/v) NaCl, 0,05% (w/v) CaCl₂ és 10% (w/v) steril tojássárgájával kiegészített SDA] felületére, majd 5 napig 28°C-on növesztettük a sejteket (Ibrahim és mtsai, 1995). A telepek körüli feltisztulási zóna átmérője adta meg a EP aktivitást (Samaranayake és mtsai, 1984).

4.2.1.2.4. Pszeudohifa és klamidospóra képzés vizsgálata kukoricaliszt táptalajon a *C. albicans* törzseknél

A törzseket egy éjszakán keresztül 5 ml SDB tápoldatban, 28°C-on előtenyésztettük, centrifugáltuk (1800g, 10 perc, 4°C), háromszor mostuk steril foszfát pufferrel (PBS; 0.2 mol L⁻¹ Na₂HPO₄ / NaH₂PO₄ és 0.15 mol L⁻¹ NaCl, pH 7.2), majd végül steril PBS-ben 1×10^7 db sejt mL⁻¹-re állítottuk a sejtszámot. 5 μ l-t ebből a szuszpenzióból kukoricaliszt-agar lemezre [0,19% (w/v) kukoricaliszt-agar és 1% (w/v) Tween-80] cseppentettünk, steril fedőlemezzel lefedtük és 62 órán keresztül 28°C-on inkubáltuk. A pszeudohifa és clamidospóra képzést mikroszkóp segítségével vizsgáltuk.

4.2.1.2.5. Hifázó képesség vizsgálata Spider táptalajon a *C. albicans* törzseknél

Az élesztősejteket 2.1.2.4. pont szerint előkészítettük és steril PBS-ben 5×10^4 db sejt mL⁻¹-re állítottuk a sejtszámot. 5 μ l-t ebből a szuszpenzióból Spider táptalaj [1% (w/v) nutrient broth, 1% (w/v) glükóz, 0,2% (w/v) K₂HPO₄ és 1,35% (w/v) agar] felszínére cseppentettünk és 10 napig 28°C-on inkubáltuk.

4.2.1.2.6. A polimorfonukleáris leukociták (PMNL) szuperoxid termelésének vizsgálata a *Candida albicans* ATCC 14053 szülői és *Candida albicans* AF06 mutáns törzs hatására

A törzsek antigenicitását a PMNL sejtek által termelt szuperoxid-gyök mennyiségi meghatározásával jellemeztük. A szuperoxid-gyök termelést spektrofotometriás módszerrel, a citokrom-c redukciójának mérésével határoztuk meg (Babior és mtsai, 1970). A vizsgálat során 96 lyukú mikrotiter lemezt használtunk és az eredményt ELISA leolvasó segítségével kaptuk meg (Varga és mtsai, 2001).

Teljes vérből PMNL sejteket szeparáltunk a következő módon: 5 ml vért 5 ml Histopaque (poliszukróz 5,7 g/dl és Na-diatrizoate 9 g/dl) felszínére mértünk, majd 30 percig 400 g fordulattal 4°C-on centrifugáltuk Boyum (1984) módszere szerint. A felülúszót eltávolítottuk, az üledékhez 4 ml 3% (w/v) dextránt tartalmazó PBS-t adtunk és kb. fél órán keresztül 37°C-on inkubáltuk, hogy a PMNL sejteket a vörösvértestektől elkülöníthessük. A felülúszót, amely PMNL sejteket tartalmazta, összegyűjtöttük, centrifugáltuk 10 percig 250 g fordulattal, majd hipotónikus pufferral mostuk, hogy a maradék vörösvértesteket is eltávolítsuk, és tiszta PMNL sejtpopulációt nyerjünk. Ezt követően a sejteket kétszer mostuk Hank's oldattal (HBSS, pH 7.4) és Bürker kamra segítségével meghatároztuk a sejtszámot. A sejtpopuláció tisztaságát (>95%) és életképességét (>95%) Giemsa és tripánkék festéssel mikroszkópikus módszerrel vizsgáltuk (Varga és mtsai, 2001).

A *C. albicans* sejteket 5 ml SDB tápoldatban egy éjszakán keresztül előtenyésztettük 28°C-on, majd centrifugáltuk (4000 rpm, 10 perc, 4°C) és kétszer mostuk HBSS oldattal. Humán szérummal opsonizáltuk 30 percig 37°C-on, majd ismét mostuk HBSS oldattal. Ezt követően a frissen szeparált PMNL sejtekkel 1:100-1:25 arányban szuszpenziót készítettünk és 60 percig 37°C-on inkubáltuk. Hogy detektálhassuk a szuperoxid-gyök termelését, minden mintához 50 µl citokrom-c-t adtunk 80 µmol L⁻¹ végkoncentrációban. Az ELISA leolvasó segítségével 550 nm-en (citokrom-c redukció) és 492 nm-en (alapvonal) megmértük az abszorbancia értékeket. Minden mintából három párhuzamos mérést végeztünk. Kontrollként a PMNL sejteket forbol-12-mirisztrát-13-acetát (PMA, végkoncentráció: 100 nmol L⁻¹) vagy N-formil-Met-Leu-Phe (FMLP, végkoncentráció: 10 nmol L⁻¹) segítségével aktiváltuk *C. albicans* sejtek helyett.

4.2.2. A *C. albicans* törzsek sejttani és fiziológiai vizsgálata

4.2.2.1. A *C. albicans* ATCC 14053 szülői és *C. albicans* AF06 törzsek sejtmeretének meghatározása scanning elektronmikroszkóp segítségével

A sejteket 1.5. pontban leírtak alapján tenyésztettük, centrifugáltuk (4000 rpm, 10 perc, 4°C), majd 0.1mol L⁻¹ kálium-foszfát pufferben (0.1mol L⁻¹ KH₂PO₄, pH 7.0) 1x10⁶ mL⁻¹ szuszpenziót készítettünk. A sejteket 2,5%-os glutáraldehid-oldat és 1%-os ozmium-tetroxid-oldat segítségével fixáltuk, 10%-os etanolba helyeztük és a sejtekből az etanol koncentrációjának folyamatos növelésével vontuk ki a vizet (Arancia és mtsai, 1995). A preparátumokat végül vákumszáritóban szárítottuk. A sejtek felszínét arannyal vontuk be és AMRAY 1830-I típusú scanning elektronmikroszkóp (Amray Inc. Bedford, MA) segítségével vizsgáltuk. A sejtmeret meghatározása a LABVIEW IMAQ VISION szoftver (National Instruments, Austin, TX) segítségével történt.

4.2.2.2. A *C. albicans* ATCC 14053 szülői és *Candida albicans* AF06 törzsek sejtjeinek szerkezeti felépítésének vizsgálata transzmissziós elektronmikroszkóppal

A sejteket a 1.5. pontban leírtak alapján előkészítettük és a centrifugálás után háromszor mostuk hideg PBS-sel, majd PBS-ben 1x10⁶ db sejt/ml sejtszámot állítottunk be. Ezt követően 1 órán keresztül frissen készített 2%-os KMnO₄-oldattal festettük szobahőmérsékleten, majd ismét mostuk. Az elektronmikroszkópos felvételeket Jeol Jam-1010 típusú transzmissziós elektronmikroszkóppal készítettük (JEOL, Tokyo, Japan) és a két törzs (ATCC 14053 és AF06) sejtfalának, sejtmagjának és mitokondriumainak szerkezeti összehasonlítását vizuálisan végeztük el.

4.2.2.3. A *C. albicans* ATCC 14053 szülői és *C. albicans* AF06 törzsek mitokondriumainak morfológiai és funkcionális vizsgálata

A sejteket 1.5. pontban leírtak alapján előkészítettük, majd 10 ml minimál tápoldatban [1 % (w/v) glükóz, 0.5 % (w/v) (NH₄)₂SO₄, 0.25 % (w/v) KH₂PO₄, 0.05 % (w/v) MgSO₄ 7H₂O és 1 % (v/v) Wickerham oldat] 4 vagy 8 órán keresztül tenyésztettük (kezdeti OD₆₄₀ =0.1) 28°C-on. Ezen tenyészetekből 1 ml-t 30 percig festettünk MitoTracker Red festékkel

[0.1 $\mu\text{mol L}^{-1}$; (Macho és mtsai, 1996); Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA]. A MitoTracker Red festéssel festett *C. albicans* sejteket centrifugáltuk, (4000 rpm, 10 perc, 4 °C), majd mostuk és szuszpendáltuk 1 ml glükózmentes minimal tápközegben, és a mitokondriumok fluoreszcenciájának intenzitását LSM 510 META lézer scanning konfokális mikroszkóppal (Zeiss, Oberkochen, Germany; $\lambda_{\text{excitation}}=543$ nm, $\lambda_{\text{emission}}=615$ nm) long pass filter alkalmazásával vizsgáltuk.

4.2.2.4. A *C. albicans* törzsek oxidatív stresszt kiváltó anyagokkal és antimikotikumokkal szembeni érzékenységének vizsgálata

4.2.2.4.1. A H_2O_2 , menadion nátrium biszulfid (MSB) és NaOCl MIC értékek meghatározása

A törzsek MIC értékeinek meghatározása az 1.2. pontban leírtak alapján történt. A vizsgált ágensek és koncentráció-tartományok a következők voltak: 0-250 mmol L^{-1} , H_2O_2 ; 0-5 mmol L^{-1} , MSB és 0-100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, NaOCl. Az a legkisebb oxidáns koncentráció, amely teljesen gátolta a sejtek szaporodását, eredményezte a MIC értéket.

4.2.2.4.2. Az antifungális anyagok (flukonazol, vorikonazol, 5-fluorocitozin, amphotericin B) MIC értékek meghatározása

A flukonazol (Pfizer), vorikonazol, és az 5-fluorocitozin (5FC) vegyületeket steril desztillált vízben, míg az amphotericin B-t 100%-os dimetil-szulfidban oldottuk fel. Az elkészített tömény antifungális oldatokat RPMI 1640 tápoldatban hígítottuk, amely tartalmazott L-glutamint, de bikarbonát mentes volt. A vizsgált koncentrációk: 0,12 – 64 mgL^{-1} a flukonazol az 5FC és vorikonazol esetében, továbbá 0,007 – 8 mgL^{-1} az amphotericin B-nél (NCCIS M27-A2 alapján, 1997, 2002).

Az élesztősejtek koncentrációját RPMI 1640 tápoldatban 10^3 sejt/ml sűrűségűre állítottuk be. A vizsgáltot 96 lyukú mikrotiter lemezen végeztük el 35°C-on és az eredményeket 48 óra eltelte után vizuálisan olvastuk le. Minden lemezre csak sarjadzó gombát illetve csak antifungális anyagot tartalmazó kontroll mintákat is elhelyeztünk.

4.2.3. Az antioxidáns védelmi rendszer elemeinek és a ROS termelésének meghatározása a *C. albicans* törzseknél

4.2.3.1. Specifikus antioxidáns enzimaktivitások meghatározása

Az élesztősejteket az 1.5. pontban leírtak alapján tenyésztettük. A 17 órás inkubációs időben a 12 óra elteltével a ATCC 14053 szülői törzs egyik lombikjához 1 mmol L⁻¹, az AF 06 mutáns törzs egyik lombikjához pedig 6 mmol L⁻¹ koncentrációban *t*BOOH-t adtunk, majd tovább inkubáltuk még 5 órán keresztül. Így kaptuk meg a további vizsgálatokhoz az oxidatív stressznek kitett sejtpopulációt. A 17 óra leteltével a sejteket centrifugáltuk (4000 rpm, 10 perc, 4°C), majd háromszor mostuk 0.1 mol L⁻¹ K-foszfát puffer-rel (pH 7.0, 4°C). Végül a sejteket 10 ml K-foszfát pufferben szuszpendáltuk és lefagyasztottuk -20°C-on. A fagyasztott mintákat X-perss (AB Biox, Göteborg, Svédország) segítségével feltörtük, majd 1,44 mM α -toluil-szulfonil-fluorid (PMSF) proteázgátlóval kezeltük, centrifugáltuk (20000 g, 10 perc, 4°C) és az így nyert sejtmentes felülúszót használtuk az enzimaktivitások meghatározásához [kivéve a γ -glutamiltranszpeptidáz (γ GT) aktivitás meghatározását]. Az egyes enzimeknél a reakcióelegy végtérfogata 1 ml volt és 10% (v/v) minta mellett a következő komponenseket tartalmazták:

glutation peroxidáz (GPx) (Chiu és mtsai, 1976)

50 mM Tris-HCl (pH=7.6), 0,091 mM EDTA, 0,12 mM NADPH, 0,25mM GSH, 440 UI⁻¹ GR (*Saccharomyces cerevisiae*; 1 U az az enzim mennyiség, amely 1 perc alatt 1 μ mol GSSG-t redukál), 0,1 mM kumén hidroperoxid, λ =340 nm; t= 1 perc

glutation S-transzferáz (GST), (Warholm és mtsai, 1985)

0,1 M Na-foszfát puffer (pH=6.5), 1 mM EDTA, 1 mM GSH, 1 mM CDNB, λ =340 nm; t= 1 perc

kataláz (Roggenkamp és mtsai, 1974)

20 mM Hepes (pH=7.6), 0,1 mM H₂O₂, λ =240 nm; t= 1 perc

szuperoxid dizmutáz (SOD) (Oberley és Spitz, 1984)

teljes SOD [SOD(CuZn) + SOD(Mn)] aktivitásnál 50 mM Na-foszfát puffer (pH=7.8), 1,4 mM Nitro Blue Tetrazolium (NBT), 0,2 mM xantin, 10 UI⁻¹ xantin oxidáz (tehén

tej; 1 U az az enzim mennyiség, amely 1 perc alatt 1 μmol xantint alakít át karbamiddá), 1000 UI^{-1} kataláz (marha máj; 1 U az az enzim mennyiség, amely 1 perc alatt 1 μmol H_2O_2 -t bont el). $\lambda=560$ nm; $t=90$ mp

Mértékegysége: $\text{unit}(\text{mg protein})^{-1}$, ahol 1 U az az enzim mennyiség, amely az NBT redukciójában 50%-os gátlást okozott.

glükóz-6-foszfát dehidrogenáz (G6PD) (Emri és mtsai, 1994)

20 mM Hepes (pH=7.6), 1 mM glükóz-6-foszfát, 1 mM NADP, 10 mM MgCl_2 ,
 $\lambda=240$ nm; $t=1$ perc

γ -glutamiltranszpeptidáz (γ GT) (Emri és mtsai, 1997)

0,1 M Tris-HCl (pH=8.0), 20 mM glicil-glicin, 1 mM γ -glutamil-*p*-nitroanilid,
 $\lambda=410$ nm; $t=1$ perc

A méréshez az X-press-el feltárt és PMSF-el kezelt, de még nem centrifugált sejtmentes kivonatot használtuk. Az 1 órás szobahőmérsékleten történő inkubációt követően a mintákat centrifugáltuk (20000 g, 10 perc, 4°C) és a felszabadult *p*-nitroanilid mennyiségét határoztuk meg.

A fehérje koncentrációt Lowry módszere alapján (Peterson, 1983) határoztuk meg.

4.2.3.2. Az oxidált és redukált glutation mennyiségének meghatározása

Az élesztősejteket az 1.5. pontban leírtak alapján tenyésztettük, majd törzsenként 50 ml tenyészetet centrifugáltuk (1800g, 10 perc, 4°C) és 4°C-os, 5 % (v/v) 5'-szulfoszalicilsav oldatban tártuk fel (Emri és mtsai, 1999). A mintákat centrifugáltuk (11000 g, 10 perc, 4°C) és a felülúszót 0°C-on trietanolamin segítségével közömbösítettük, majd ezek után használtuk fel a mérésekhez.

Az oxidált glutation (GSSG) reakcióelegye (Anderson, 1985): 115 mM Na-foszfát puffer (pH=7.5), 50 mM EDTA, 0,6 mM 5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzoesav) (DTNB), 0,2 mM NADPH, 1,5 kUI^{-1} GR (*S. cerevisiae*; 1 U az az enzim mennyiség, amely 1 perc alatt 1 μmol GSSG-t redukál), 10% (v/v) minta. $\lambda=412$ nm A minták redukált glutation (GSH) tartalmát 2-vinilpiridines (185 mM, 1 óra, pH=6.0-7.0) kezeléssel reagáltattuk el.

A GSH tartalom meghatározása (Anderson, 1985) oly módon történt, hogy a minták teljes glutation (GSH+GSSG) tartalmát mértük meg (a 2-vinilpiridines kezelés elhagyásával és a GSSG tartalom ismeretében határoztuk meg a GSH mennyiségét.

A mért GSH és GSSG mennyiségeket a sejtek fehérje tartalmára vonatkoztattuk és $\text{mmol}(\text{kg protein})^{-1}$ mértékegységben adtuk meg.

4.2.3.3 A szuperoxid és peroxid tartalom meghatározása

A sejteket az előző pontban leírt módon tenyésztettük és feltártuk. A szuperoxid (Carter és munkatársai, 1994) tartalom meghatározásához a tenyészethez hidroetidint (Molecular Probes Europe BV, Leiden, Hollandia), a peroxid tartalom méréséhez pedig 2'.7'-diklorofluoreszen diacetátot (Molecular Probes Europe BV, Leiden, Hollandia) adtunk $10 \mu\text{M}$ -os koncentrációban. Az egy óra alatt képződő etidium (Et), illetve 2'.7'-diklorofluoreszen (DCF) koncentrációját Jasco 821-FP típusú spektrofluoriméterrel határoztuk meg ($\lambda_{\text{ext, Et}}=488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em, Et}}=610 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{ext, DCF}}=502 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em, DCF}}=523 \text{ nm}$). A képződött Et és DCF mennyiségét a sejtek fehérje tartalmára vonatkoztattuk és $\text{mmol}(\text{kg protein})^{-1}$ mértékegységben adtuk meg.

4.2.4. A zsírsavösszetétel és a lipidperoxidációs termékek meghatározása

4.2.4.1. A zsírsavösszetételben és neutrális lipidekben bekövetkezett változások vizsgálata

A sejteket az 1.5. pontban leírtak alapján tenyésztettük, centrifugáltuk és feltártuk. Ezt követően 2ml feltárt mintát (ATCC 14053, ATCC 14053 1 mmol L^{-1} tBOOH-val kezelt, AF06, AF06 6 mmol L^{-1} tBOOH-val kezelt) 3 ml kloroform/metanol 2:1 eleggyel szuszpendáltuk, majd még 2 ml kloroformot adtunk hozzá Blight és Dryer módszere szerint (1959). A lipideket tartalmazó frakciót leszívtuk, majd N_2 segítségével szárítottuk. A zsírsav összetételt Hewlet Packard 5890 gázkromatográf és Hewlet Packard 5970 tömegspektrométer segítségével határoztuk meg. A zsírsavak azonosításához kontroll zsírsavakat (Sigma, St Louis, Mo, USA) használtunk. A neutrális lipid összetételt vékonyréteg kromatográfiás módszerrel határoztuk meg. A nitrogénnel szárított mintákat $50 \mu\text{L}$ kloroformban visszaoldottuk, majd Silicagel G (Mecrk, Darmstadt, D) felszínére csepegtettük. A lemezt n-hexán-éter-ecetsav (80:40:1 v/v) eleggybe helyeztük, majd 5 % foszfor-molibdén-sav (50 %

etanol és 10 % perklórsav) segítségével láthatóvá tettük (Varga és mtsai, 1997). Ezt követően a lemezeket 10 percig 100°C-on tartottuk

4.2.4.2. A lipidperoxidációs termékek mennyiségi és minőségi meghatározása

A törzseket az 1.5. pontban leírtak alapján tenyésztettük, centrifugáltuk és feltártuk. Ezt követően 2 ml feltárt mintát (ATCC 14053, ATCC 14053 1 mmol L⁻¹ tBOOH-val kezelt, AF06, AF06 6 mmol L⁻¹ tBOOH-val kezelt) 3ml kloroform/metanol 2:1 eleggyel szuszpendáltuk.

Malondialdehid (Tiobarbitursavas módszer) (Balla és mtsai, 1991)

Reagens: 0,375 g 2-tiobarbitursav, 2,08 mL 12M HCl, 15mL 10%-os triklór-ecetsav; 100 mL-re desztillált vízzel kiegészítve.

A méréshez 2-szeres mennyiségű reagenst használunk. (1:2=minta:reagens)

Az elegyet 90°C-on 20 percig forraljuk, majd butanollal extraháljuk és a felülúszót fotometráljuk. $\lambda=532$ nm

Konjugált dién (Balla és mtsai, 1991)

A kloroformos extraktból 1mg mL⁻¹-es ciklohexán oldatot készítettünk. $\lambda=234$ nm

Ez csak viszonyszám.

Lipidhidroperoxid (KI módszerrel) (Balla és mtsai, 1991)

A beparlás után a csövekbe kloroformot és ecetsavat teszünk, ami a szolubilizációt segíti. Készítünk egy KI- oldatot, majd rámérünk 40 μ l-t a mintánkra és 5 percre sötétbe helyezzük. Hozzáadunk 600 μ l Cd-acetátot, hogy leállítsa a reakciót, majd centrifugáljuk (10 perc, 10000 g) és a felső fázist fotometráljuk. $\lambda=353$ nm

4.2.5 Légzés vizsgálata a *Candida albicans* törzsekben

A légzési lánc elemei O₂ jelenlétében valószínűleg kiváltképp és/vagy fenntartanak lipidperoxidációs láncreakciókat (Evans és mtsai, 1998). A légzési lánc bizonyos elemei, ha elromlanak, akkor csökkenthetik a légzést és az elektronhalmozódás miatt növelik a ROS generálódását. Ennélfogva az AF06 mutáns tBOOH toleranciája szintén származhat a citokróm c-függő légzés csökkenése miatt. Másrészt a szalicilhidroxamát (SHAM) légzés

indukciója szintén oxidatív stressz toleráciát idézhet elő a mutáns törzsünkben (Huh & Kang, 2001). A légzés meghatározásához a törzseket az 1.5. pontban leírt módon tenyésztettük és kezeltük, majd 15 ml mintát 28°C-on az OXY 320-típusú oxigén elektród (WTW, Weilheim, Gemany) (Bahr és Bonner, 1973; Emri és mtsai, 2004) segítségével lemértünk. A citokróm c (cianid érzékeny) útvonal gátlásához 2.5 mmol L⁻¹ KCN-t , míg az alternatív oxidáz útvonal (AOX)(cianid rezisztens) gátlásához 0,75 mmol L⁻¹ SHAM-t használtunk.

4.3. Statisztikai módszerek

A statisztikai elemzésekhez, hacsak másként nem jeleztük, akkor mindig 3-5 független kísérlet átlagát és azok szórását (S.D.) határoztuk meg. Szignifikancia-számításoknál általában a Student's *t*-tesztet használtuk, és a változásokat $p < 5\%$ esetén tekintettük szignifikánsnak.

4.4. Felhasznált vegyszerek

A kísérleteinkben felhasznált finomvegyszerek mindegyike analitikai minőségű volt, és ha másként nem lettek jelölve, akkor a Sigma-Aldrich Kft. (Budapest, Magyarország) termékei voltak.

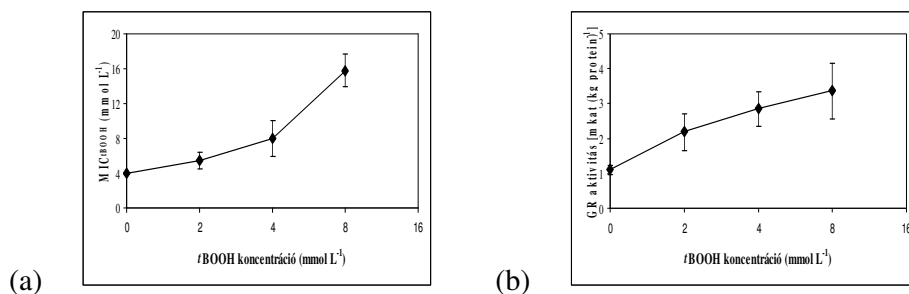
5. Eredmények

5.1. A *t*-BOOH toleráns *C. albicans* mutáns törzsek létrehozása és ezen törzsek összehasonlítása az ATCC 14053 törzssel

Annak érdekében, hogy megvizsgálhassuk a *t*BOOH rezisztencia kialakulása során a sejtekben végbemenő változásokat, létrehoztunk 10 darab *t*BOOH toleráns *C. albicans* mutáns törzset (AF 01-10) az ATCC 14053 szülői törzs sejtjeinek fokozatosan növekvő *t*BOOH koncentráció jelenlétében történő tenyésztésével.

5.1.1. A szülői és mutáns törzsek *t*BOOH MIC értékének és GR aktivitásának meghatározása

Miközben a *t*BOOH koncentrációját fokozatosan növeltük a tápközegben (2-16 mmol⁻¹) az általunk megvizsgált mutáns törzsek *t*BOOH MIC értéke és GR aktivitása is folyamatosan növekedett (1. ábra) addig, amíg el nem értük a maximális 8 mmol⁻¹ koncentrációt. Ettől nagyobb koncentrációban (16 mmolL⁻¹) a *t*BOOH már progresszív sejthalált eredményezett a sarjadzó gombánál. Az szülői törzs *t*BOOH MIC értéke 4 mmol⁻¹ és GR aktivitása 1,1 ± 0,15 [mkat (kg protein)⁻¹], míg a mutáns törzsek *t*BOOH MIC értéke 16 mmol⁻¹-ra GR aktivitása pedig 3,36 ± 0,81 [mkat (kg protein)⁻¹]-ig növekedett. A kialakult *t*BOOH tolerancia nagyon stabilnak bizonyult, ugyanis a mutáns törzsek egymás után 10 alkalommal *t*BOOH mentes SDA lemezen történő átoltását követően sem változtak a megnövekedett *t*BOOH MIC és specifikus GR aktivitás értékek.



1. Ábra A *t*BOOH tolerancia (a) és a specifikus GR aktivitás (b) változása a *C. albicans* ATCC 14053 törzsből származó mutánsokban, miközben a tápoldat *t*BOOH koncentrációját 0-8 mmolL⁻¹ között növeltük. A mutánsok létrehozása és jellemzése 10 független vizsgálat

eredménye. Sem a MIC_{tBOOH} , sem a GR aktivitás nem volt meghatározható a 16 mmolL^{-1} $tBOOH$ -t tartalmazó tenyésztést követően, mert az élesztősejtek a kezelés hatására elpusztultak.

5.1.2. A szülői és mutáns törzsek telepméretének és hifázó képességének jellemzése

Nem tapasztaltunk különbséget az AF 01-10 mutáns törzsek és az ATCC 14053 szülői törzs telepmérete között a kioltás utáni 2, 3 és 5 napos inkubációs időt követően, és nem találtunk olyan telepeket sem, amelyek petite morfológiát mutattak volna.

Ugyanakkor Spider táptalajon az AF 01-10 mutáns törzsek hifázó képessége elhanyagolható méretű volt a szülői törzshöz viszonyítva, amelyet az oxidatív stressz tolerancia kialakulását követő csökkent hifázó képességgel magyarázhatunk.

5.2. Az AF06 $tBOOH$ toleráns mutáns törzs és az ATCC 14053 szülői *C. albicans* törzs patogenitási, morfológiai és fiziológiai jellemzése

Kiválasztottunk egy átlagos $tBOOH$ toleranciával rendelkező mutáns törzset (AF06) az általunk létrehozott 10 mutáns közül és a további, $tBOOH$ tolerancia kialakulásával kapcsolatos további élettani és morfológiai változásokat már csak az AF06 és ATCC 14053 törzsek összehasonlításával tanulmányoztuk.

5.2.1. A $tBOOH$ tolerancia hatása a növekedésre

A két törzs növekedését SDB tápoldatban való tenyésztés során hasonlítottuk össze. Azt tapasztaltuk, hogy a $tBOOH$ toleráns mutáns AF06 törzsünk növekedése az egész tenyésztési időszak alatt elmaradt a szülői törzs értékeitől, azonban a 25 óra eltelte után már ilyen különbséget nem láttunk.

5.2.2. A tBOOH tolerancia kialakulása megváltoztatta az *in vitro* virulencia faktorokat, mérsékelte a patogenitást, azonban az antigenicitásra nem volt hatással

5.2.2.1. A virulencia faktorokban bekövetkező változások vizsgálata

5.2.2.1.1. A csírázási képesség vizsgálata birka szérumban

A csírázási képességet mindkét törzsnél 180 percig vizsgáltuk, miközben a 30. és 60. percben mintákat vettünk. Azt tapasztaltuk, hogy az AF06 mutáns törzs csírázóképesége a vizsgálat első 30 percében jelentősen elmarad a szülői törzsetől (1. táblázat), majd folyamatosan egyre inkább megközelíti azt és a 180. percben már nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget ($95\pm 7\%$ és $97\pm 5\%$) a két törzs között.

5.2.2.1.2. Az extracelluláris aszpartát proteáz és a szekretált foszfolipáz aktivitások

Az általunk vizsgált két törzs szekretált enzimaktivitásaiban nagy különbségeket tapasztaltunk. A szülői törzs aszpartát proteáz aktivitása a 72 órás inkubálási időkor fele akkora volt, mint az AF06 mutáns törzsé, ugyanakkor a szekretált foszfolipáz aktivitása az ötödik napon négyszer nagyobbak bizonyult (1. táblázat).

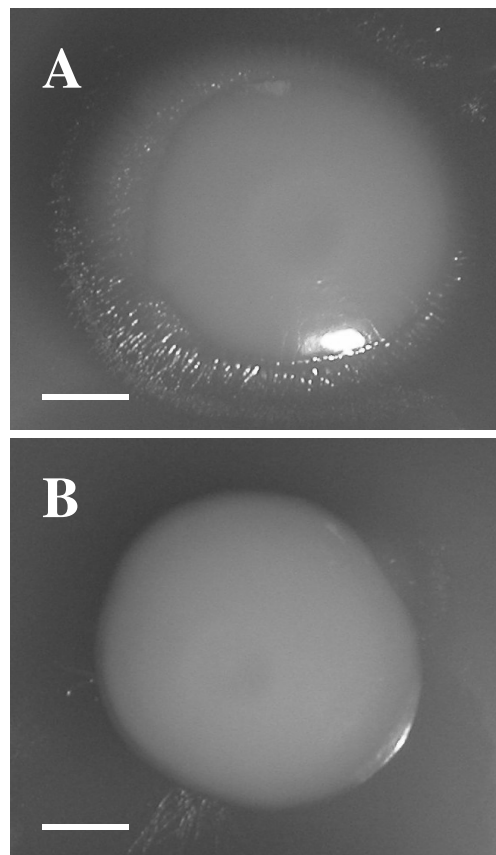
5.2.2.1.3. Pszeudohifázó képesség és klamidospóra képzés kukoricaliszt táptalajon

A szülői és mutáns törzsek pszeudohifázó képességét és klamidospóra képzését kukoricaliszt táptalajon vizsgáltuk. Azt tapasztaltuk, hogy a szülői törzs már 48 órás inkubálási időt követően szép pszeudohifákat növesztett, míg a mutáns ekkor még csak élesztő formát mutatott. A 62 órás inkubációs idő végén azonban már a mutánsnál is megtörtént a élesztő/pszeudohifa morfológiai váltás. (1. táblázat) A klamidospóra képzésben nem volt különbség a két törzs között.

5.2.2.1.4. Hifázóképesség vizsgálata Spider táptalajon

A *C. albicans* sejtek szilárd Spider táptalajon az egysejtű, élesztő morfológia helyett fonalas, hifázó alakot mutatnak. Az általunk vizsgált két törzs esetében azonban azt figyeltük meg, hogy míg a szülői törzs szép hifákat képzett az inkubációs idő végére, addig a mutáns

törzs szinte egyáltalán nem növesztett hifákat (1.táblázat; 2. ábra). A *tBOOH* tolerancia kialakulásakor tehát a mutáns törzsben az élesztő/hifa átalakulást szabályzó folyamatok figyelemre méltó mértékben gátlódtak.



2. Ábra A telepmorfológia összehasonlítása a *C. albicans* ATCC 14053 (A) és a *C. albicans* AF 06 (B) törzsek között 10 nap inkubáció után 28°C-on Spider táptalajon. Az AF06 mutáns törzsnél a sima telephatárok mutatják, hogy a mutáció gyengítette az élesztő-hifa morfológiai átmenetet. Hasonló telepmorfológiát mutattak az AF 01-05 és AF 07-10 mutáns törzsek is. Méretvonal: 5mm

1. Táblázat Az *in vitro* virulencia faktorok összehasonlítása a *C. albicans* ATCC 14053 és *C. albicans* AF06 törzsek között

Virulencia faktorok	<i>C. albicans</i> ATCC 14053	<i>C. albicans</i> AF 06
Csírátömlő képzése birká szérumban (%)		
30 min	43 ± 4	6 ± 3*
60 min	78 ± 8	59 ± 2*
180 min	95 ± 7	97 ± 5
Szekretált aszpartát proteáz aktivitás [A ₂₈₀ x 10 ¹⁰ (sejtszám) ⁻¹]	8.4 ± 0.5	16.6 ± 1.7*
Szekretált foszfolipáz aktivitás^a [(1/Pz)-1]	1.0 ± 0.1	0.24 ± 0.01*
Hifázó képesség szilárd Spider táptalajon	+	-
Pszudohifázó képesség kukoricaliszt táptalajon		
48 h	+	-
62 h	+	+
Klamidospóra képzés kukoricaliszt táptalajon	+	+

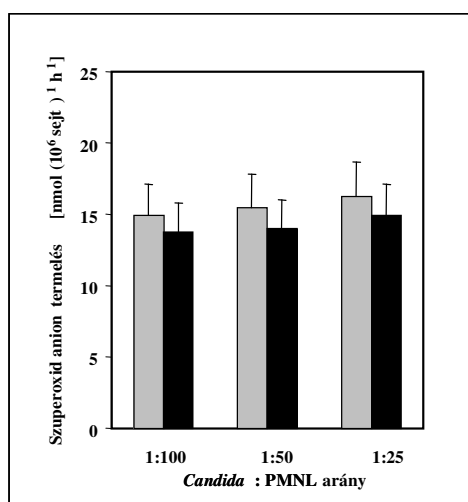
A táblázatban 4 független mérés adataiból számolt középértéket és azok szórását (S.D.) tüntettük fel.

* Szignifikáns a különbség ($P \leq 5\%$) a kontroll és a *t*BOOH toleráns törzsek között. A szignifikancia vizsgálatokhoz a Student-féle *t*-tesztet használtuk.

^a A foszfolipáz aktivitásánál a Pz érték a telepátmérő és a feltisztulási zóna átmérőjének a hányadosa.

5.2.2.2. A polimorfonukleáris leukociták (PMNL) szuperoxid termelésének vizsgálata

Megvizsgáltuk, hogy a PMNL sejtek felismerik-e szülői és mutáns törzs sejtjeit. Annak érdekében, hogy minél inkább helyesen modellezzük a humán sejtek és a gombák találkozását, a gomba sejteket opsonizáltuk, majd különböző gomba/PMNL arányban (1:100, 1:50 és 1:25) együtt inkubáltuk 37°C-on. Az egy órás inkubációs időt követően mértük a PMNL által termelt szuperoxid mennyiségét. Azt tapasztaltuk, hogy a PMNL sejtek közel azonos mértékben ismerték fel a két törzset. A PMNL szuperoxid termelésének eredményeit az eltérő gomba/PMNL arányoknál az 3. ábrán láthatjuk.



3. Ábra A polimorfonukleáris leukociták által kiváltott szuperoxid anion termelés összehasonlítása az opsonizált *Candida albicans* ATCC 14053 (szürke oszlop) és a *Candida albicans* AF 06 (fekete oszlop) törzsekben.

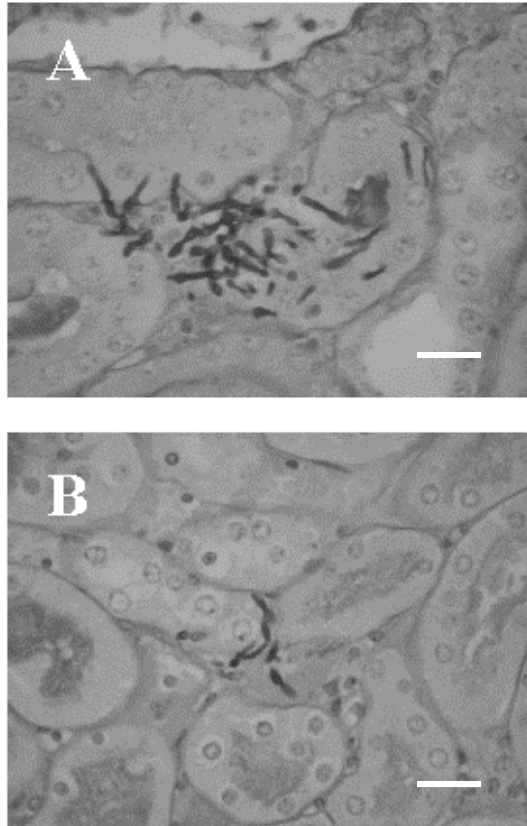
5.2.2.3. A patogenitás vizsgálata állatkísérletben

5.2.2.3.1. A kontroll és a *t*BOOH toleráns mutáns törzsek LD₅₀ értékének meghatározása

A szülői és mutáns törzsek LD₅₀ értékének meghatározását egéroltással végeztük el. Az állatokat különböző koncentrációjú gomba szuszpenzióval fertőztük meg intravénásan, majd 2 hétig figyeltük a túlélésüket. Azt tapasztaltuk, hogy a *t*BOOH toleráns mutáns törzs patogenitása jelentősen gyengült a szülői törzshöz viszonyítva. LD₅₀ érték a szülői törzsnél 8×10^4 gombasejt, míg a *t*BOOH toleráns mutáns esetében azonban 40×10^4 gombasejt volt. Az AF06 mutáns törzssel fertőzött egerekből visszaizolált gombák MIC *t*BOOH értéke és GR aktivitása az eredeti megnövekedett értékekhez képest nem változott.

5.2.2.3.2. A két törzs sejtjeinek intraperitoneális infekciót követő vizsgálata

Az egereket mindkét törzs sejtjeivel intraperitoneálisan megfertőztük, majd az Anyagok és módszerek fejezetben leírt módon és időben mintákat vettünk a peritoneális üregből illetve a veséből. Nem tapasztaltunk különbséget a szülői és mutáns törzsek mosófolyadékából visszatenyésztett sejtszámában és a vesében mindkét törzs egyaránt fonalas morfológiát is mutatott. (4. ábra)



4. Ábra *C. albicans* ATCC 14053 (A) és a *C. albicans* AF 06 (B) sejtek és fonalak az egér vesekéregben. Az élesztősejteket Perjódsvav-Schiff (PAS) technikával tettük láthatóvá. Az egereket intraperitoneálisan fertőztük meg 10^6 db *C. albicans* sejttel mindkét törzs esetében. Az egerek 24 óra elteltével lettek előlve. Méretvonal: 25µm

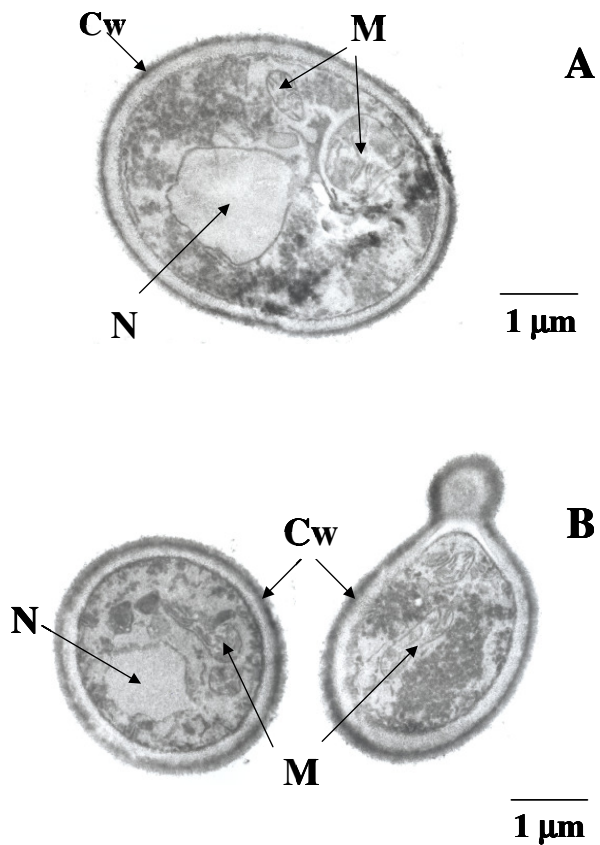
5.2.3. A tBOOH tolerancia nincs hatással a sejtméretre és az élesztősejtek morfológiájára

5.2.3.1. A sejtméret meghatározása scanning elektron mikroszkóp segítségével

A szülői és mutáns törzs sejtméretét scanning elektron mikroszkóp segítségével határoztuk meg. Az átlagos sejtméretek a két törzs esetében nagyon hasonlóknak bizonyultak: $19 \pm 11 \mu\text{m}^3$ (n=28) és $19 \pm 8 \mu\text{m}^3$ (n=36). Nem találtunk különbséget a sejtfelszíni mintázatok tekintetében sem.

5.2.3.2. A sejtek ultrastuktúrájának összehasonlítása transzmissziós elektron mikroszkóp segítségével

Transzmissziós elektron mikroszkóp segítségével összehasonlítottuk a két törzs sejtfalának, sejtmagjának és mitokondriumainak szerkezeti felépítését. Nem találtunk eltérést az egyes sejtorganellumok elemzésekor. A két törzs sejtjeiről készített felvételt a 5. ábrán mutatjuk.



5. Ábra Transzmissziós elektronmikroszkópos kép a *C. albicans* ATCC 14053 (A) és *C. albicans* AF06 (B) törzsek sejt szerkezetéről. Cw: sejtfal; M: mitokondrium; N: sejtmag;

5.2.3.3. A mitokondriumok morfológiai és funkcionális vizsgálata

A mitokondriumok jelentős szerepet játszanak ROS eliminálásában. Annak érdekében, hogy a mitokondriumok működését vizsgálhassuk, a sejteket mindkét törzsben a MitoTracker Red festékkel megfestettük. Nem tapasztalunk különbséget a mitokondriumok méretében és szerkezeti felépítésében.

5.2.4. A *t*BOOH tolerancia megnövelte az ellenálló képességet az egyéb oxidálószerekkel és antifungális szerekkel szemben

Az AF06 mutáns törzs a négyszer nagyobb *t*BOOH toleranciája mellett a H₂O₂, MSB és NaOCl oxidálószerekkel szemben is kétszer nagyobb ellenálló-képességet mutatott. Ugyanakkor megvizsgáltuk, hogy a jelenleg elterjedten alkalmazott flukonazol, vorikonazol, amphotericin B és 5-fluoro-citozin antimikotikumokkal szemben milyen toleranciával rendelkeznek. Az eredmények azt mutatták, hogy ezen antimikotikumokat az AF06 törzs az oxidálószerekkel hasonlóan jobban tolerálta, mint a szülői törzs. (2. táblázat)

2. Táblázat Az oxidatív stresszt kiváltó anyagokkal és az antifungális szerekkel szembeni tolerancia összehasonlítása a *Candida albicans* ATCC 14053 és *Candida albicans* AF06 törzsek között

Oxidatív stresszt kiváltó anyagok	MIC (mmol L ⁻¹)	
	<i>C. albicans</i> ATCC 14053	<i>C. albicans</i> AF06
<i>t</i> BOOH	4	16
H ₂ O ₂	32	64
MSB	0.6	1.2
NaOCl	0.01	0.02
Antifungális szerek	MIC (µg mL ⁻¹)	
flukonazol	0.5	2
vorikonazol	0.016	0.032
amphotericin B	0.5	1
5-fluoro-citozin	0.125	0.25

5.2.5. A *t*BOOH tolerancia az antioxidáns védelmi rendszer folyamatos indukcióját eredményezte

5.2.5.1. A specifikus antioxidáns enzimaktivitások meghatározása

Az élesztősejtek antioxidáns védelmi rendszerének a ROS-t elimináló enzimek szerves részét képezik. Megvizsgáltuk ezen enzimek aktivitását mindkét törzsben *t*BOOH mentes és *t*BOOH-t tartalmazó tápoldatban történő tenyésztést követően is. Azt tapasztaltuk, hogy az AF06 mutáns törzsben a GR és a GPx enzimek aktivitása nagyobb mértékben, míg a G6PD, kataláz és SOD enzimek aktivitása kisebb mértékben ugyan, de megemelkedett a szülői törzs enzimaktivitásaihoz képest *t*BOOH mentes tenyésztés után. Ugyanakkor, ha a tápoldathoz 1 mmol L⁻¹ koncentrációban *t*BOOH-t adtunk, akkor az a szülői törzs GR és GPx aktivitásait szignifikánsan növelte, de a mutáns enzimaktivitására nem volt hatással. Azonban ha a mutáns tápoldatában a *t*BOOH koncentrációját 6 mmol L⁻¹-ra növeltük, akkor a specifikus GR, G6PD, GPx, kataláz és SOD enzimek aktivitásai jelentősen fokozódtak az AF06 *t*BOOH mentes értékeihez képest. Érdekes módon, a GSH függő méregtelenítő útvonalhoz tartozó GST és γ GT enzimek aktivitásaiban nem találtunk különbséget a szülői és a mutáns törzs között, és a *t*BOOH-t tartalmazó tápoldatban való tenyésztést követően sem növekedtek ezen értékek jelentősen. (3. táblázat)

5.2.5.2. A GSH, GSSG, peroxid és szuperoxid termelés mennyiségi összehasonlítása

Az AF06 mutánsban több GSH-t és sokkal több GSSG-t mértünk, mint a szülői törzsben, amely a GSH/GSSG redox egyensúly negatív irányú változását eredményezte (3.táblázat). A *C. albicans* ATCC 14053 szülői törzs szintén ROS-t (szuperoxid, peroxid), valamint GSSG-t halmozott fel nagy koncentrációban, és 1 mmol L⁻¹ *t*BOOH kezelés hatására 1,65-ször több GSH-t tartalmazott, mint kezelés nélkül (3. táblázat). A mutáns törzsünk alap esetben (kezelés nélkül) több peroxidot termelt, mint a szülői törzs, azonban 6 mmol L⁻¹ *t*BOOH kezelés hatására nem növekedett a GSH és a peroxid tartalom, miközben a szuperoxid szintje több, mint tízszeresére nőtt [0.17→1.8 nmol Et (mg protein)⁻¹; 3. táblázat]. Az 1 mmol L⁻¹ *t*BOOH kezelés nem volt hatással a GSH és a ROS mennyiségére a *t*BOOH toleráns mutáns törzsünkben.

3. Táblázat Specifikus antioxidáns enzim aktivitások összehasonlítása a *C. albicans* ATCC 14053 és *C. albicans* AF06 törzsek között

Specifikus antioxidáns enzimek	<i>C. albicans</i> ATCC 14053	<i>C. albicans</i> ATCC 14053 + 1 mmolL ⁻¹ <i>t</i> BOOH	<i>C. albicans</i> AF06	<i>C. albicans</i> AF06 + 6 mmolL ⁻¹ <i>t</i> BOOH
G6PD [mkat (kg protein) ⁻¹]	6 ± 1	8 ± 2	10 ± 0.7*	12.9 ± 0.8**
GPx [mkat (kg protein) ⁻¹]	0.055 ± 0.004	0.17 ± 0.02*	0.2 ± 0.01*	0.33 ± 0.04**
GR [mkat (kg protein) ⁻¹]	1.1 ± 0.15	2 ± 0.1*	2.9 ± 0.3*	3.4 ± 0.2**
GST [mkat (kg protein) ⁻¹]	0.094 ± 0.008	0.11 ± 0.02	0.09 ± 0.01	0.1 ± 0.02
γGT [mkat (kg protein) ⁻¹]	0.026 ± 0.004	0.022 ± 0.005	0.029 ± 0.004	0.028 ± 0.003
kataláz [kat (kg protein) ⁻¹]	1.2 ± 0.3	1.5 ± 0.3	1.8 ± 0.2*	2.4 ± 0.2**
SOD [unit (mg protein) ⁻¹]	3.7 ± 0.8	4.5 ± 0.6	5.9 ± 0.3*	11 ± 3**

A táblázatban 4 független mérés adataiból számolt középértéket és azok szórását (S.D.) tüntettük fel.

* Szignifikáns a különbség ($P \leq 5\%$) a *t*BOOH-val kezelt kontroll és a kezeletlen *t*BOOH toleráns törzsek és a kezeletlen kontroll között.

** Szignifikáns a különbség ($P \leq 5\%$) a kezeletlen és *t*BOOH-val kezelt AF06 törzsek között.

A szignifikancia vizsgálatokhoz a Student-féle *t*-tesztet használtuk

4. Táblázat A GSH, GSSG, peroxid és szuperoxid termelés mennyiségi összehasonlítása a *C. albicans* ATCC 14053 és *C. albicans* AF06 törzsek között

Stersszhez kapcsolódó metabolitok	<i>C. albicans</i> ATCC 14053	<i>C. albicans</i> ATCC 14053 + 1 mmolL ⁻¹ <i>t</i> BOOH	<i>C. albicans</i> AF06	<i>C. albicans</i> AF06 + 6 mmolL ⁻¹ <i>t</i> BOOH
GSH [nmol (mg protein) ⁻¹]	158 ± 11	260 ± 17*	208 ± 11*	211 ± 12*
GSSG [nmol (mg protein) ⁻¹]	0.5 ± 0.03	2.5 ± 0.1*	1.9 ± 0.06*	2.6 ± 0.1**
GSH/GSSG	319 ± 21	105 ± 9*	109 ± 9*	82 ± 8**
peroxid [nmol DCF (mg protein) ⁻¹]	0.040 ± 0.08	0.060 ± 0.010*	0.056 ± 0.012*	0.049 ± 0.010
szuperoxid [nmol Et (mg protein) ⁻¹]	0.2 ± 0.03	0.28 ± 0.06*	0.17 ± 0.03	1.8 ± 0.3**

A táblázatban 4 független mérés adataiból számolt középértéket és azok szórását (S.D.) tüntettük fel.

* Szignifikáns a különbség ($P \leq 5\%$) a *t*BOOH-val kezelt kontroll és a kezeletlen *t*BOOH toleráns törzsek és a kezeletlen kontroll között.

** Szignifikáns a különbség ($P \leq 5\%$) a kezeletlen és *t*BOOH-val kezelt AF06 törzsek között.

A szignifikancia vizsgálatokhoz a Student-féle *t*-tesztet használtuk

5.2.6. A *t*BOOH tolerancia megváltoztatta a lipidösszetételt és jelentősen növelte a lipid peroxidációs termékek mennyiségét

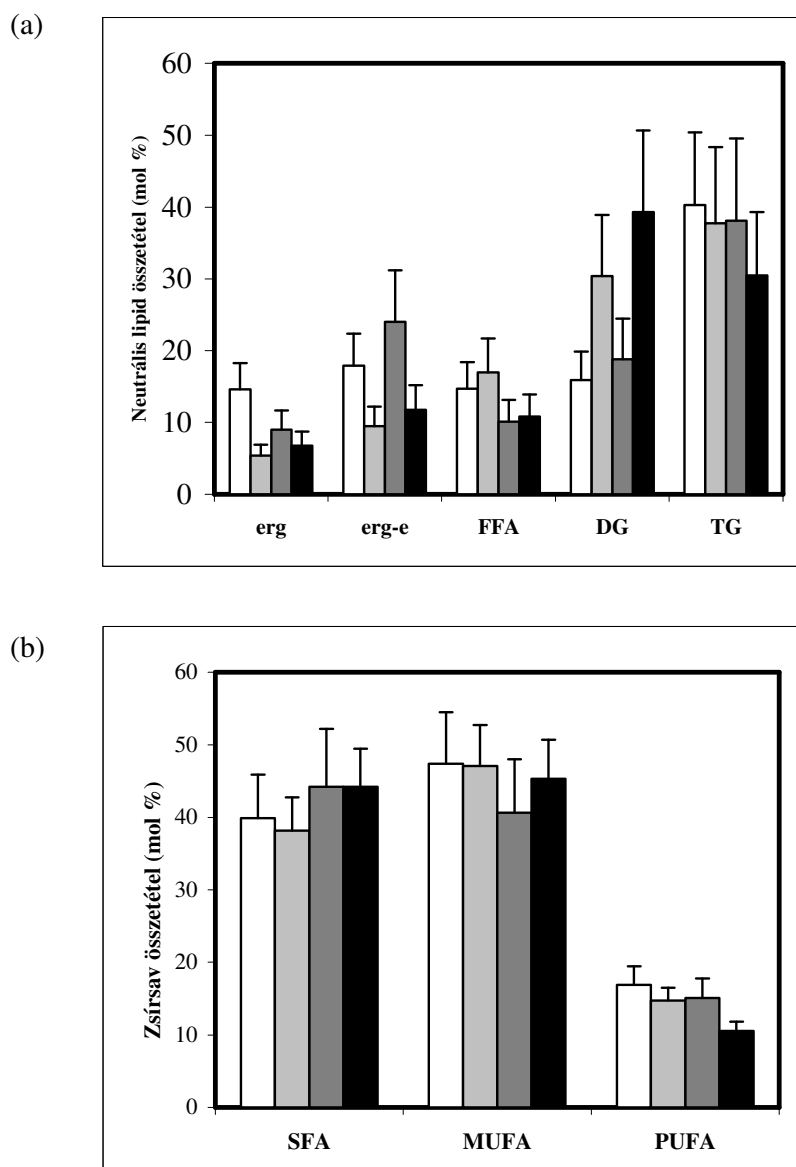
5.2.6.1. A lipidösszetételében bekövetkező változások vizsgálata

Az AF06 mutáns és a szülői törzs lipid összetételének vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy nincs szignifikáns különbség a foszfolipidek minőségi és mennyiségi összetételében, azonban jelentős a különbség a neutrális lipidek tekintetében. A teljes neutrális lipid mennyiség több volt a *t*BOOH toleráns mutánsban a szülői törzshöz viszonyítva [610 ± 130 vs. 530 ± 120 mg (g protein)⁻¹]. A mutáns neutrális lipid frakciója kevesebb ergoszterint valamint szabad zsírsavat tartalmazott, ugyanakkor megnövekedett az azonosítatlan szterin származékok és a diacil-glicerin mennyisége összehasonlítva a szülői törzssel (5. ábra). A *C. albicans* sejtek triacil-glicerol tartalmában nem találtunk különbséget (6. ábra).

A két törzs teljes lipid kivonatában nem találtunk különbséget a teljes zsírsav mennyiségében, azonban az egyes zsírsavakat külön vizsgálva jelentős mennyiségbeli eltéréseket tapasztaltunk a zsírsavösszetétel elemzése során (6. ábra). A telített zsírsav (SFA) tartalom jelentősen megnövekedett, emellett az egyszeresen és kétszeresen telítetlen zsírsavak (MUFA és PUFA) mennyisége pedig csökkent a mutánsban a szülői törzshöz viszonyítva (6. ábra). A *t*BOOH toleráns mutánsban növekedett a palmitin- és sztearinsavak mennyisége és csökkent a palmitolein-,olaj-, linol- és linolénsavak szintje.

Abban az esetben, amikor a szülői törzset 1 mmol L^{-1} és a mutáns törzset 6 mmol L^{-1} *t*BOOH-t tartalmazó tápoldatban tenyésztettük, csökkent definiálatlan szterin és PUFA tartalmat mértünk, amíg a diacil-glicerin koncentrációja növekedett mindkét vizsgált *C. albicans* törzsben (6. ábra). A *t*BOOH által kiváltott oxidatív stressz a mutánsban még növelte a MUFA tartalmat, de csökkentette az ergoszterin mennyiségét, míg a szülői törzsben a szabad zsírsavak koncentrációja növekedett (6. ábra).

A két törzs összehasonlítása során tapasztalt változások szignifikánsak voltak.



6. Ábra Neutrális lipid (a) és zsírsav (b) összetétel a *C. albicans* ATCC 14053 (kontroll; fehér és szürke oszlop) és *tBOOH* toleráns *C. albicans* AF06 (sötét szürke és fekete oszlop) törzsekben. Az első oszlop mindkét törzsnél a *tBOOH* mentes eredményeket, míg a második oszlop a *tBOOH*-val kezelt eredményeket mutatja (kontroll esetében 1 mmol L⁻¹; AF06 törzsnél 6 mmol L⁻¹)

Az ábrán 4 független mérés adataiból számolt középértéket és azok szórását (S.D.) tüntettük fel.

* Szignifikáns a különbség ($P \leq 5\%$) a *tBOOH*-val kezelt kontroll és a kezeletlen *tBOOH* toleráns törzsek és a kezeletlen kontroll között.

** Szignifikáns a különbség ($P \leq 5\%$) a kezeletlen és *tBOOH*-val kezelt AF06 törzsek között.

A szignifikancia vizsgálatokhoz a Student-féle *t*-tesztet használtuk

5.2.6.2. A lipid peroxidációs termékek vizsgálata

A lipid peroxidációs termékek teljes mennyiségének szignifikáns növekedését figyeltük meg a *t*BOOH mutánsban, mivel a telítetlen zsírsavak peroxidációja jelentősebb az AF06 törzsből (5. táblázat). A *t*BOOH-val való kezelés mindkét törzsből növelte a konjugált dién és a lipid-hidroperoxid tartalmat (5. táblázat). A mutáns törzsből *t*BOOH kezelés nélkül is emelkedett konjugált dién és a TBARS (tiobarbitursav-reaktív vegyületek) koncentrációkat figyeltünk meg, amely párhuzamban volt a mutánsra jellemző nagyobb SFA és kisebb MUFA és PUFA szintekkel (6. ábra), amely már egyébként is progresszív lipid peroxidációra utalt.

5. Táblázat A lipid peroxidációs termékek mennyiségi összehasonlítása a *C. albicans* ATCC 14053 és *C. albicans* AF06 törzsek között

Lipid peroxidációs termékek	<i>C. albicans</i> ATCC 14053	<i>C. albicans</i> ATCC 14053 + 1 mmolL ⁻¹ <i>t</i> BOOH	<i>C. albicans</i> AF06	<i>C. albicans</i> AF06 + 6 mmolL ⁻¹ <i>t</i> BOOH
Lipid-hidroperoxid [nmol (mg protein) ⁻¹]	3.2 ± 0.2	3.9 ± 0.4 [*]	3.6 ± 0.3 [*]	10 ± 1 ^{**}
Konjugált dién [A ₃₅₃ (mg protein) ⁻¹]	0.04 ± 0.01	0.09 ± 0.03 [*]	0.08 ± 0.02 [*]	0.22 ± 0.02 ^{**}
TBARS [nmol (mg protein) ⁻¹]	0.009 ± 0.003	Nem lett meghatározva	0.042 ± 0.017 [*]	Nem lett meghatározva

A táblázatban 4 független mérés adataiból számolt középértéket és azok szórását (S.D.) tüntettük fel.

^{*} Szignifikáns a különbség ($P \leq 5\%$) a *t*BOOH-val kezelt kontroll és a kezeletlen *t*BOOH toleráns törzsek és a kezeletlen kontroll között.

^{**} Szignifikáns a különbség ($P \leq 5\%$) a kezeletlen és *t*BOOH-val kezelt AF06 törzsek között.

A szignifikancia vizsgálatokhoz a Student-féle *t*-tesztet használtuk

5.2.7. A *t*BOOH tolerancia csökkent cianid-érzékeny és fokozott alternatív légzést eredményezett

Miközben összehasonlítottuk a két törzs cianid-érzékeny (citokróm c-függő) és cianid-rezisztens (AOX-függő) légzését azt tapasztaltuk, hogy a *t*BOOH toleráns mutáns a szülői törzshöz viszonyítva szignifikánsan gyengébb cianid-érzékeny légzést mutatott (55%-os a csökkenés; 6. táblázat). Amikor azonban a teljes légzés lett összehasonlítva, ezt a nagy különbséget nem láttuk, mivel a mutánsban a cianid-rezisztens alternatív légzés jelentősen fokozódott (33%-os emelkedés; 6. táblázat) A *t*BOOH-val való kezelés egyik törzsben sem változtatta jelentősen a teljes légzést, bár a szülői törzsben a cianid-érzékeny légzést kissé serkentette (6. táblázat).

6. Táblázat A légzés összehasonlítása a *C. albicans* ATCC 14053 és *C. albicans* AF06 törzsek között

Légzés	<i>C. albicans</i> ATCC 14053	<i>C. albicans</i> ATCC 14053 + 1 mmolL ⁻¹ <i>t</i> BOOH	<i>C. albicans</i> AF06	<i>C. albicans</i> AF06 + 6 mmolL ⁻¹ <i>t</i> BOOH
Teljes légzés [nmol s ⁻¹ (mg protein) ⁻¹]	32 ± 6	40 ± 9	33 ± 6	36 ± 7
Citokróm C-függő légzés [nmol s ⁻¹ (mg protein) ⁻¹]	11 ± 2	16 ± 3*	5 ± 1*	4 ± 1*
Alternatív oxidáz- függő légzés [nmol s ⁻¹ (mg protein) ⁻¹]	21 ± 4	24 ± 5	28 ± 5*	32 ± 6*
Citokróm C-függő /alternatív légzés	0.52 ± 0.14	0.66 ± 0.19	0.18 ± 0.05*	0.13 ± 0.04*

A táblázatban 4 független mérés adataiból számolt középértéket és azok szórását (S.D.) tüntettük fel.

* Szignifikáns a különbség ($P \leq 5\%$) a *t*BOOH-val kezelt kontroll és a kezeletlen *t*BOOH toleráns törzsek és a kezeletlen kontroll között.

A szignifikancia vizsgálatokhoz a Student-féle *t*-tesztet használtuk

5.3. Klinikai izolátumok (*C. albicans*) élettani vizsgálata, új *t*BOOH toleráns *C. albicans* mutánsok létrehozása

5.3.1. A klinikai izolátum *C. albicans*-ok MIC_{tBOOH} , $MIC_{H_2O_2}$, GR, GPx és G6PD enzimaktivitásainak meghatározása

A véletlenszerűen kiválasztott 46 - az emberi szervezet különböző helyeiről izolált-klinikai *C. albicans* törzsekben megnéztük az antioxidáns védelmi rendszer működését annak érdekében, hogy az oxidatív stressz tolerancia természetes körülmények közötti megjelenésének valószínűségét megbecsülhessük. Első lépésként az átlagos MIC_{tBOOH} , $MIC_{H_2O_2}$ értékeket és az átlagos specifikus GR, G6PD és GPx enzimaktivitásokat határoztuk meg, amelyek a következők voltak: $5.5 \pm 2.0 \text{ mmol L}^{-1}$, $35.5 \pm 14.3 \text{ mmol L}^{-1}$, $1.22 \pm 0.24 \text{ mkat (kg protein)}^{-1}$, $5.58 \pm 0.82 \text{ mkat (kg protein)}^{-1}$ és $0.062 \pm 0.016 \text{ mkat (kg protein)}^{-1}$. Az izolátumok vizsgálatokor nem találtunk oxidatív stressz toleráns mutánst. A törzsek MIC értékei és a specifikus enzimaktivitások minden esetben a normál (átlag \pm 2SD) tartományában voltak.

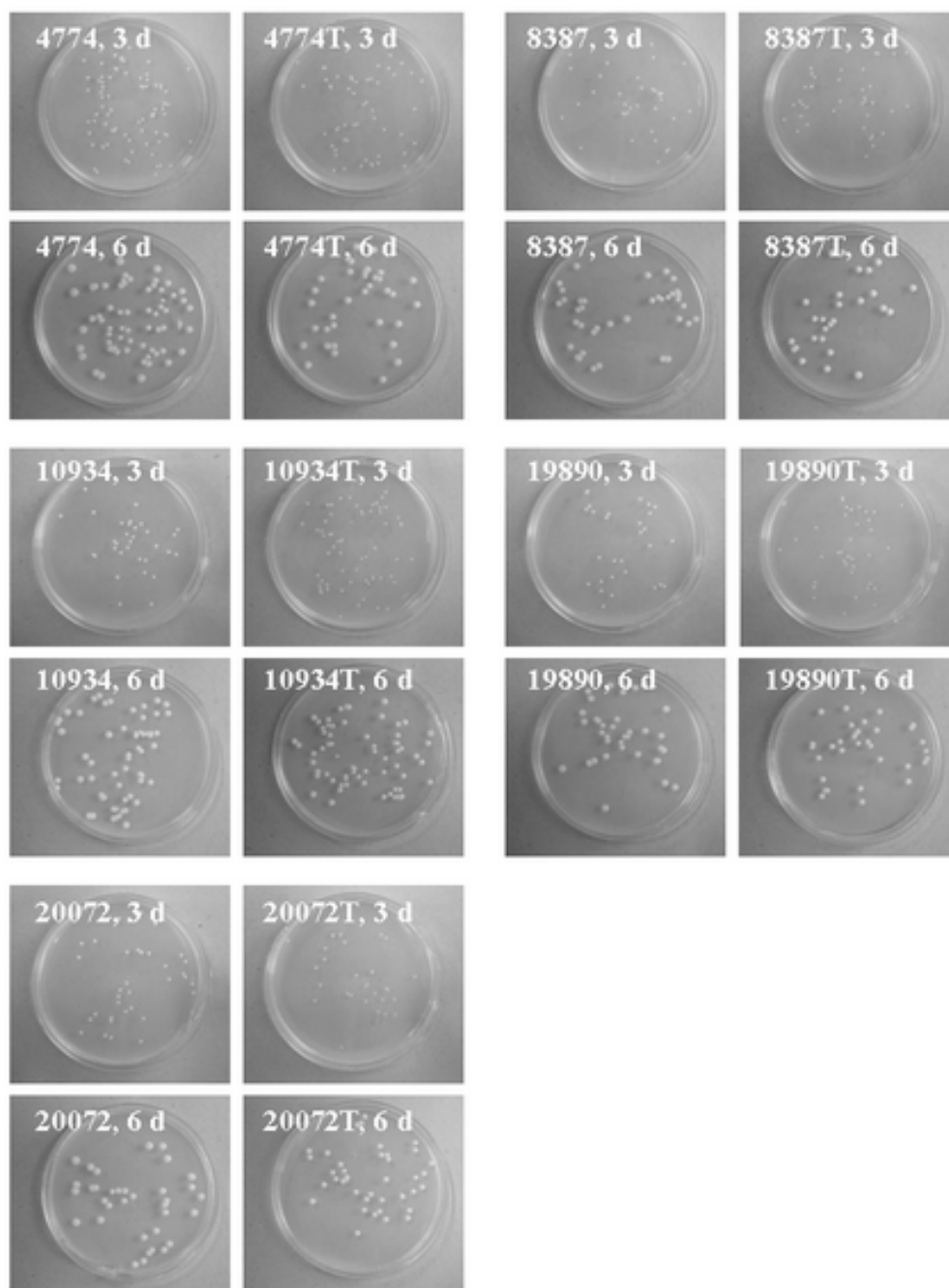
5.3.2. Új *t*BOOH toleráns mutáns törzsek létrehozása a klinikai izolátumokból és azok összehasonlítása a szülői törzseikkel

Kiválasztottunk véletlenszerűen néhány klinikai izolátumot (4774, 8387, 10934, 19890, 20072) és azok felhasználásával az SDB tápoldat *t*BOOH koncentrációjának folyamatos növelésével *t*BOOH toleráns mutánsokat hoztunk létre (4774T, 8387T, 10934T, 19890T, 20072T). Ezen új *t*BOOH toleráns mutáns törzseket hasonlítottuk a szülői törzseikhez.

Azt tapasztaltuk, hogy az új mutáns törzsek MIC_{tBOOH} és $MIC_{H_2O_2}$ értékei 2-4-szeres növekedést mutattak a szülői törzsek adataihoz viszonyítva (7. táblázat). Az antimikotikus szerekek szembeni tolerancia ugyanakkor változatos képet mutatott. A új mutánsok általában jobban vagy hasonló mértékben tolerálták az antifungális anyagokat a szülői törzseikhez hasonlítva, azonban a 8387T (flukonazol, voriconazol), a 19890T (5-fluorocitozin) és a 20072T (amphotericin B) törzsek egyes antimikotikumokkal szembeni toleranciája csökkent (7. táblázat).

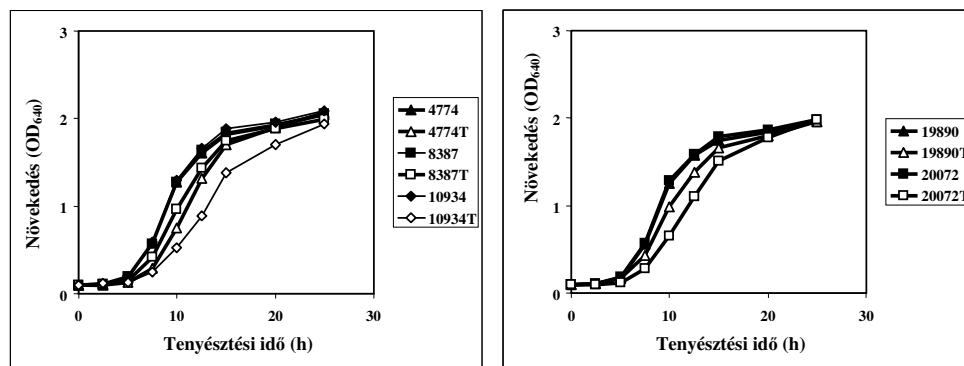
A telepek méretének összehasonlításakor megfigyeltük, hogy SDA lemezen a mutánsok telepátmérője a inkubációs időszak harmadik napján még kisebb volt, mint a szülői törzseké, ugyanakkor a hatodik napon már nem tapasztaltunk jelentős különbséget, melyet hosszabb lag

fázisok eredményezhetnek a mutánsok felszíni kultúrában történő tenyésztésekor (7. táblázat, 7. ábra).



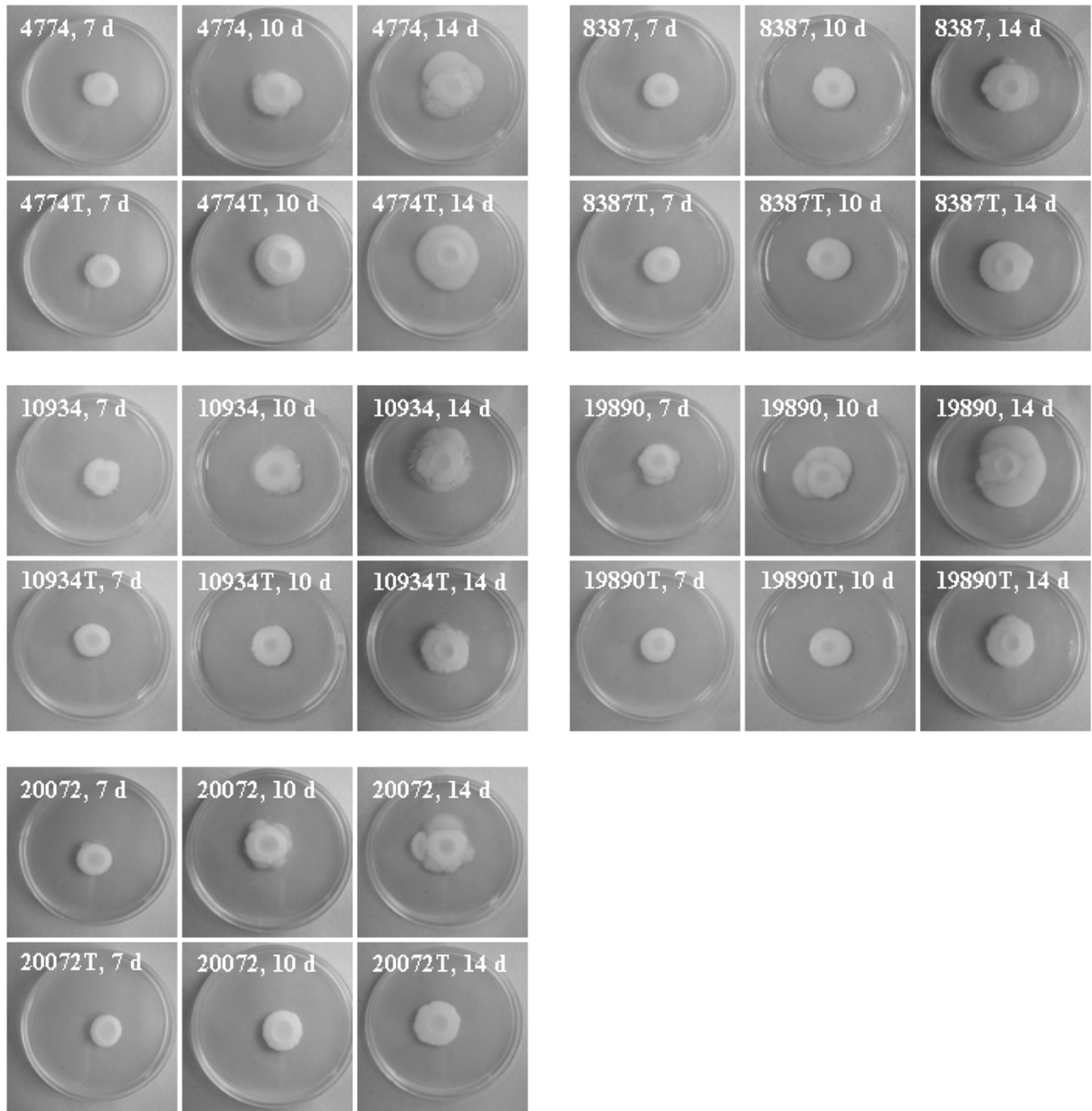
7. Ábra A *t*BOOH toleráns *C. albicans* mutánsok és szülői törzseik növekedése SDA táptalaj felszínén. A fényképek a tenyésztési időszak 3. és 6. napján készültek. Az átlagos telepátmérőket a 7. táblázatban mutatjuk.

Hasonló időbeli eltolódást találtunk a törzsek SDB tápoldatban történő tenyésztésekor. Minden törzs szignifikánsan lassabban növekedett a tenyésztési időszak 10. órájában a szülői törzsekhez viszonyítva, azonban ilyen különbséget a 25. óra után már nem tapasztaltunk (7. táblázat, 8. ábra).



8. Ábra A *tBOOH* toleráns *C. albicans* mutánsok és szülői törzsek növekedése SDB tápoldatban. Az ábrán minden törzsnél 4 független kísérlet eredményeit ábrázoltuk. Az SD értéke minden esetben kisebb volt, mint 20%. A 10. és 25. óra átlagos növekedési eredményét a 7. táblázatban tüntettük fel.

A mutáns törzsek extracelluláris foszfolipáz termelése minden esetben gyengébb volt (32,1-73,3%-kal) a szülői törzsekéhez képest (7. táblázat) és minden mutáns törzs pszeudohifázó- és hifázóképessége is csökkent kukoricaliszt és Spider táptalajon a klinikai izolátumok értékeihez viszonyítva (7. táblázat, 9. ábra). Hasonlóan a növekedési kinetikához (7. táblázat; 8. ábra) a morfológiai váltás is késve következett be a mutánsokban (7. táblázat, 9. ábra).



9. ábra A *t*BOOH toleráns *C. albicans* mutánsok és szülői törzseik hifázó képességének összehasonlítása Spider táptalajon. A fényképek a 7., 10. és 14. tenyésztéstezési napon készültek. A morfológiai változásokat a 7. táblázatban foglaltuk össze.

Az intracelluláris oxidánsok vizsgálata során a mutáns törzsek mindegyikében nagy mennyiségű GSSG-t mutattunk ki, ugyanakkor az intracelluláris peroxid koncentráció csak a 8387T és 10934T mutánsoknál növekedett (7. táblázat). Minden mutáns -a 19890T kivételével- túltermelte a GSH-t, a GSH/GSSG redox egyensúly negatív eltolódását azonban csak a 19890T és 20072T törzseknél figyeltük meg. A GSH/GSSG arány szignifikánsan kisebb volt a 8387T és 10934T mutánsokban a szülői törzseikhez viszonyítva, míg a 4774 és 4774T törzsek hasonló GSH/GSSG arányokkal rendelkeztek.

A mutánsokban az oxidatív stressz tolerancia kialakulása megnövekedett antioxidáns enzimaktivitásokat eredményezett (GR, G6PD, GPx; 7. táblázat). A légzés tekintetében azt tapasztaltuk, hogy a teljes légzésre általában nem volt hatással a mutáció, kivéve a 4774T és 10934T törzseket, ahol a teljes légzés 2,1-szeresére és 1,6-szorosára emelkedett (7. táblázat). Eltérően az AF06 *t*BOOH toleráns mutáns törzsnél tapasztaltaktól, a cianid-érzékeny citokróm c-függő légzésre a mutáció csak a 8387T mutánsnál volt hatással, azonban a cianid-rezisztens alternatív oxidáz-függő légzés minden mutánsnál fokozódott (7. táblázat), ami jól illeszkedik a korábbi AF06 törzsnél kapott eredményekhez.

7. Táblázat A *t*BOOH toleráns *C. albicans* mutáns törzsek fenotípusának összefoglaló táblázata és a törzsek összehasonlítása a szülői törzseikkel

Törzsek	Tolerancia						Növekedés			
	Oxidatív stresszt kiváltó anyagokkal szembeni tolerancia		Antifungális szerekkel szembeni tolerancia				Növekedés SDA-n (átlagos telepátmérő ± S.D.; mm; n=30-40) ^b		Növekedés SDB-ben (OD ₆₄₀)	
	<i>t</i> BOOH (MIC; mmol L ⁻¹)	H ₂ O ₂ (MIC; mmol L ⁻¹)	flukonazol e (MIC; µg mL ⁻¹)	vorikonazol (MIC; µg mL ⁻¹)	amphotericin B (MIC; µg mL ⁻¹)	5-fluorocitozin (MIC; µg mL ⁻¹)	3 d	6 d	10 h	25 h
4774	4	32	0.5	0.008	0.125	0.0625	1.81±0.17	3.93±0.60	1.3±0.2	2.0±0.2
4774T	8 (↑)	64 (↑)	1 (↑)	0.016 (↑)	0.25 (↑)	0.125 (↑)	1.75±0.19* (↓)	4.04±0.33 (0)	0.8±0.1*** (↓)	2.3±0.3 (0)
8387	8	64	1	0.032	0.0625	0.0625	1.81±0.22	3.95±0.24	1.3±0.1	2.1±0.1
8387T	16 (↑)	128 (↑)	0.25 (↓)	0.016 (↓)	0.25 (↑)	0.0625 (0)	1.50±0.17*** (↓)	4.08±0.34 (0)	1.0±0.1** (↓)	2.0±0.2 (0)
10934	4	32	0.125	0.008	0.125	0.0625	2.15±0.15	3.75±0.37	1.3±0.2	2.1±0.2
10934T	16 (↑)	64 (↑)	0.5 (↑)	0.016 (↑)	0.25 (↑)	0.0625 (0)	1.47±0.15*** (↓)	3.31±0.40*** (↓)	0.5±0.2*** (↓)	1.9±0.3 (0)
19890	4	64	0.25	0.008	0.25	0.125	2.01±0.17	3.80±0.42	1.3±0.1	2.0±0.1
19890T	16 (↑)	128 (↑)	0.25 (0)	0.016 (↑)	0.25 (0)	0.0625 (↓)	1.35±0.21*** (↓)	3.54±0.19** (↓)	1.0±0.1** (↓)	2.0±0.2 (0)
20072	4	32	0.125	0.008	0.25	0.0625	2.18±0.18	4.32±0.37	1.3±0.2	2.0±0.1
20072T	8 (↑)	64 (↑)	4 (↑)	0.032 (↑)	0.125 (↓)	0.0625 (0)	1.57±0.24*** (↓)	3.41±0.17*** (↓)	0.7±0.2*** (↓)	2.0±0.3 (0)

7. Táblázat A tBOOH toleráns *Candida albicans* mutáns törzsek fenotípusának összefoglaló táblázata és a törzsek összehasonlítása a szülői törzsekkel (folytatás)

Törzsek	Virulencia faktorok					Fiziológiai tulajdonságok				
	Szekretált foszfolipáz aktivitás ^c	Pszudohifázó képesség kukoricaliszt agaron		Hifázóképesség Spider agaron			Stresszhez kapcsolódó metabolitok			
		48 h	62 h	7 d	10 d	14 d	Peroxid [nmol DCF (mg protein) ⁻¹]	GSH [nmol (mg protein) ⁻¹]	GSSG [nmol (mg protein) ⁻¹]	GSH/GSSG
4774	1.06±0.12	+	+	+	+	+	0.041±0.007	152±10	0.71±0.06	214±8
4774T	0.72±0.08 ^{***} (↓)	- (↓)	+ (0)	- (↓)	+ (0)	+ (0)	0.033±0.007 (0)	240±14 ^{***} (↑)	1.1±0.2 ^{**} (↑)	218±20 (0)
8387	0.43±0.01	+	+	+	+	+	0.042±0.005	144±8	0.59±0.05	244±25
8387T	0.200±0.003 ^{***} (↓)	- (↓)	+ (0)	- (↓)	+ (0)	+ (0)	0.12±0.02 ^{***} (↑)	160±10 [*] (↑)	0.81±0.06 ^{***} (↑)	198±15 [*] (↓)
10934	0.60±0.04	+	+	+	+	+	0.027±0.003	121±7	0.72±0.06	168±17
10934T	0.160±0.001 ^{***} (↓)	- (↓)	+ (0)	- (↓)	+ (0)	+ (0)	0.053±0.005 ^{***} (↑)	175±12 ^{***} (↑)	1.2±0.1 ^{***} (↑)	146±15 [*] (↓)
19890	0.86±0.02	+	+	+	+	+	0.070±0.005	90±8	0.38±0.05	237±16
19890T	0.40±0.01 ^{***} (↓)	- (↓)	+ (0)	- (↓)	- (↓)	+ (0)	0.075±0.008 (0)	85±7 (0)	0.62±0.04 ^{***} (↑)	137±14 ^{***} (↓)
20072	1.00±0.09	+	+	+	+	+	0.025±0.002	99±7	0.30±0.03	330±28
20072T	0.44±0.03 ^{***} (↓)	- (↓)	- (↓)	- (↓)	+ (0)	+ (0)	0.030±0.003 (0)	133±8 ^{***} (↑)	0.84±0.07 ^{***} (↑)	158±18 ^{***} (↓)

7. Táblázat A tBOOH toleráns *Candida albicans* mutáns törzsek fenotípusának összefoglaló táblázata és a törzsek összehasonlítása a szülői törzsekkel (folytatás)

Törzsek	Fiziológiai tulajdonságok						
	Specifikus antioxidáns enzimaktivitások			Légzés			
	GR [mkat (kg protein) ⁻¹]	G6PD [mkat (kg protein) ⁻¹]	GPx [mkat (kg protein) ⁻¹]	Teljes légzés [nmol s ⁻¹ (mg protein) ⁻¹]	Citokróm C- függő légzés [nmol s ⁻¹ (mg protein) ⁻¹]	Alternatív oxidáz-függő légzés [nmol s ⁻¹ (mg protein) ⁻¹]	Citokróm C- függő légzés/ Alternatív oxidáz-függő légzés
4774	1.00±0.12	5.3±0.9	0.074±0.003	28±3	14±4	14±3	1.0±0.4
4774T	2.1±0.3 ^{***} (↑)	11.9±2.1 ^{***} (↑)	0.16±0.04 ^{**} (↑)	60±10 ^{**} (↑)	12±3 (0)	48±8 ^{***} (↑)	0.25±0.08 [*] (↓)
8387	1.4±0.3	6.2±0.5	0.08±0.01	42±5	19±4	23±5	0.8±0.3
8387T	2.2±0.2 ^{***} (↑)	12.3±0.7 ^{***} (↑)	0.12±0.02 ^{**} (↑)	45±6 (0)	11±2 [*] (↓)	34±5 [*] (↑)	0.32±0.08 [*] (↓)
10934	1.1±0.1	4.6±0.8	0.070±0.005	22±4	9±2	13±2	0.7±0.2
10934T	3.2±0.4 ^{***} (↑)	11±1 ^{***} (↑)	0.16±0.05 ^{**} (↑)	36±7 [*] (↑)	6±1 (0)	30±4 ^{***} (↑)	0.20±0.04 [*] (↓)
19890	1.5±0.2	6.4±0.9	0.075±0.002	38±6	12±3	26±3	0.5±0.1
19890T	1.8±0.2 [*] (↑)	11±2 ^{**} (↑)	0.31±0.02 ^{***} (↑)	45±5 (0)	8±2 (0)	37±5 [*] (↑)	0.22±0.06 [*] (↓)
20072	1.4±0.1	6.2±0.5	0.082±0.001	32±5	19±4	13±2	1.5±0.4
20072T	2.0±0.2 ^{***} (↑)	12±2 ^{***} (↑)	0.11±0.01 ^{***} (↑)	34±5 (0)	13±2 (0)	21±4 [*] (↑)	0.6±0.2 [*] (↓)

- ^a - A mutáns törzsek fiziológiai és morfológiai tulajdonságaikban bekövetkezett változásai összehasonlítva a szülői törzseikkel. (↑, 0, ↓).
- ^b - SDA táptalajon történő növekedés eredménye 3 és 6 nap inkubációt követően 28 °C-on. Minden törzsnél 30-40 véletlenszerűen kiválasztott telep átmérője lett manuálisan lemérve.
- ^c – A foszfolipáz aktivitást a $(1/Pz)-1$ képlet alapján határoztuk meg, ahol a Pz érték a telepátmérő és a feltisztulási zóna átmérőjének a hányadosa 48 óra inkubációt követően 37 °C-on. (Gyetvai és mtsai, 2007)
- * $p \leq 5 \%$, ** $p \leq 1 \%$, *** $p \leq 0.1 \%$. A szignifikancia vizsgálatokhoz a Student-féle t -tesztet használtuk

6. Eredmények összegzése

Oxidatív stressz toleráns *C. albicans* mutánsokat hoztunk létre az ATCC 14053 szülői törzs sejtjeinek egyre növekvő *t*BOOH koncentrációjú tápoldatban történő tenyésztésével (1. ábra, 1. táblázat). A mutánsokban bekövetkezett változások minden esetben stabilnak bizonyultak, ugyanis *t*BOOH mentes SDA-n 10 átoltást követően sem csökkent a törzsek *t*BOOH toleranciája. Emellett az általunk kiválasztott AF06 mutáns törzsnél azonos MIC_{tBOOH}-t és GR aktivitást mértünk a patogenicitási kísérlet céljából végzett egéroltas előtt, illetve 2 héttel később az egerekből visszaizolált sejtekben. Az AF01-10 oxidatív stressz toleráns mutánsok jelentősen csökkent hifázóképességgel rendelkeztek (2. ábra) és az AF06 mutáns szignifikánsan csökkent csíratömlő- és pszeudohifa-képző képességét is igazoltuk (1. táblázat).

A morfológiai váltás (élesztő→fonalas) lehetősége a *C. albicans* fontos virulencia faktora, mivel jelentős szerepe van a gombának a gazdaszervezet szöveteiben, szerveiben való megtapadásában (Braun és Johnson 1997; Lo és mtsai, 1997; Gow és mtsai, 2002; Mavor és mtsai, 2005). Az egyéb virulencia tényezők vizsgálatakor azt tapasztaltuk, hogy az AF06 mutáns csökkent extracelluláris foszfolipáz B aktivitással rendelkezett a szülői törzshöz viszonyítva (1. táblázat). A foszfolipáz B elsősorban az élesztő sejtekben és a pszeudohifákban termelődik, és a sejtmembrán komponensek degradációjában játszik fontos szerepet (Ibrahim és mtsai, 1995; Leidlich és mtsai, 1998). Ugyanakkor az AF06 mutáns törzs az extracelluláris aszpartát proteáz termelésében – ami a szövetekben való elterjedéshez szükséges – jelentősen felülmúlta az ATCC 14053 szülői törzset (Calderone & Fronzi, 2001)(1. táblázat).

A PMNL sejtek hasonló mértékben ismerték fel mind a mutáns, mind a szülői törzset, amelyből arra következtettünk, hogy az oxidatív stressz tolerancia kialakulásakor az AF06 törzs sejtfelülete nem változott, ezáltal a mutáció nincs hatással az antigenicitásra (3. ábra). Mivel a mutáns törzsünk nehezebben alakul fonalassá és a foszfolipáz B aktivitása is csökkent, a mutáció egy kevésbé patogén törzset eredményezett, amely a mutáns szülői törzshöz viszonyítva ötször nagyobb LD₅₀ értékében nyilvánult meg (egérben: 40×10^4 vs. 8×10^4 db sejt)(4. ábra). Ennek következtében az oxidatív stresszel szembeni tolerancia, amelyről azt feltételezték, hogy előnyös a *C. albicans* gombának, amikor az immunrendszer sejtjeivel találkozik (Mavor és mtsai, 2005), úgy tűnik, hogy hátrányos helyzetbe hozza a gombát, amikor az a véredényekből a mélyebb szövetekbe hatol be. Eredményeink összhangban vannak azokkal a korábbi megfigyelésekkel, melyekben azt tapasztalták, hogy

ha a *C. albicans* PMNL-kal és makrofágokkal találkozik a vérben, akkor gátlódik néhány fontos virulencia faktor kifejeződése, beleértve a morfológiai váltás lehetőségét is (1. táblázat; Fradin és mtsai, 2003, 2005; Lorenz és mtsai, 2004).

A sejtelettani vizsgálatokban az AF06 mutáns törzsünkben jelentősen megnövekedett a GR, G6PD, GPx, kataláz és SOD enzimek specifikus aktivitása a szülői törzshöz viszonyítva (3. táblázat). Ezen aktivitások azonban nem növekedtek tovább, amikor a törzset 1 mmol L^{-1} *t*BOOH-t tartalmazó tápoldatban tenyésztettük, ugyanakkor ha a *t*BOOH koncentrációját 6 mmol L^{-1} -re emeltük, akkor még fokozhattuk a specifikus aktivitásukat (3. táblázat). A stresszmentes körülmények között is megnövekedett antioxidáns enzimaktivitások összefüggést mutattak mind a nagy endogén oxidáns tartalommal (peroxid, GSSG, lipid hidroperoxid), mind a GSH/GSSG redox egyensúlyban bekövetkezett változásokkal (4., 5. táblázat). A mutáns törzsnél a lipid peroxidációs termékek (konjugált dién, TBARS) mennyiségének növekedését mutattuk ki (4. táblázat), miközben nőtt a SFA-, továbbá csökkent a MUFA- és PUFA-tartalom (6. ábra).

A mutánsban csökkent citokróom c-függő, cianid-érzékeny és megnövekedett alternatív oxidáz-függő, cianid-rezisztens légzést figyeltünk meg (6. táblázat). Ebből arra következtettünk, hogy a mutáció valószínűleg a mitokondriumokban a légzési láncot érintette és öröklődő mtDNS károsodásnak lehet az eredménye a GSSG, peroxid és lipidperoxidációs termékek fokozott termelése (4., 5. táblázat) (Wei és mtsai, 1998; Osiewacz & Borghouts 2000; Wei & Lee 2002, Genova és mtsai, 2004; Doudican és mtsai, 2005). A légzési lánc elemei közreműködnek a lipidperoxidációs láncreakciók elindításában illetve fenntartásában (Evans és mtsai, 1998). Az AF06 mutáns mitokondriumainak szerkezeti felépítése és működése nem változott a mutáció hatására (5. ábra). Ezen szempontokból az AF06 mutáns törzsünk hasonlított azokra a légzési mutáns *C. albicansokra* (KDR-8), amelyeket akriflavin kezeléssel hoztak létre, miközben megtartották a szülői törzs légzésének 20%-át (Aoki és Ito-Kuwa 1987, Ito-Kuwa és mtsai, 1988).

Az AF06 mutáns törzs fokozott toleranciával rendelkezett a fagociták által termelt ROS-kal szemben, ami például a H_2O_2 , szuperoxid- és OCl^- származékok esetében, a kétszeresen megnövekedett $\text{MIC}_{\text{H}_2\text{O}_2}$, MIC_{MSB} és $\text{MIC}_{\text{NaOCl}}$ értékekben nyilvánult meg (2. táblázat). Az oxidálószerek mellett 2-4-szeresére növekedett toleranciát mutatott a gyakran használt antimikotikumokkal szemben is (flukonazol, vorikonazol, amphotericin B, 5-fluorocitozin; 2. táblázat).

Az AF06 *C. albicans* mutánsban bekövetkezett fiziológiai változások (folyamatos redox egyensúly változás, nagy peroxid koncentráció, fokozott lipidperoxidáció) képesek az

antioxidáns védelmi rendszer működésének folyamatos indukciójára és fenntartására, ezáltal a mutáns fokozott oxidatív stressz-toleranciáját eredményezik.

A *C. albicans* klinikai izolátumokból (4774, 8387, 10934, 19890, 20072) az AF06 mutánsához hasonló módon *t*BOOH toleráns mutánsokat (4774T, 8387T, 10934T, 19890T, 20072T) hoztunk létre. Az új mutánsok fiziológiai és morfológiai vizsgálatokor megnövekedett *t*BOOH és H₂O₂ toleranciát, antioxidáns enzimaktivitásokat (GR, GPx, G6PD), cianid-rezisztens, alternatív oxidáz-függő légzést, sejten belüli GSSG és GSH koncentrációt (kivéve a 19890T mutánsnál) tapasztaltunk. A GSH/GSSG redoxegyensúly kedvezőtlen irányban változott (a 4774T mutáns kivételével, 7. táblázat). A virulencia faktorok tekintetében minden mutánsban csökkent az extracelluláris foszfolipáz B termelés és csökkent a pszeudohifa- és hifaképző képességük (7. táblázat). A mutánsok növekedése jelentős mértékben késleltetett volt mind a SDA felszínén, mind a SDB folyékony tápoldatban való tenyésztéskor (7. táblázat, 7., 8. ábra). Fontos azonban megjegyeznünk, hogy nem veszítették el teljesen hifázó képességüket (7. táblázat, 9. ábra) és a sejtek SDB tápoldatban növekedésben utolérték a szülői törzseiket (7. táblázat, 8. ábra).

Másrészről az antifungális szerekkel szembeni tolerancia (flukonazol, voriconazol, amphotericin B, 5-fluorocitozin) nagyon változatos képet mutatott, és a sejten belüli peroxidkoncentrációra, a teljes légzésre és a cianid-érzékeny citokróm-c függő légzésre a mutáció csak néhány mutáns esetében volt hatással (7. táblázat).

Ezen eredmények alapján határozottabban kijelenthetjük, hogy ha a *C. albicans* sejteket hosszú ideig folyamatosan lipidperoxidációt kiváltó *t*BOOH-val kezeljük, akkor *t*BOOH toleráns mutánsok jönnek létre, amelyekben az antioxidáns védelmi rendszer folyamatosan indukálódik és az élesztő-hifa morfológiai váltás gátolt.

A véletlenszerűen kiválasztott 46 *C. albicans* klinikai izolátum antioxidáns védelmi rendszerének vizsgálata során (MIC_tBOOH, MIC_H2O2, GR, G6PD, GPx) nem találtuk olyan törzset, amely oxidatív stressz-toleránsnak bizonyult volna.

Ugyanakkor, olyan *C. albicans* törzs természetes megjelenése, amely megnövekedett antioxidáns védelemmel, de emellett csökkent virulenciával rendelkezik, jelen tudásunk szerint valószínűtlen. Azonban az antimikotikumokkal való tartós kezelés hatására előfordulhat egy oxidatív stressz toleráns AF06 mutánsához hasonló törzs szelektálódása, amelynek csökkent a légzése, de a gyakran használt antimikotikumokkal szemben (flukonazol, voriconazol, amphotericin B, 5-fluoro-citozin) ellenállóbb (2., 6. táblázat). Rendkívül fontos kérdés, hogy az ROS-kal és az antimikotikumokkal szemben hogyan alakul ki a keresztolerancia, illetve az oxidánsok és antimikotikumok kombinációja hogyan

befolyásolja a *C. albicans* sejtek élettanát, a membrán összetételén keresztül a fluiditásig (Gyetvai és mtsai, 2006, 2007; Sokol-Anderson és mtsai; 1986, Liu és mtsai, 2005).

7. Irodalom

Alic N, Felder T, Temple MD, Gloeckner C, Higgins VJ, Briza P & Dawes IW (2004) Genome-wide transcriptional responses to a lipid hydroperoxide: adaptation occurs without induction of oxidant defenses. *Free Radic Biol Med* **37**: 23-35.

Anderson ME (1985) Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods Enzymol* **113**: 548-555.

Aoki S & Ito-Kuwa S (1987) Induction of petite mutation with acriflavine and elevated temperature in *Candida albicans*. *J Med Vet Mycol* **25**: 269-277.

Arancia G, Molinari A, Crateri P, Stringaro A, Ramoni C, Dupuis ML, Gomez MJ, Torosantucci A & Cassone A (1995) Noninhibitory binding of human interleukin-2-activated natural killer cells to the germ tube forms of *Candida albicans*. *Infect Immun* **63**: 280-288.

Babior BM, Kipnes RS & Curnutte JT (1970) Biological defence mechanism. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J Clin Invest* **52**: 741-744.

Bahr JT & Bonner WD Jr (1973) Cyanide-insensitive respiration. I. The steady states of skunk cabbage spadix and bean hypocotyl mitochondria. *J Biol Chem* **248**: 3441-3445.

Balla G, Jacob HS, Eaton JW, Belcher JD & Vercellotti GM (1991) Hemin: a possible physiological mediator of low density lipoprotein oxidation and endothelial injury. *Arterioscler Thromb* **11**: 1700-1711.

Bligh EG & Dyer WJ (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* **37**: 911-917.

Boyum A. (1984) Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood: isolation of mononuclear cells by one g centrifugation and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Lab Invest* **21**: 77

Braun BR & Johnson AD (1997) Control of filament formation in *Candida albicans* by the transcriptional repressor TUP1. *Science* **277**: 105-109.

Brennan ML, Anderson MM, Shih DM, Qu XD, Wang X, Mehta AC, Lim LL, Shi W, Hazen SL, Jacob JS, Crowley JR, Heinecke JW & Lusis AJ (2001) Increased atherosclerosis in myeloperoxidase-deficient mice. *J Clin Invest* **107**: 419-430.

Brun S, Aubry C, Lima O, Filmon R, Bergès T, Chabasse D & Bouchara JP (2003) Relationships between respiration and susceptibility to azole antifungals in *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother* **47**: 847-853.

Byun J, Mueller DM, Fabjan JS & Heinecke JW (1999) Nitrogen dioxide radical generated by the myeloperoxidase-hydrogen peroxide-nitrite system promotes lipid peroxidation of low density lipoprotein. *FEBS Lett* **455**: 243-246.

Calderone RA & Fonzi WA (2001) Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol.* **9**: 327-335.etc

Carter W.O., Narayanan P.K. & Robinson J.P. (1994) Intracellular hydrogen peroxide and superoxide anion detection in endothelial cells. *J. Leukoc. Biol.* **55**: 253-258.

Chiu D.,Stults F.,&Tappel A (1976) Purification and properties of rat lung soluble glutathione peroxidase. *Biochem. Biophys. Acta* **445**: 1134-1143.

Cremer J, Vatou V & Braveny I (1999) 2,4-(hydroxyphenyl)-ethanol, an antioxidative agent produced by *Candida* spp., impairs neutrophilic yeast killing *in vitro*. *FEMS Microbiol Lett* **170**: 319-325.

Doudican NA, Song B, Shadel GS & Doetsch PW (2005) Oxidative DNA damage causes mitochondrial genomic instability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **25**: 5196-5204.

Emri T, Pócsi I & Szentirmai A (1997) Glutathione metabolism and protection against oxidative stress caused by peroxides in *Penicillium chrysogenum*. *Free Radic Biol Med* **23**: 809-814.

Emri T, Bartok G & Szentirmai A (1994) Regulation of specific activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase in *Penicillium chrysogenum*. *FEMS Microbiol.Lett.* **117**: 67-70.

Emri T, Pócsi I & Szentirmai A (1999) Analysis of the oxidative stress response of *Penicillium chrysogenum* to menadione. *Free Radic Res* **30**: 125-132.

Emri T, Molnár Zs, Pusztahelyi T & Pócsi I (2004) Physiological and morphological changes in autolyzing *Aspergillus nidulans* cultures. *Folia Microbiol* **49**: 277-284.

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

Enjalbert B, Smith DA, Cornell MJ, Alam I, Nicholls S, Brown AJ & Quinn J (2006) Role of the Hog1 stress-activated protein kinase in the global transcriptional response to stress in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Mol Biol Cell* **17**: 1018-1032.

Evans MV, Turton HE, Grant CM & Dawes IW (1998) Toxicity of linoleic acid hydroperoxide to *Saccharomyces cerevisiae*: involvement of a respiration-related process for maximal sensitivity and adaptive response. *J Bacteriol* **180**: 483-90.

Felk, A., Kretschmar, M., Albrecht, A., Schaller, M., Beinhauer, S., Nichterlein, T., Sanglard, D., Korting, H.C., Schafer, W. and Hube, B. *Candida albicans* hyphal formation and the expression of the Efg1-regulated proteinases Sap4 to Sap6 are required for the invasion of parenchymal organs. (2002) *Infect. Immun.* 70, 3689-3700.

Fradin C, Kretschmar M, Nichterlein T, Gaillardin C, d'Enfert C & Hube B (2003) Stage-specific gene expression of *Candida albicans* in human blood. *Mol Microbiol.* **47**: 1523-1543.

Fradin C, De Groot P, MacCallum D, Schaller M, Klis F, Odds FC & Hube B (2005) Granulocytes govern the transcriptional response, morphology and proliferation of *Candida albicans* in human blood. *Mol Microbiol* **56**: 397-415.

Frankel S, Reitman S & Sonnenwirth AC (1970) Gradwohl's clinical laboratory methods and diagnosis. The C.V.Mosby Company, Saint Louis

Fekete-Forgács K, Gyüre L & Lenkey B (2000) Changes of virulence factors accompanying the phenomenon of induced fluconazole resistance in *Candida albicans*. *Mycoses* **43**: 273-279.

Genova ML, Pich MM, Bernacchia A, Bianchi C, Biondi A, Bovina C, Falasca AI, Formiggini G, Castelli GP & Lenaz G (2004) The mitochondrial production of reactive oxygen species in relation to aging and pathology. *Ann N Y Acad Sci* **1011**: 86-100.

Gow NA, Brown AJ & Odds FC (2002) Fungal morphogenesis and host invasion. *Curr Opin Microbiol* **5**: 366-371.

Greenley TL & Davies MJ (1992) Detection of radicals produced by reaction of hydroperoxides with rat liver microsomal fractions. *Biochim Biophys Acta* **1116**: 192-203.

Gyervai Á, Emri T, Takács K, Dergez T, Fekete A, Pesti M, Pócsi I & Lenkey B. (2006) Lovastatin possesses a fungistatic effect against *Candida albicans*, but does not trigger apoptosis in this opportunistic human pathogen. *FEMS Yeast Res* **6**: 1140-1148.

Gyervai Á, Emri T, Pusztahelyi T, Fekete A, Gyémánt Gy, Varga Z, Gazdag Z, Pesti M, Belágyi J, Emődy L, Pócsi I & Lenkey B (2007) High-dose methylprednisolone influences the physiology and virulence of *Candida albicans* ambiguously and enhances the candidacidal activity of the polyene antibiotic amphotericin B and the superoxide generating agent menadione. *FEMS Yeast Res*, **7(2)**: 265-75.

Hamilton AJ & Holdom MD (1999) Antioxidant systems in the pathogenic fungi of man and their role in virulence. *Med Mycol* **37**: 375-389.

Hromatka BS, Noble SM & Johnson AD (2005) Transcriptional response of *Candida albicans* to nitric oxide and the role of the *YHB1* gene in nitrosative stress and virulence. *Mol Biol Cell* **16**: 4814-4826.

Hube B (2004) From commensal to pathogen: stage- and tissue-specific gene expression of *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol* **7**: 336-341.

Huh WK & Kang SO (2001) Characterization of the gene family encoding alternative oxidase from *Candida albicans*. *Biochem J* **356**: 595-604.

Huh WK, Kim ST, Kim H, Jeong G & Kang SO (2001) Deficiency of D-erythroascorbic acid attenuates hyphal growth and virulence of *Candida albicans*. *Infect Immun* **69**: 3939-3946.

Hwang CS, Rhie GE, Oh JH, Huh WK, Yim HS & Kang SO (2002) Copper- and zinc-containing superoxide dismutase (Cu/ZnSOD) is required for the protection of *Candida albicans* against oxidative stresses and the expression of its full virulence. *Microbiology* **148**: 3705-3713.

Ibrahim AS, Mirbod F, Filler SG, Banno Y, Cole GT, Kitajima Y, Edwards JE Jr, Nozawa Y & Ghannoum MA (1995) Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*. *Infect Immun* **63**: 1993-1998.

Ito-Kuwa S, Aoki S, Watanabe T, Ehara T & Osafune T (1988) Fluorescence microscopic studies on mitochondria and mitochondrial nucleoids in a wild-type strain and respiratory mutants of *Candida albicans*. *J Med Vet Mycol* **26**: 207-17.

Jamieson DJ, Stephen DWS & Terrière EC (1996) Analysis of the adaptive oxidative stress response of *Candida albicans*. *FEMS Microbiol Lett* **138**: 83-88.

Kärber G (1931) Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Arch Exp Path Pharmacol* **162**: 480-483.

Leidich SD, Ibrahim AS, Fu Y, Koul A, Jessup C, Vitullo J, Fonzi W, Mirbod F, Nakashima S, Nozawa Y & Ghannoum MA (1998) Cloning and disruption of *caPLB1*, a phospholipase B gene involved in the pathogenicity of *Candida albicans*. *J Biol Chem* **273**: 26078-26086.

Liu TT, Lee RE, Barker KS, Lee RE, Wei L, Homayouni R & Rogers PD (2005) Genome-wide expression profiling of the response to azole, polyene, echinocandin, and pyrimidine antifungal agents in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* **49**: 2226-2236.

Lo HJ, Kohler JR, DiDomenico B, Loebenberg D, Cacciapuoti A & Fink GR (1997) Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell* **90**: 939-949.

Lorenz MC & Fink GR (2001) The glyoxylate cycle is required for fungal virulence. *Nature* **412**: 83-86.

Lorenz MC, Bender JA & Fink GR (2004) Transcriptional response of *Candida albicans* upon internalization by macrophages. *Eukaryot Cell* **3**: 1076-1087.

Macho, A., Decaudin, D., Castedo, M., Hirsch, T., Susin, S.A., Zamzami, N. & Kroemer, G. (1996) Chloromethyl-X-rosamine is an aldehyde-fixable potential-sensitive fluorochrome for the detection of early apoptosis. *Cytometry* **25**: 333-340.

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

Naglik, J. R., S. J. Challacombe, and B. Hube. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. (2003) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**:400-428.

Naglik, J., Albrecht, A., Bader, O. and Hube, B. *Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions. (2004) *Cell. Microbiol.* **6**: 915-926.

National Committee for Clinical Standard (1997) Reference Method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast; approved standard M27-A National Committee for Clinical Standard Wayne, Pa.

National Committee for Clinical Standard (2002) Reference Method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast; approved standard M27-A2 National Committee for Clinical Standard Wayne, Pa.

Oberley L. and Spitz D. (1984) Assay of superoxide dismutase activity in tumor tissue. *Methods Enzymol.* **105**: 457-464.

Osiewacz HD & Borghouts C (2000) Mitochondrial oxidative stress and ageing in the filamentous fungus *Podospora anserina*. *Ann N Y Acad Sci* **908**: 31-39.

Peterson GL (1983) Determination of total protein. *Methods Enzymol* **91**: 95-119.

Pócsi I, Miskei M, Karányi Z, Emri T, Ayoubi P, Pusztahelyi T, Balla G & Prade RA (2005) Comparison of gene expression signatures of diamide, H₂O₂ and MSB exposed *Aspergillus nidulans* cultures – linking genome-wide transcriptional changes to cellular physiology. *BMC Genomics* **6**: Article No: 182.

Remold H., Fasold H. & Staib F. (1968) Purification and characterization of proteolytic enzyme from *Candida albicans*. *Biochim Biophys Acta.* **167(2)**:399-406.

Roggenkamp R., Sahm H. & Wagner F (1974) Microbial assimilation of methanol induction and function of catalase in *Candida albicans*. *FEBS Lett.* **41**: 283-286.

Samaranayake L.P., Raeside J.M. & MacFarlane T.W. (1984) Factors affecting the phospholipase activity of *Candida* species *in vitro*. *Sabouraudia* **22**: 201-207.

Savenkova MI, Mueller DM & Heinecke JW (1994) Tyrosyl radical generated by myeloperoxidase is a physiological catalyst for the initiation of lipid peroxidation in low density lipoprotein. *J Biol Chem* **269**: 20394-20400.

Schaller, M., Korting, H. C., Schafer, W., Bastert, J., Chen, W., and Hube, B. (1999) *Mol. Microbiol.* **34**: 169–180

Singh P, Chauhan N, Ghosh A, Dixon F & Calderone R (2004) *SKN7* of *Candida albicans*: mutant construction and phenotype analysis. *Infect Immun* **72**: 2390-2394.

Smith DA, Nicholls S, Morgan BA, Brown AJ & Quinn J (2004) A conserved stress-activated protein kinase regulates a core stress response in the human pathogen *Candida albicans*. *Mol Biol Cell* **15**: 4179-4190.

Sokol-Anderson ML, Brajtburg J & Medoff G (1986) Amphotericin B-induced oxidative damage and killing of *Candida albicans*. *J Infect Dis* **154**: 76-83.

Ullmann BD, Myers H, Chirananand W, Lazzell AL, Zhao Q, Vega LA, Lopez-Ribot JL, Gardner PR & Gustin MC (2004) Inducible defense mechanism against nitric oxide in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **3**: 715-723.

Varga Z, Kárpáti I, Paragh G, Buris L & Kakuk G (1997) Relative abundance of some free fatty acids in plasma of uremic patients: relationship between fatty acids, lipid parameters, and diseases. *Nephron* **77**: 417-421.

Varga Z, Czompa A, Kakuk G & Antus S (2001) Inhibition of superoxide anion release and hydrogen peroxide formation in PMNLs by flavonolignans. *Phytother Res* **15**: 608-612.

Vázquez-Torres A & Balish E (1997) Macrophages in resistance to candidiasis. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**: 170-192.

Warholm M., Guthemberg C., von Bahr C. & Mannervik B. (1985) Glutathione transferases from human liver. *Methods Enzymol.* **113**: 499-504.

Wei YH, Lu CY, Lee HC, Pang CY & Ma YS (1998) Oxidative damage and mutation to mitochondrial DNA and age-dependent decline of mitochondrial respiratory function. *Ann N Y Acad Sci* **854**: 155-170.

Wei YH & Lee HC (2002) Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and impairment of antioxidant enzymes in aging. *Exp Biol Med (Maywood)* **227**: 671-682.

8. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények és előadások

Közlemények:

Fekete A., Emri T., Gyetvai A., Gazdag Z., Pesti M., Varga Zs., Balla J., Cserhati Cs., Emődy L., Gergely L. & Pócsi I. (2007) Development of oxidative stress tolerance resulted in reduced ability to undergo morphological transitions and decreased pathogenicity in a *tert*-butylhydroperoxide tolerant mutant of *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res.* **7(6)**: 834-47.

Fekete A., Pócsi I., Emri T., Gyetvai A., Gazdag Z., Pesti M., Karányi Zs., Majoros L., Gergely L. & Pócsi I. (2008) Physiological and morphological characterization of *tert*-butylhydroperoxide tolerant *Candida albicans* mutants. *J Basic Microbiol.* **48(6)**: 480-7.

Előadások, posztterek:

Fekete A., Emri T., Gazdag Z., Majoros L., Pesti M., Gergely L. & Pócsi I. Oxidative stress tolerance and pathogenicity of a lipid peroxide tolerant mutant of *Candida albicans*
„A legjobb fiatal szerző” (Mikológia szekció) 13th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology, Balatonfüred, 2003.

Fekete A., Emri T., Gazdag Z., Blaskó A., Majoros L., Nagy E., Varga Zs., Balla J., Pesti M., Gergely L. & Pócsi I. Egy lipid-peroxid toleráns *Candida albicans* mutáns jellemzése. A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2004. évi Nagygyűlése és a X. Fermentációs Kollokvium, Keszthely, 2004.

Egyéb közlemények:

Sámi, T. Pusztahelyi, T. Emri, Z. Varecza, A. Fekete, A. Grallert, ZS. Karányi, L. Kiss and I. Pócsi : Autolysis and aging of *Penicillium chrysogenum* cultures under carbon starvation: chitinase production and antifungal effect of allosamidin. (2001) *J Gen Appl Microbiol.* **47(4)**: 201-211

Gyervai Á, Emri T, Takács K, Dergez T, Fekete A, Pesti M, Pócsi I & Lenkey B. (2006) Lovastatin possesses a fungistatic effect against *Candida albicans*, but does not trigger apoptosis in this opportunistic human pathogen. *FEMS Yeast Res* **6**: 1140-1148.

Gyervai Á, Emri T, Pusztahelyi T, Fekete A, Gyémánt Gy, Varga Z, Gazdag Z, Pesti M, Belágyi J, Emődy L, Pócsi I & Lenkey B (2007) High-dose methylprednisolone influences the physiology and virulence of *Candida albicans* ambiguously and enhances the candidacidal activity of the polyene antibiotic amphotericin B and the superoxide generating agent menadione. *FEMS Yeast Res*, **7(2)**: 265-75.

Fekete A, Soos L, Szekanez Z, Szabo Z, Szodoray P, Barath S, Lakos G. (2007) Disturbances in B- and T-cell homeostasis in rheumatoid arthritis: suggested relationships with antigen-driven immune responses. *J Autoimmun.* **29(2-3)**: 154-63.

Soós L, Szekanez Z, Szabó Z, Fekete A, Zeher M, Horváth IF, Dankó K, Kapitány A, Végyári A, Sipka S, Szegedi G, Lakos G. Clinical evaluation of anti-mutated citrullinated vimentin by ELISA in rheumatoid arthritis. (2007) *J Rheumatol.* **34(8)**:1658-63.

Lakos G, Soós L, Fekete A, Szabó Z, Zeher M, Horváth IF, Dankó K, Kapitány A, Gyervai A, Szegedi G, Szekanez Z. (2008) Anti-cyclic citrullinated peptide antibody isotypes in rheumatoid arthritis: association with disease duration, rheumatoid factor production and the presence of shared epitope. *Clin Exp Rheumatol.* **26(2)**: 253-60.

Szekanez Z, Soós L, Szabó Z, Fekete A, Kapitány A, Végyári A, Sipka S, Szücs G, Szántó S, Lakos G. (2008) Anti-Citrullinated Protein Antibodies in Rheumatoid Arthritis: As Good as it Gets? *Clin Rev Allergy Immunol.* **34(1)**: 26-31.