

**AZ ANTIFUNGÁLIS REZISZTENCIA KIALAKULÁSÁNAK
ÉS KÖVETKEZMÉNYÉNEK VIZSGÁLATA A
HUMÁNPATOGÉN *CANDIDA AURIS* ESETÉBEN**

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

BOHNER FLÓRA FATIME

TÉMAVEZETŐK:

PROF. DR. GÁCSER ATTILA

DR. TÓTH RENÁTA

BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA



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

SZEGED

2023

TARTALOMJEGYZÉK

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
2. BEVEZETÉS	6
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	7
3.1. Gombák által okozott fertőzések	7
3.2. <i>Candida</i> nemzetség klinikai jelentősége	7
3.3. A <i>Candida auris</i> általános jellemzése és az általa kiváltott fertőzések epidemiológiai sajátosságai	8
3.3.1. A <i>C. auris</i> eredete	9
3.3.2. A <i>C. auris</i> morfológiai sajátosságai	11
3.3.3. A <i>C. auris</i> izolátumok osztályozása	11
3.3.4. A <i>Candida auris</i> szerepe a klinikumban	12
3.4. Szisztémás <i>Candida</i> fertőzések ellen alkalmazott antifungális szerek, ezek hatásmechanizmusa, illetve a velük szemben kialakuló rezisztencia	14
3.4.1. Poliének	15
3.4.1.1. Amfotericin B rezisztencia	16
3.4.1.2. Az amfotericin B rezisztencia <i>C. auris</i> esetén	17
3.4.2. Azolok	17
3.4.2.1. Flukonazol	18
3.4.2.2. Vorikonazol	18
3.4.2.3. Posakonazol	18
3.4.2.4. Triazol rezisztencia	19
3.4.2.5. A triazol rezisztencia <i>C. auris</i> esetén	21
3.4.3. Echinocandinok	22
3.4.3.1. Mikafungin	23
3.4.3.2. Echinocandin rezisztencia	23
3.4.3.3. Az echinocandin rezisztencia <i>C. auris</i> esetén	25
3.5. A <i>C. auris</i> részletes jellemzése	25
3.5.1. A <i>C. auris</i> stressztoleranciájának jellegzetességei	25
3.5.2. <i>C. auris</i> sejtfal struktúrája	26
3.5.3. Plazmamembrán felépítése és az ergosterol bioszintézis útvonala	28
3.5.4. A <i>C. auris</i> multi-omikai jellemzése	29
3.5.4.1. Lipidomikai változások szerepe az antifungális rezisztenciában	30
3.5.4.2. A <i>C. auris</i> genomikai sajátosságai	30
3.5.4.3. Antifungális szerekkel történő kezeléshez köthető metabolomikai változások	31
3.6. A gomba patogének immunsejtek általi felismerése	32
3.7. A rezisztencia kialakulása során bekövetkező fitness változások hatása a virulenciára	34
3.8. A mikroevolúció jelentősége a virulencia-rezisztencia összefüggés vizsgálatában	35
4. CÉLKITŰZÉSEK	36
5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	37
5.1. ANYAGOK	37
5.1.1. Felhasznált gombatörzsek	37
5.1.2. Tápoldatok, táptalajok és egyéb reagensek	37
5.1.3. Abiotikus stressz vizsgálatához használt táptalajok	38
5.1.4. Antifungális szerek	40
5.1.5. Felhasznált fluoreszcens festékek, antitestek és inhibitorok	40
5.1.6. Felhasznált sejtvonalak	40
5.1.7. Felhasznált primerek listája	40
5.1.8. <i>In vivo</i> kísérletben alkalmazott egerek	41

5.2. MÓDSZEREK	41
5.2.1. Felhasznált gombatörzsek fenntartása és tenyésztése	41
5.2.2. Antifungális érzékenység meghatározása	41
5.2.3. Evolvált törzsek létrehozása	42
5.2.4. Törzsek általános növekedési képességének meghatározása	44
5.2.5. Evolvált törzsek abiotikus stressz toleranciájának meghatározása	44
5.2.6. Sejtfal összetételének meghatározása fluoreszcens festés segítségével	45
5.2.7. Szterol összetétel meghatározása analitikai módszerekkel	46
5.2.8. Efflux pumpák aktivitásának vizsgálata fluoreszcens jelölés segítségével	46
5.2.9. A törzsek biofilmképző képességének vizsgálata XTT redukciós próbával	47
5.2.10. RNS izolálás	47
5.2.11. cDNS szintézis	48
5.2.12. Kvantitatív valós-idejű PCR	48
5.2.13. Minták előkészítése teljes genom szekvenáláshoz	49
5.2.14. Teljes genom szekvenálás analízise	49
5.2.15. Minták előkészítése a metabolomikai és lipidomikai vizsgálatokhoz	50
5.2.15.1. Létrehozott törzsek metabolomikai vizsgálata (GC-MS)	51
5.2.15.2. Létrehozott törzsek lipidomikai vizsgálata (UHPLC-HRMS)	51
5.2.16. <i>In vitro</i> fagocitózis vizsgálat	52
5.2.17. <i>In vivo</i> egérfertőzőségi modell és a kolónia formáló egységek (CFU) kvantitatív meghatározása	52
5.2.18. Statisztikai analízis	53
5.2.19. Adatbázis hozzáférések	53
5.2.20. Etikai engedély	53
6. EREDMÉNYEK	54
6.1. Evolvált <i>C. auris</i> törzsek létrehozása	54
6.2. Létrehozott rezisztens törzsek antifungális érzékenységének vizsgálata	54
6.2.1. Amfotericin B rezisztens törzsek antifungális érzékenysége	54
6.2.2. Triazol rezisztens törzsek antifungális érzékenysége	55
6.2.3. Mikafungin rezisztens törzsek antifungális érzékenysége	56
6.3. Létrehozott törzsek általános növekedési képességének vizsgálata	57
6.3.1. Amfotericin B rezisztens törzsek növekedési görbéje	57
6.3.2. Triazol rezisztens törzsek növekedési görbéje	58
6.3.3. Mikafungin rezisztens törzsek növekedési görbéje	58
6.4. Az evolvált <i>C. auris</i> törzsek abiotikus stressz hatásokkal szembeni érzékenységének vizsgálata	59
6.4.1. Amfotericin B rezisztens törzsek abiotikus stressz toleranciája	59
6.4.2. Triazol rezisztens törzsek abiotikus stressz toleranciája	60
6.4.3. Mikafungin rezisztens törzsek abiotikus stressz toleranciája	61
6.5. A szerzett triazol rezisztencia hatása a törzsek membrán szterol összetételére	62
6.5.1. Szterol tartalom változása antifungális kezelés hiányában	63
6.5.2. Szterol tartalom változása triazol kezelt minták esetén	64
6.8. Az antibiotikum rezisztencia hatása a törzsek sejtfal homeosztázisára	65
6.8.1. Amfotericin B rezisztens törzsek sejtfalának változása	65
6.8.2. Triazol rezisztens törzsek sejtfalának változása	66
6.8.2.1. Áramlási citometria	66
6.8.2.2. Mikroszkópos vizsgálat	67
6.8.3. Mikafungin rezisztens törzsek sejtfalának változása	67
6.9. Triazol evolvált törzsek efflux pumpa aktivitás vizsgálata	68
6.9.1. Efflux pumpák funkcionális vizsgálata	68
6.9.2. Efflux pumpák expressziójának vizsgálata valós idejű RT-qPCR módszerrel	69
6.10. A létrehozott törzsek genomszekvenciájának analízise	71
6.10.1. Triazol evolvált törzsek	71

6.10.2. Mikafungin evolált törzsek	72
6.11. Triazol evolált törzsek metabolomikai vizsgálata	74
6.12. Triazol evolált törzsek lipidomikai vizsgálata	76
6.13. A <i>BCY1</i> gén mutációjához köthető fenotípus változások vizsgálata	77
6.13.1. Rapamicin érzékenység vizsgálata	78
6.13.2. Biofilm képzés	79
6.14. A J774.2 makrofágok fagocitáló képességének vizsgálata <i>C. auris</i> törzsek jelenlétében	79
6.14.1. AMB ^{ev} törzsek J774.2 makrofág szerű sejtek általi felvételének <i>in vitro</i> vizsgálata	80
6.14.2. Triazol evolált törzsek J774.2 makrofág szerű sejtek általi felvételének <i>in vitro</i> vizsgálata	80
6.14.3. MICA ^{ev} törzsek J774.2 makrofág szerű sejtek általi felvételének <i>in vitro</i> vizsgálata	81
6.15. <i>In vivo</i> virulencia vizsgálat egér intravénás fertőzési modellben	81
6.15.1. AMB ^{ev} törzsek virulenciájának vizsgálata	82
6.15.2. Triazol evolált törzsek virulenciájának vizsgálata	83
6.15.3. MICA ^{ev} törzsek virulenciájának vizsgálata	84
6.16. Az agyszövet kolonizációjához köthető gének expressziójának vizsgálata MICA ^{ev} törzsekben	85
6.17. Szervek gomba kolonizáltságának vizsgálata hosszú távú fertőzés esetén	85
7. ÉRTÉKELÉS	88
7.1. Amfotericin B mikroevolúció	88
7.2. Triazol mikroevolúció	89
7.3. Mikafungin mikroevolúció	94
8. ÖSSZEFOGLALÁS	96
9. SUMMARY	99
10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	102
11. IRODALOMJEGYZÉK	104

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ABC	ATP kötő kazetta (<u>A</u> TP <u>B</u> inding <u>C</u> assette)
ALS3	Agglutinin-szerű szekvencia 3 (<u>A</u> gglutinin- <u>L</u> ike Sequence <u>3</u>)
AMB^{ev0}	<u>A</u> Mfotericin <u>B</u> <u>ev</u> olvált
ATP	Adenozin-trifoszfát (<u>A</u> denosine <u>T</u> ri <u>P</u> hosphate)
BALB/c	Bagg albínó egér törzs (<u>B</u> agg <u>ALB</u> ino mice strain)
BCY1	<u>B</u> ypass of <u>C</u> <u>Y</u> cllic-AMP requirement 1
cAMP/PKA	Ciklikus adenozin-monofoszfát/protein kináz A útvonal (<u>C</u> yclic <u>A</u> denosine <u>M</u> ono <u>P</u> hosphate/ <u>P</u> rotein <u>K</u> inase <u>A</u> pathway)
CDC	Betegségmegelőzési és Járványügyi Központ (<u>C</u> entral for <u>D</u> isease <u>C</u> ontrol and Prevention)
CDR	<i>Candida</i> drog rezisztencia gén (<u>C</u> andida <u>D</u> rug <u>R</u> esistance)
Cer	Ceramid (<u>C</u> <u>E</u> Ramide)
CFU	Kolónia formáló egység (<u>C</u> olony <u>F</u> orming <u>U</u> nit)
ConA- FITC	Konkanavalin A-fluoreszcein-izotiocianát (<u>C</u> oncanavalin <u>A</u> <u>F</u> luorescein <u>I</u> so <u>T</u> hio <u>C</u> yanate)
DG	Diacilglicerol (<u>D</u> iacil <u>G</u> lycerol)
DGTS/DGTA	Diacilglicerol-trimetil-homoszerin/Diacilglicerol-β-alanin (<u>D</u> iacyl <u>G</u> lycerol <u>T</u> rimethylhomo <u>S</u> erine/ <u>D</u> iacyl <u>G</u> lycerol <u>T</u> rimethyl- β- <u>A</u> lanine)
DMEM	<u>D</u> ulbecco's <u>M</u> odified <u>E</u> agle <u>M</u> edium
DMSO	Dimetil-szulfoxid (<u>D</u> i <u>M</u> ethyl <u>S</u> ulf <u>O</u> xide)
ERG	<u>E</u> R <u>G</u> oszterol bioszintézis gének
FBS	Újszülött borjú szérum (<u>F</u> etal <u>B</u> ovine <u>S</u> erum)
FCB	Áramlási citometria blokkoló puffer (<u>F</u> low <u>C</u> ytometry <u>B</u> locking buffer)
FCW	Áramlási citometria mosó puffer (<u>F</u> low <u>C</u> ytometry <u>W</u> ashing buffer)
FKS	1,3-β-D-glükán szintáz gének
FLU^{ev0}	<u>F</u> L <u>U</u> konazol <u>ev</u> olvált
HOG	Mitogén aktivált protein kináz (<u>H</u> igh <u>O</u> smolarity <u>G</u> lycerol response)
HS	Mutációs forrópont (<u>H</u> ot <u>S</u> pot)
Hsp90	Hőshock protein 90 (<u>H</u> eat <u>s</u> hock <u>p</u> rotein <u>90</u>)
IV	<u>I</u> ntra <u>V</u> énás
KF	<u>K</u> alkofluor <u>F</u> ehér
KV	<u>K</u> ongó <u>V</u> örös
MDR	Multidrog rezisztens (<u>M</u> ulti <u>D</u> rug <u>R</u> esistant)

MDR1	Multi drog rezisztencia 1 gén (M ulti D rug R esistance 1)
MFS	Efflux elősegítő elsődleges transzporter szupercsalád (M ajor F acilitator S uperfamily)
MIC	Minimális gátló koncentráció (M inimal I nhibitory C oncentration)
MICA^{evo}	MICA fungin evol vált
MOPS	3-(N-morfolino) propánszulfonsav (3-[N- M Oorpholino] P ropane S ulfonic acid)
MRR1	Multidrog rezisztencia regulátor 1 (M ultidrug R esistance R egulator 1)
NAC	Nem- <i>albicans</i> fajok (N on- A lbicans C andida species)
PBS	Foszfát pufferelt só oldat (P hosphate B uffered S aline)
PC	Foszfatidilkolin (P hosphatidil C holine)
PDR1	Pleiotropikus drog rezisztencia 1 gén (P leiotropic D rug R esistance 1)
PE	Foszfatidil-etanolamin (P hosphatidyl E thanolamine)
PG	Foszfatidil-glicerol (P hosphatidyl G lycerol)
PI	Foszfatidil-inozitol (P hosphatidyl I nositol)
PKA	Protein kináz A útvonal (P rotein K inase A pathway)
PKC	Protein kináz C útvonal (P rotein K inase C pathway)
POS^{evo}	POS aconazol evol vált
RPMI	R oswell P ark M emorial I nstitute
SDS	Nátrium-dodecil szulfát (S odium D odecyl S ulphate)
SNP	Egyedi nukleotid polimorfizmus (S ingle N ucleotide P olymorphism)
SNQ2	S ensitivity to 4- N itro Q uinline-N-oxide 2
SSA2	S tress- S eventy subfamily A 2
TAC1	CDR gének transzkripció aktivátora 1 (T ranscriptional A ctivator of C DR genes 1)
TE	T ris- E DTA puffer
TG	Triacilglicerol (T ryacyl G lycerol)
TOR	Rapamicin által gátolt útvonal (T arget O f R apamycin)
TPK2	T akashi's P rotein K inase 2
TPO3	Poliamin transzporter 3 (T ransporter of P OLYamines 3)
UPC2	U Ptake C ontrol 2
VOR^{evo}	VOR iconazol evol vált
WGA- TRIC	Búzacsíra agglutinin- tetrametil-rodamin-izotiocianát (W heat G erm A gglutinin- T etramethyl R hodamine I so- T hio C yanate)
YPD	Élesztőkivonat-pepton-D-glükóz (Y east P eptone D -glucose)

2. Bevezetés

A patogén gombák által okozott megbetegedések napjainkban jelentős egészségügyi kockázattal bírnak. Az enyhe, főként a beteg kültakaróját, illetve nyálkahártyáját érintő fertőzések bár számos kellemetlenséget okoznak, de könnyen diagnosztizálhatóak és kezelésükre is több antimikotikum áll rendelkezésre¹. Az ezen megbetegedéseket okozó patogének azonban a testfelszín által képzett határvonalat átlépve, opportunista módon, invazív fertőzések kialakítására képesek. A szervezetbe jutott gombasejtek megfelelő körülmények között beléphetnek a vérkeringésbe (fungaemia) ami disszeminált fertőzéshez és egyes szervrendszerek károsodásához vezethet^{2,3}.

A patogén gombák által okozott végzetes kimenetelű fertőzések jelentős hányadért a *Candida* nemzetségbe sorolható fajok tehetőek felelőssé². Bár a nemzetségen belül a *Candida albicans* a leggyakrabban azonosítható, azonban az utóbbi évtizedekben az úgynevezett nem-*albicans* (NAC) fajok által okozott fertőzések aránya nőtt⁴. Az átalakuló epidemiológiai trendek mellett új, feltörekvő *Candida* fajok is megjelentek. Ilyen a 2009-ben jellemzett *Candida auris* is⁵. Azonosításuk földrajzi helye alapján a *C. auris* izolátumokat filogenetikai csoportokra osztották, melyekre a szakirodalom kládként hivatkozik. A genetikai variabilitásuk mellett az egyes kládok izolátumai eltérhetnek az általuk okozott fertőzések jellegében, illetve az antifungális szerekekkel szembeni érzékenységükben is⁶⁻⁸.

A *C. auris* jellegzetességei közül a legnagyobb figyelmet a gombaellenes szerekekkel szembeni kivételes ellenállóképessége kapja. Az azonosított izolátumok több mint 90%-a rezisztens a szisztémás fertőzések kezelése során leggyakrabban alkalmazott flukonazolra. Ezenfelül amfotericin B terápiára a törzsek közel 30%-a, míg echinocandinokra 5%-a nem reagál. A több antifungális szer csoporttal szemben rezisztens (MDR) *C. auris* izolátumok aránya is magasabb, mint az más *Candida* fajok esetében megfigyelhető. Emellett a közelmúltban az összes antimikotikum csoporttal szemben rezisztens, vagyis pán drog rezisztens (PDR) *C. auris* izolátumokat is azonosítottak⁹. A patogén főként nozokomiális járványok kialakításáért felelős, így gyakran legyengült immunrendszerű betegeket veszélyeztet. Az érintett betegpopuláció és a nagy számban előforduló antifungális rezisztencia miatt a *C. auris* fertőzések mortalitási aránya 30-70% közé tehető¹⁰.

Munkánk során a szerzett antifungális rezisztencia *C. auris* törzsek életképességére, illetve virulenciájára gyakorolt hatásának vizsgálatuk. Ehhez, *in vitro* mikroevolúciós módszer segítségével két izolátumból kiindulva hoztunk létre rezisztens törzseket. A generált törzseket ezt követően több szempontból is vizsgáltuk annak érdekében, hogy megállapítsuk, hogy a rezisztencia kialakulása milyen egyéb fenotípus, illetve genotípus változásokkal hozható összefüggésbe. A továbbiakban a virulenciában bekövetkező esetleges változások irányát és mértékét vizsgáltuk *in vivo* állatmodellekben. Ezzel választ kerestünk arra a kérdésre, hogy *C. auris* esetében jellemző-e a számos *Candida* faj esetében korábban már megfigyelt, szerzett rezisztenciára visszavezethető fitness csökkenés.

3. Irodalmi áttekintés

3.1. Gombák által okozott fertőzések

A patogén gombák által okozott megbetegedések előfordulása jelentős társadalmi-, gazdasági-, geográfiai- és kulturális eltéréseket mutat. Ennek ellenére megfigyelhető, hogy a megbetegedéseket leggyakrabban kiváltó fajok stabilan öt nemzetségből kerülnek ki: *Aspergillus*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Pneumocystis*, illetve endemikus területeken *Histoplasma*^{2,3}. Ezen nemzetségek egyes képviselői évente mintegy ~1,7 milliárd páciens esetében okoznak kültakarót érintő testfelszíni fertőzéseket¹¹. További gyakran diagnosztizált elváltozás a nyálkahártyák gombák általi kolonizációja, amely főleg a szájüreget és a genitális traktust érinti. Ezek közül is a leggyakoribb a vulvovaginális *Candida* fertőzés (*candidiasis*), ami a gyermekvállalási korban lévő nők 50-75%-a esetében diagnosztizálható. Ezen fertőzés esetében a kiújulás veszélye is fokozott: a betegek 5-8%-a (~75 millió fő) legalább évente négy alkalommal tapasztal visszatérő fertőzést¹². Bár ritkábban fordulnak elő, de súlyosabb tünetegyüttest okoznak az invazív gombafertőzések, amelyek megfelelő diagnózis és kezelés hiányában akár végzetesek is lehetnek. Egyes tanulmányok a patogén gombákhoz köthető elhalálozások számát évente 1,5 millió főre becsülik³. Ez közel azonos a halálos kimenetelű tuberkulózis esetek, illetve mintegy háromszorosa a malária fertőzéshez köthető végzetes esetek számának^{13,14}. Mivel a gombák által okozott fertőzések esetén a helyes diagnózis felállítása főleg a limitált forrásokkal rendelkező országokban nehezen megvalósítható, így a becsült mortalitási adatok valószínűleg alacsonyabbak a valós számoknál. A megfelelő adatgyűjtést tovább nehezíti, hogy ezekben a régiókban általában nem állnak rendelkezésre gombafertőzésekre vonatkozó megfigyelési, illetve tájékoztatási programok³. Ennek ellenére az epidemiológiai beszámolók rámutatnak, hogy a bakteriális, illetve virális eredetű megbetegedések kutatása mellett, a patogén gombákkal kapcsolatos ismereteink szélesítése is szükséges.

3.2. *Candida* nemzetség klinikai jelentősége

A *Candida* fajok által okozott fertőzések - összefoglaló néven *candidiasis* – száma világszerte folyamatosan emelkedik⁴, ami több okra vezethető vissza: szélesspektrumú antibiotikumok használata, immunszuppresszióval járó terápiák alkalmazása és a hosszabb távon történő kórházi közegben tartózkodás³. Számos tanulmány további kockázati tényezők közé sorolja a cukorbetegséget, hasnyálmirigy gyulladást, illetve az immunrendszer rendellenes működésével járó megbetegedéseket (pl: neutropénia, CARD9 elégtelenség)^{3,15-17} valamint a beültetett orvosi eszközök (katéterek, söntök, protézisek) hosszútávú alkalmazását^{2,3,18}.

A *Candida* nemzetséghez köthető megbetegedések globális elterjedését, illetve a hozzájuk kapcsolódó elhalálozások számát az egyes országokra vonatkozó statisztikák összesítésével becsülhetjük meg. Egy korábbi összefoglaló tanulmány szerint évente körülbelül 400 000 beteg (5,9/100 000 fő) szenved *Candida* fajok által okozott szisztémás fertőzésben². Egy későbbi tanulmány ezt a számot már

700 000 főre becsüli³, mely alapján egy folyamatosan növekvő tendenciát feltételezhetünk. Mindkét tanulmány hangsúlyozza az elhalálozások kiemelten magas arányát (~27-42%)^{2,3}.

A patogén gombák által kiváltott fertőzések kezelésének első lépése a megfelelő diagnózis felállítása. Az Európai Unió alacsonyabb GDP-vel rendelkező országaiban gyakran nem állnak rendelkezésre egyes diagnosztikai eszközök (pl. a MALDI-TOF), melyek lehetővé tennék a patogének fajsztípus beazonosítását. A fajokra jellemző eltérő antifungális érzékenység miatt, a pontos meghatározás sok esetben létfontosságú a megfelelő terápiás szer megválasztásához. A nem megfelelő antifungális szer alkalmazása mellett, hogy növeli a kezelés időtartamát és a rezisztencia kialakulásának gyakoriságát, még rendkívül költséges is^{16,19}.

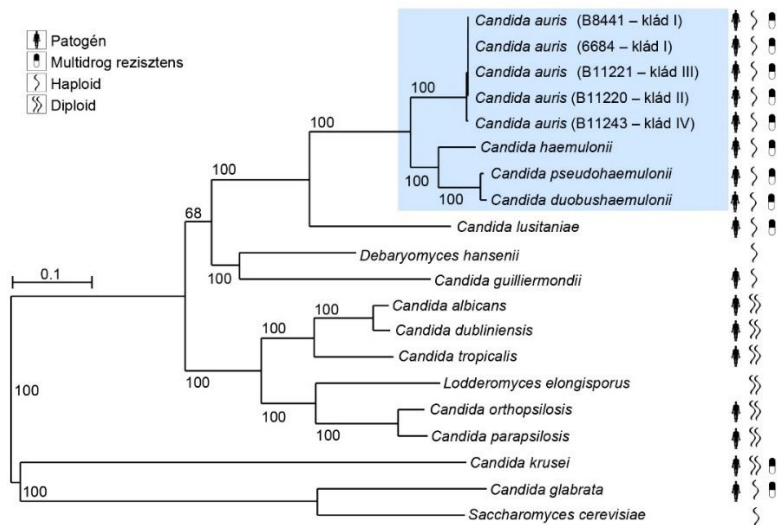
A diagnosztikai eszközök mellett az antifungális szerek elérhetősége Európában szintén régió függő. Az alacsonyabb jövedelemmel (GDP >30 000 dollár/fő) rendelkező országokban található egészségügyi intézmények körülbelül 25%-ában egyáltalán nem állnak rendelkezésre az invazív *candidiasis* kezelésére elsődlegesen ajánlott echinocandin típusú gombaellenes szerek²⁰. Ezekben az intézményekben a triazol típusú szerek széleskörű használata jellemző, amelyek mellett, hogy hozzájárulnak a rezisztens törzsek szelekciójához, egyes patogének, mint például a *C. auris* kezelésére gyakran hatástalannak bizonyulnak²¹.

Az utóbbi évtizedek statisztikai adatai rámutatnak, hogy a *Candida* nemzetségen belül az egyes fajok előfordulásának aránya folyamatosan változik. A *Candida albicans* továbbra is a leggyakrabban izolálható *Candida* faj, azonban a nem-*albicans* (NAC) fajok is egyre gyakrabban fordulnak elő páciensekben. A feltörekvő fajok egymáshoz viszonyított aránya nagyban függ a vizsgált terület földrajzi elhelyezkedésétől, illetve a megfigyelt beteg populációtól. Gyakran beazonosítható nem-*albicans* faj a *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, illetve a *Candida tropicalis*^{1,22,23}. Az elmúlt években azonban új, emberi megbetegedéseket korábban nem okozó fajok is előtérbe kerültek, úgy, mint a *Candida auris*^{1,18,22}.

3.3. A *Candida auris* általános jellemzése és az általa kiváltott fertőzések epidemiológiai sajátosságai

A *Candida auris*-t első alkalommal Satoh és munkatársai írták le egy 2009-ben megjelent tanulmányukban⁵. Az első általuk jellemzett izolátumot egy Japánban található kórházban azonosították, egy női páciens külső hallójáratából vett fülváladék minta vizsgálatára. A korábban még ismeretlen faj potenciális klinikai jelentőségét már vizsgálatának korai stádiumában feltételezték. A *C. auris* növekedésére vonatkozó tesztek rámutattak, hogy az emberi szervezet maghőmérsékletén (37°C), és ennél magasabb hőmérsékleti tartományban (42°C) is képes osztódásra, illetve a *Candida* nemzetség olyan jelentős humánpatogén képviselőihez hasonló tenyésztési körülményeket igényel, mint a *C. albicans*, vagy a *C. glabrata*⁵. A hasonlóság ellenére azonban, a *C. auris* filogenetikailag a *C. haemulonii*

és a *C. pseudohaemulonii* fajokhoz áll közel, amelyek bár csak elvétve okoznak humán fertőzéseket, de általában kevésbé reagálnak jól az antifungális kezelésekre^{24–26} (1. ábra).



1. ábra
A *C. auris* elhelyezkedése a filogenetikai fán
 (Muñoz és munkatársai alapján²⁷)

3.3.1. A *C. auris* eredete

A *C. auris* eredetére vonatkozóan több elmélet is létezik, melyek jellemzően fontos környezetvédelmi kérdésekre világítanak rá. Néhány, patogén gombákkal foglalkozó kutató már évtizedekkel ezelőtt felhívta a figyelmet annak lehetőségére, hogy a globális felmelegedéshez köthető hőmérséklet emelkedés a fertőző betegségek epidemiológiájának változását okozhatja^{28–30}. Ennek oka, hogy az emberi szervezetben való fennmaradáshoz a patogénnek képesnek kell lennie túlélni a gazda testhőmérsékletén. Ez a feltétel a fertőzés kiváltására alkalmas fajok listáját a múltban körülbelül 150-re szűkítette le^{28,30}. A növekvő környezeti hőmérséklet azonban szelekciós nyomásként hat a mikrobákra. Arra, hogy az adaptáció milyen módon mehet végbe, két elmélet létezik: a változás vagy magasabb tartományba tolja a patogének növekedési hőmérsékletoptimumát, vagy a hőmérséklettől független módon, általánosan gyorsítja fel a sejtek osztódásának sebességét. Kísérletes eredmények alapján fajonként eltérő módon mindkét feltételezett stratégia lehetséges attól függően, hogy melyik jár kisebb kompromisszummal a gombasejtek életképességére nézve³¹. Ez a mechanizmus lehetővé teszi, hogy új fajok váljanak képessé az emlős gazdaszervezet kolonizációjára, ami a humánpatogén mikroorganizmusok számának emelkedését eredményezi.

A *C. auris*-hoz köthető fertőzések vizsgálatának korai szakaszában már egyértelművé vált, hogy a patogén eredményesebben képes az emlős bőr kolonizálására, mint a *C. albicans*^{32,33}. Ezt a klinikai megfigyelést később ex vivo bőr modell használatával is alátámasztották. Az, hogy a *C. auris* verejtek és

faggyú jelenlétében növekedett kolonizációs képességet mutat, arra utalhat, hogy nagy valószínűséggel eredetileg sós, tengervíz közeli környezetből származhat³⁴. Ezt a hipotézist egészíti ki Casadevall és munkatársai felvetése. Szerintük a globális felmelegedéshez köthető hőmérséklet emelkedés szelekciós nyomást gyakorolt a *C. auris* környezeti izolátumaira, képessé téve azokat vízi madarak fertőzésére. A fertőzött madarak ezt követően rezervoárként viselkedve terjesztették el a patogént³⁰. Környezeti izolátumok hiányában azonban ezen elmélet bizonyítására sokáig nem volt lehetőség. Az első környezeti izolátumokat 2020-ban Indiában, a Bengál-öböl környékéről vett mintákból azonosították. A *C. auris* törzsek közül 24-ből 23 minta esetében flukonazol és amfotericin B rezisztenciát mutattak ki, ami arra utal, hogy ezek korábban már átestek antimikotikum szelekción³⁵. Erre magyarázatot adhat egy szintén Indiában készített kutatás, ami felhívja a figyelmet arra, hogy a gyógyszergyárak közvetlen környezetéből vett víz, illetve szennyvíz mintákban az antifungális szerek mennyisége akár 20-szorosa is lehet az emberi szervezetben elért antimikotikum koncentrációs értékeknek. Ezeknek a szereknek a tartós jelenléte a környezetben folyamatos szelekciós nyomást helyez a mikroorganizmusokra, ami rezisztencia kialakulásához vezethet³⁶. Szintén Indiában, 2022-ben újabb környezeti *C. auris* izolátumokat azonosítottak, kereskedelmi forgalomba szánt almák felszínéről. A jellemzett 16 törzs mind az egészségügyben, mind a mezőgazdaságban alkalmazott gomba ellenes szerekkel szemben rezisztenciát mutatott³⁷. *C. parapsilosis* esetében korábbi kutatások már kimutatták, hogy a mezőgazdaságban használt azolok (tebukonazol, tetrakonazol) által kifejtett szelekciós nyomás hatására a klinikailag releváns azol típusú szerek (flukonazol, vorikonazol) minimális gátló koncentráció (MIC) értékei is megnőnek, így nem kizárt, hogy a *C. auris* izolátumok azolokkal szembeni csökkent érzékenysége egyes esetekben erre az indirekt hatásra vezethető vissza^{38,39}. A gyümölcsök felszínének érintettsége egy további érdekes összefüggésre mutatott rá. A klinikumban izolált *C. auris* törzsek egy része a hallójáratból vett mintából származott, ami arra enged következtetni, hogy a mikroba kedveli ezt a környezetet^{40,41}. A fülváladék és a gyümölcsök felszínén található viasz számos zsírsav komponense (linolsav, olajsav, palmitinsav, sztearinsav) megegyezik, ami alapján az sem zárható ki, hogy a *C. auris* eredetileg a növényi mikrobiotából kiindulva több lépésben vált képessé az emlős szervezet kolonizálására³⁷.

A *C. auris* azonosítását követően gyorsan egyértelművé vált, hogy a klinikai gyakorlatban rutinszerűen használt kémiai módszerekkel (CHROMagar, VITEK 2) szinte elkülöníthetetlen a *Candida* nemzetség többi tagjától^{42,43}. Az általa okozott fertőzések pontos diagnosztizálásához így MALDI-TOF alapú analízis vagy genom szekvencia elemzés szükséges^{42,44–46}. Ennek ismeretében izolátum gyűjtemények retrospektív vizsgálata során az első ismert *C. auris* izolátumot egy Dél-Koreából származó, 1996-ban levett mintából azonosították⁴⁷. Emellett további két 2009 előttről származó izolátumot is leírtak, melyek közül a korábbi egy Japánban (1997) míg a későbbi egy Pakisztánban

(2008) gyűjtött mintából származott. Ezen minták korábban hibásan *C. haemulonii*-ként kerültek besorolásra^{48,49}. Az 1996-nál korábbra tehető izolátumok hiánya további bizonyítékként szolgál arra a hipotézisre, hogy a *C. auris* elterjedését valamilyen közelmúltban megjelenő környezeti nyomás (hőmérséklet, mezőgazdasági antimikotikum használat) tette lehetővé⁹.

3.3.2. A *C. auris* morfológiai sajátosságai

A *C. auris* komplex táptalajon fehéres színű, sima felületű kolóniákat képez. A gombasejtek alakja enyhén ovális, méretük 2,0-3,0 x 2,5-5 µm közé tehető. Nem jellemző rá a fonalas növekedés⁵, azonban bizonyos tenyésztési körülmények (pl: magas sótartalom) pszeudohifa szerű morfológiai változást indukálhatnak. A citokinézis sikertelensége miatt a gombasejtek ebben az esetben megnyúlt morfológiát mutatnak⁵⁰⁻⁵². A *C. auris* morfológiai plaszticitása *in vivo* körülmények között is bizonyított. Egy korábbi kutatás eredménye alapján BALB/c egerek májából és veséjéből visszaizolált gombasejtek fonalas morfológiát vehetnek fel. A hifa forma további tenyésztése 37°C-on az élesztő sejtek ismételt megjelenéséhez vezet. Azonban alacsony inkubációs hőmérséklet (25°C) mellett, a sejtek az átlagos élesztő sejtekkel ellentétben megőrizték képességüket a fonalas növekedésre. Ez feltételezi, hogy a *C. albicans*-hoz hasonlóan *C. auris* esetében is előfordulhat környezet által indukált morfológia váltás, melynek funkciója ez idáig ismeretlen⁵³.

3.3.3. A *C. auris* izolátumok osztályozása

Mindössze néhány évvel az első izolátum azonosítását követően a *C. auris* fertőzések négy élesen elkülönülő geográfiai régióban, nagyjából egy időben kezdtek teret hódítani. Az egyes csoportokra a szakirodalom kládokként hivatkozik és nevüket is földrajzi származási helyükről kapták. Kezdetben négy kládot azonosítottak: klád I (Dél-Ázsia), klád II (Kelet-Ázsia), klád III (Dél-Afrika), klád IV (Dél-Amerika)^{6,7}. Egy 2019-ben Iránban azonosított izolátum az egyik ismert csoporttal sem mutatott filogenetikai hasonlóságot, így az egy ötödik kládba került besorolásra (klád V)^{8,54}. Míg az egyes kládokba sorolható izolátumok jellemzően alacsony genetikai változatosságot mutattak (<70 SNP) (egyedi nukleotid polimorfizmus), addig a kládok közötti filogenetikai eltérés több százezer SNP is lehet^{6,7,27}. Szekvencia adatok analízise alapján megbecsülhető az egyes *C. auris* kládok szétválásának lehetséges időpontja. Ez alapján a klád II a legősibb csoport, 339 évvel ezelőtt vált el a közös őstől, míg a legfiatalabb klád IV esetében ez az időpont 34 évvel későbbre tehető. A genetikai diverzitás szintén ezen két kládba sorolható izolátumok esetében a legnagyobb, ami alátámasztja a közös őstől való elválás távoli időpontját^{7,27}. A klád V későbbi vizsgálata azonban arra utalt, hogy ezen csoport válhatott el legkorábban a törzsfán^{8,55}. Erre utal az is, hogy az ezidáig azonosított klád V-be sorolható izolátumok mindegyike a klád II izolátumaihoz hasonlóan fülvadászokból került azonosításra⁸.

Egy 19 *C. auris* izolátum bevonásával készült virulencia vizsgálat eredményei arra is rámutattak, hogy az egyes *C. auris* kládok között szignifikáns virulencia különbségek vannak. Ez alapján a dél-amerikai (klád IV) és dél-ázsiai (klád I) kládból származó izolátumok bizonyultak a leginkább virulensnek (96% és 80% mortalitási arány), míg a dél-afrikai (klád III) és kelet-ázsiai (klád II) kládok izolátumai esetében a mortalitás körülbelül 45% volt⁵⁶. Ezen megfigyelések felhívják a figyelmet arra, hogy *C. auris* esetében kiemelt jelentőséggel bír a virulencia folyamatok jellegzetességeinek kládszintű feltérképezése.

A *C. auris* nagyfokú genetikai változatossága egyes hipotézisek szerint ivaros szaporodás eredménye is lehet. Bár erre kísérletes megerősítés napjainkban még nem létezik, számos izolátum szekvencia adatainak összevetése arra utal, hogy a törzsek genomjában funkcionális formában találhatóak meg az ivaros szaporodáshoz szükséges esszenciális gén csoportok^{27,57}. Ezen vizsgálatok alapján a klád I és klád IV izolátumai az „a” párosodási lókuszt (MTLa), míg a klád II és klád III izolátumai az „ α ” párosodási lókuszt (MTL α) hordozzák. Az egyes párosodási típusokhoz köthető kládok közötti éles geográfiai határvonal feltehetőleg a múltban akadályt képzett az ivaros szaporodás eredményeként létrejött törzsek megjelenésének, azonban a *C. auris* globális elterjedése lehetőséget biztosít ezen genetikai variánsok kialakulásának is^{27,58}.

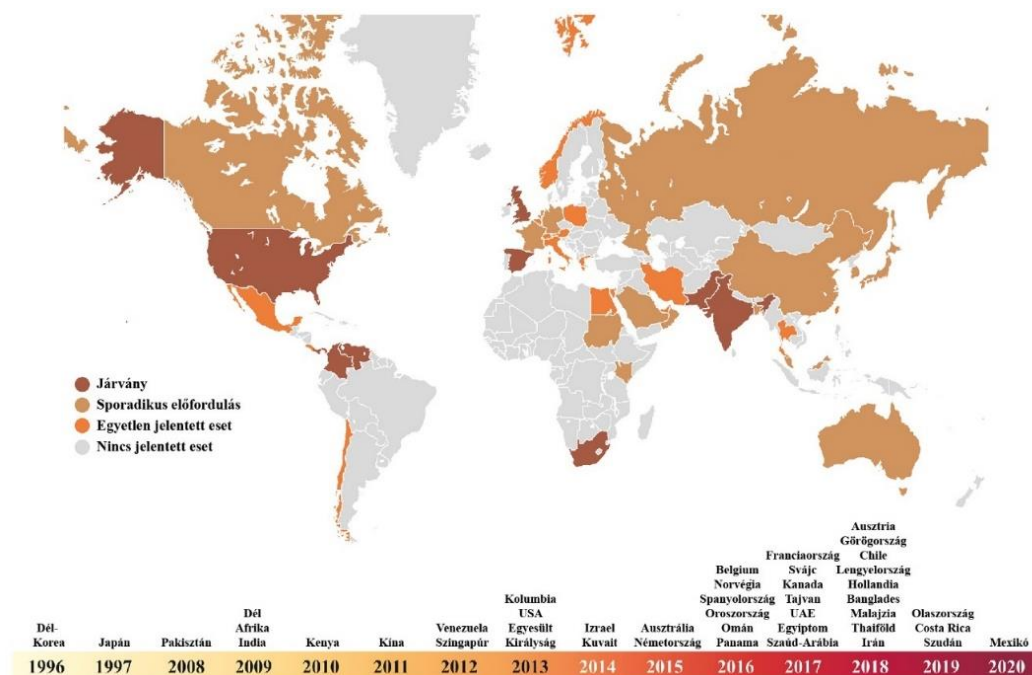
3.3.4. A *Candida auris* szerepe a klinikumban

A *C. auris* által okozott fertőzések jelentős hányada kórházi környezetben terjed, a sporadikus fertőzések aránya alacsonynak mondható^{59–62}. Napjainkban a *C. auris* Dél-Afrika és India egyes területein olyan gyakran okoz kórházi fertőzéseket, hogy endemikusnak tekinthető. Epidemiológiai vizsgálatok arra utalnak, hogy ezekben az országokban a nozokomiális *Candida* fertőzések 15%-a (Dél-Afrika), illetve 5-30%-a (India) *C. auris* eredetű^{63,64}.

A kórházi fertőzések magas aránya feltehetőleg visszavezethető arra, hogy a *C. auris* eredményesen képes mind a bőr, mind a környezet kolonizációjára. Így, főként a tüneteket nem mutató páciensek, vektorként viselkedve könnyen elterjeszthetik a klinikai környezetben. Korábban több tanulmány is rámutatott, hogy az egyes egészségügyi intézményekben a fertőzött betegek közvetlen környezetében található szöveteken, bútorokon és használati tárgyakon a *C. auris* sejtek hosszú ideig, akár 14 napig is életképesek maradnak^{65–69}. Ezek a felületek, mint fertőzésforrások újabb betegpopulációt veszélyeztetnek. Ez különösen nagy kockázatot jelent olyan kórházi osztályokon, ahol a betegek nagy része rendelkezik valamilyen alapbetegséggel. Ilyen kockázatot növelő betegségek tekinthető a *diabetes mellitus*, szepszis, légzőszervi megbetegedések, vese- és májbetegségek, transzplantáció, immunszuppresszióval járó megbetegedések, valamint terápiás eljárások, illetve tartós egészségügyi eszközök (katéter) használata^{21,70,71}. Míg más klinikailag kiemelt *Candida* fajok esetén a neutropénia az

egyik legjelentősebb kockázati tényező, a *C. auris* fertőzés kialakulásának esélyét ez a kórkép nem emeli^{72,73}.

Legfrissebb adatok szerint a *C. auris* a világ már több mint 40 országában okozott megbetegedéseket⁴² (2. ábra). Az első európai *C. auris*-ra visszavezethető eseteket az Egyesült Királyság területén (London és Oxford) írták le, ahol 2013 és 2017 között 61 fertőzőeset regisztráltak^{52,74}. Az első kórházi járvány szintén egy Londonban található kórházhoz köthető. Ennek során a patogén 16 hónap leforgása alatt 50 páciens megbetegítéséért volt felelős⁶⁵. Valenciában a *C. auris* szintén járványszerűen volt képes elterjedni: néhány sporadikus esetet követően 2016 júniusa és 2017 januárja között már 140 kolonizációs eseményt jegyeztek fel^{75,76}. Spanyolországban 2021-ig bezárólag 1377 *C. auris*-hoz köthető fertőzést regisztráltak, amihez nagyban hozzájárult, hogy a COVID-19 világjárvány eredményeként egy fokozott kockázati csoportba tartozó betegcsoport jelent meg az egészségügyi intézményekben⁷⁷. Hasonló jelenség volt megfigyelhető Olaszországban is, ahol a pandémiával egy időben 2020 és 2021 között 288 esetben írtak le *C. auris* fertőzést⁴⁵. A patogén gyors terjedése, illetve a rezisztens izolátumok nagy arányú megjelenése tette szükségessé, hogy először 2011-ben a Betegségmegelőzési és Járványügyi Központ (CDC), majd 2016-ban az ennek európai testvérszervezete az ECDC is kiemelt fenyegetésként kategorizálta a *C. auris*-t⁴⁴. Emellett az Egészségügyi Világszervezet (WHO) 2022-ben kiadott riportja szintén a kritikus figyelmet igénylő patogén gombák közé sorolta a *C. auris*-t⁷⁸.

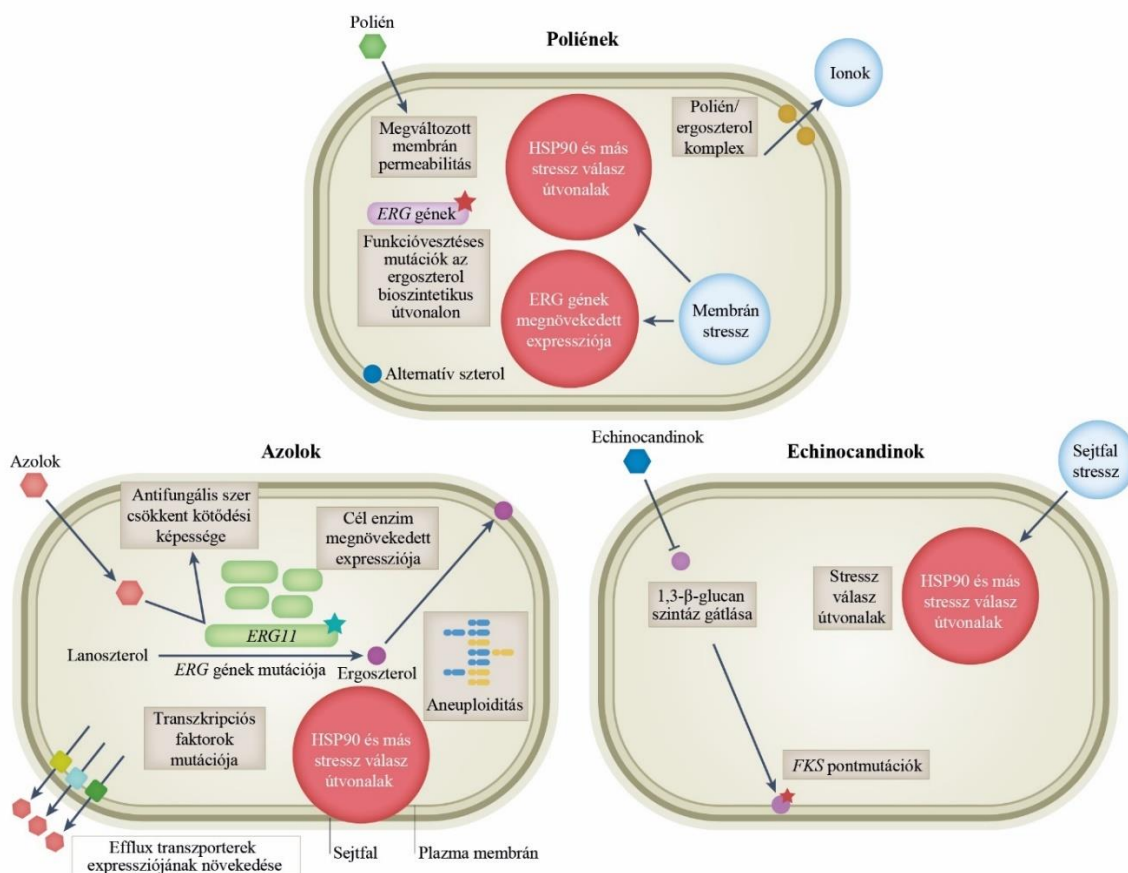


2. ábra
A *C. auris* globális elterjedése
 (Chakrabarti és munkatársai alapján)⁹

A tüneteket is mutató *C. auris* fertőzések klinikai megjelenése változatos lehet. A többi *Candida* fajhoz hasonlóan kialakíthat enyhe tünetekkel járó bőrfertőzéseket, azonban a véráramba jutva (*candidaemia*) számos szervrendszer károsodását is okozhatja^{42,71}. Bár az egyes tanulmányok között jelentős eltérések lehetnek, az azonban elmondható, hogy az invazív *C. auris* fertőzések magas arányban (30-60%) halálos kimenetelűek, melyhez a korábbiakban említett jellegzetességei mellett nagymértékben hozzájárul az antifungális szerekkel szemben rezisztens izolátumok magas aránya^{45,64,66,67,79,80}.

3.4. Szisztémás *Candida* fertőzések ellen alkalmazott antifungális szerek, ezek hatásmechanizmusa, illetve a velük szemben kialakuló rezisztencia

Napjainkban az invazív *Candida* fertőzések kezelésére mindössze három antifungális szer csoport áll rendelkezésünkre (3. ábra). Ezen szerek közül kettő (poliének, azolok) a gombák membránjában található ergoszterolhoz kötődve, vagy annak bioszintézisét gátolva fejt ki antifungális hatását, míg az echinocandinok a sejtfal esszenciális komponensének, a β -glükánnak szintézisét gátolják. A rendelkezésre álló szerek limitált száma, illetve hatásmechanizmusuk hasonlósága megnöveli a rezisztens törzsek elterjedésének esélyét⁸¹.



3. ábra

Az egyes antifungális szer csoportok hatásmechanizmusa, illetve az ellenük kialakult rezisztencia (Fisher és munkatársai alapján)⁸¹

A klinikailag releváns *Candida* fajok közül a *C. auris* esetében különösen nagy kihívást jelent a megfelelő terápia kiválasztása. Ennek oka, hogy ez a gombafaj gyakran nem reagál a *candidaemia* során alkalmazott gomba ellenes szerekkel való kezelésre^{196–199}. Hivatalos rezisztencia határértékek hiányában a *C. auris* izolátumok antifungális érzékenységének vizsgálta esetén a rezisztencia határa közmegegyezően alapuló MIC értékek mellett került korábban megállapításra⁶¹. Egy 742 *C. auris* izolátum bevonásával készült meta-analízis alapján a flukonazol rezisztencia a vizsgált törzsek 44,29%-ára volt jellemző. Ezt az amfotericin B (15,46%), illetve a vorikonazol (12,67%) rezisztencia követte. Az adatok alapján azolok közül a posakonazol a legalkalmasabb *C. auris* fertőzések kezelésére, ugyanis a rezisztens izolátumok aránya mindössze 1,39%. Echinocandinok közül a caspofunginnal szemben a vizsgált törzsek 3,48%-a volt rezisztens, míg mikafungin esetében ez az arány 1,25%⁷⁰. Később több tanulmány is rámutatott azonban a rezisztens izolátumok arányának növekedésére. Mintegy 700 *C. auris* törzs bevonásával New York-ban készült tanulmány szerint 2016 és 2020 között vett mintákban a flukonazol rezisztens törzsek aránya elérte a 100%-ot, míg az alternatívaként használható posakonazzal szemben rezisztens izolátumok aránya átlagosan ~30% volt. Az echinocandinokkal szemben rezisztens törzsek számát folyamatos növekedés jellemezte, így a vizsgált időszak végére elérte a 4%-ot (18/488)⁸². Egy 2020-ban készített meta-analízis 4733 *C. auris*-hoz köthető eset vizsgálatát foglalta magába. Ezen elemzés szerint a vizsgált izolátumok 91%-a mutatott rezisztenciát flukonazolra, míg ez az arány caspofunginra nézve 12% volt. Ezen adatok arra utalnak, hogy a *C. auris* toleranciája az idő előrehaladtával vagy minden alkalmazható antifungális szerrel szemben tartósan magas szinten stagnál, vagy jelentősen növekszik.

3.4.1 Poliének

Az egészségügyben elsőként bevezetett gomba specifikus antibiotikumok a poliének csoportjába tartoztak. Felfedezésük Elizabeth L. Hazen és Rachel F. Brown nevéhez köthető, akik 1949-ben izolálták az első antimikotikumot, a nisztatint, amely kedvezőtlen felszívódási képessége miatt napjainkban kizárólag testfelszíni gombafertőzések kezelésére használatos⁸³. A nisztatin mellett egy másik polién típusú szer, az amfotericin B is kedvező gomba ellenes aktivitást mutatott⁸⁴. Strukturálisan a molekula egy hidrofób egységből, illetve egy hidrofíl „fej” részből áll, amihez egy mikozamin csoport és egy poliol lánc kapcsolódik⁸⁵. Amfipatikus tulajdonságai miatt vízben rosszul oldódik, ami lecsökkenti klinikai felhasználásának lehetőségeit⁸⁴. Az amfotericin B hatását a sejtmembrán ergoszterol molekuláihoz kötődve fejti ki. Korai feltételezések szerint jelenléte membráncsatornak létrejöttét eredményezi, ami a citoplazma szivárgáshoz, és hosszú távon a gombasejt halálához vezet⁸⁶. További strukturális és biofizikai vizsgálatok arra engednek következtetni, hogy az amfotericin B az ergoszterolhoz kötődve mintegy kivonja a szterol származékot a membránból, ami így a sejt felszínén „szivacs” szerű

aggregátumként áll össze⁸⁷. Emellett a polién típusú antifungális szerek a gombasejtekben oxidatív stresszt is indukálnak, ami a DNS károsodását és lipid peroxidációt okoz⁸⁸.

Mivel a gombasejtekben található ergoszterol és az emlős sejtek membránjára jellemző koleszterol strukturálisan hasonló, így az amfotericin B bár kisebb affinitással, de a gazdasejteken is képes kifejteni toxikus hatását⁸⁹. Ez főként a májat és a veséket érinti és gyakran nem teszi lehetővé a megfelelő mennyiségű gomba ellenes szer szervezetbe történő bejuttatását⁹⁰⁻⁹². A károsító hatás csökkentése érdekében az amfotericin B liposzómákba csomagolva alkalmazható, azonban az ilyen típusú szerek farmakológiai tulajdonságai nehezen meghatározhatóak⁸⁹.

Az ismert toxicitás ellenére továbbra is az amfotericin B az egyik legszélesebb körben alkalmazott gombaellenes szer az egészségügyben⁹³. Ebben az is szerepet játszik, hogy a többi antifungális szerrel szemben, a *Candida* fajok esetében ritkábban alakul ki ellene rezisztencia⁹⁴.

3.4.1.1. Amfotericin B rezisztencia

Általánosságban elmondható, hogy az amfotericin B-vel szemben azért alakul ki ritkán rezisztencia, mert a folyamat indirekt módon a gombasejtek jelentős fitness csökkenését okozza^{94,95}. Amennyiben mégis megjelenik rezisztencia, azt legtöbb esetben az ergoszterol bioszintézisben szerepet játszó gének (*ERG* gének) mutációja okozza^{96,97}. Ezen módosulások hatására általában csökken egyes kulcsenzimek aktivitása, ami a membránban található ergoszterol mennyiségének csökkenéséhez és különböző közttermékek felhalmozódásához vezet (3. ábra). Az ergoszterol tartalom mérséklődésének hatására a poliének nem tudnak hozzákapcsolódni célmolekulájukhoz és kifejteni antifungális hatásukat. *C. albicans* esetében mind az *ERG11* (lanoszterol 14 α -demetiláz) és *ERG3* (C-5 szterol deszaturáz), illetve az *ERG11* és *ERG5* (C-22 szterol deszaturáz), továbbá az *ERG6* (δ -(24)-szterol C-metiltranszferáz) és *ERG2* (C-8 szterol izomeráz) kombinált funkcióvesztéses mutációja is bizonyítottan hozzájárul az amfotericin B kezeléssel szembeni csökkent érzékenységhez^{97,98}. Rezisztens *C. glabrata* törzsek vizsgálata során szintén az *ERG2*, *ERG6* és *ERG11* génekben megfigyelhető pontmutációk hozhatóak leggyakrabban összefüggésbe a rezisztens fenotípussal^{99,100}.

Az ergoszterol bioszintézis enzimeiben megfigyelt mutációk mellett, egyes sejtes folyamatok megváltozása is vezethet amfotericin B rezisztenciához. Ezen alternatív folyamatok közül az egyik legjellegzetesebb a Hsp90 (heat shock protein 90) molekuláris chaperon fehérjéhez köthető^{101,102}. A Hsp90 működésének kiesése, fehérjeháztartásban betöltött szerepe miatt, mind rejtett genetikai variációk kifejeződését, mind bizonyos jellegzetességek eltűnését okozhatja¹⁰¹. A Hsp90 szerepét kísérletesen alátámasztja, hogy amfotericin B rezisztens *C. albicans* és *C. tropicalis* sejtekben a chaperon gátlása a rezisztencia megszűnésével jár⁹⁴.

Érdekes megfigyelés, hogy bár a poliének a gombasejtek plazmamembránján fejtik ki hatásukat, egyes esetekben a sejtfal megváltozott szerkezete is amfotericin B rezisztenciát idézhet elő. A jelenséget

C. tropicalis amfotericin B rezisztens izolátumok vizsgálata során ismerték fel. Ezen törzsek sejtfalában az 1,3- β -glükán mennyisége jelentősen megnövekedett, ami feltehetőleg fizikai gátat szabott az antimikotikum számára, hogy hozzáférjen a membránba ágyazott ergoszterolhoz^{103,104}.

3.4.1.2. Az amfotericin B rezisztencia *C. auris* esetén

Rybak és munkatársai azonos páciensből, négy egymást követő időpontokban vett mintából izolált *C. auris* törzs genom szekvencia adatait vizsgálták. A törzsekben az antifungális terápia hatására az amfotericin B mellett flukonazol rezisztencia is megfigyelhető volt, illetve az utolsó vizsgált időpontban caspofunginnal szemben is keresztrezisztencia alakult ki. A szekvencia analízis alapján a mintavételi időszak során az *ERG11* és *TAC1*, valamint *FKS1* génekben is pontmutációk alakultak ki. A megnövekedett amfotericin B MIC értékek feltehető oka, az *ERG6* génben detektált inszerció volt, ami a leolvasási keret eltolódásához és az ergoszterol teljes hiányához vezetett¹⁰⁵. Mikroevolúciós kísérletek emellett arra utalnak, hogy az *ERG3* (W182*) és *ERG11* (E429*) kombinált nonszensz mutációja a többi *Candida* fajhoz hasonlóan amfotericin B rezisztenciát idéző elő *C. auris* esetében is¹⁰⁶.

Szakirodalmi adatok alapján feltételezhető, hogy az amfotericin B rezisztencia kialakulása jelentősen csökkenti a *Candida* fajok általános stressztűrő képességét. Azonban abban az esetben, ha a rezisztenciát kiváltó genotípus változás mellé olyan stressz tolerancia útvonalakban bekövetkező módosítások is társulnak melyek képesek a negatív hatások kompenzálására, az stabilizálhatja a sejtet és fenntarthatja a rezisztens fenotípust⁹⁴. Ez alapján a *C. auris* esetében megfigyelt magasabb frekvenciával előforduló amfotericin B rezisztencia feltehetően a stresszválaszhoz köthető szignalizációs útvonalak fokozott működésére vezethető vissza¹⁰¹.

3.4.2. Azolok

A poliének bevezetését követően már az 1960-as években intenzív kutatások zajlottak új gomba ellenes szer típusok azonosítására¹⁰⁷. Ekkor kerültek forgalomba az azol típusú antimikotikumok, amik a poliénnel összehasonlítva kedvezőbb biztonsági jellemzőkkel, illetve szélesebb körű gomba specificitással rendelkeztek^{93,107,108}. Az azolok öt tagú gyűrűből álló aromás heterociklusos vegyületek⁹³. Míg korai képviselőik hatásmechanizmusa szerteágazó volt¹⁰⁹, az újabb típusú azolok, a triazolok, hatása univerzális^{110,111}. A triazolok a célsejt lanoszterol 14- α demetiláz (*Erg11*) enzimének aktív centrumában található hem csoporthoz kötődnek és gátolják annak működését. Az interakció hatására a gomba plazmamembránjában található ergoszterol mennyisége lecsökken, illetve toxikus szterol köztitermékek dúsulnak fel. Ez csökkenti a sejt növekedési és osztódási képességét, valamint membrán stresszt indukál⁹³. Napjainkban a *Candida* fertőzések kezelésére öt triazol típusú antimikotikum van forgalomban: flukonazol, itrakonazol, posakonazol, vorikonazol, isavukonazol^{86,112}.

Az azol típusú gombaellenes szerek legnagyobb hátrányát az jelenti, hogy aktivitásuk fungisztatikus, vagyis nem pusztítják el aktívan a gombasejteket, csupán gátolják azok növekedését és

osztódását. Ez lehetőséget jelent a patogén számára, hogy kezelés esetén adaptálódjon és rezisztenciát alakítson ki az adott szerre^{93,113}. További problémát jelent az azolok klinikai alkalmazása során, hogy bizonyos invazív fertőzések kialakítására képes *Candida* fajok, mint a *Candida glabrata* vagy a *Candida krusei* eredendően csökkent érzékenységgel rendelkeznek velük szemben⁹³.

3.4.2.1. Flukonazol

A flukonazolt Richardson és munkatársai azonosították először, 1978-ban^{114,115}. Számos előnye mellett adagolását megkönnyíti, hogy nagy hatékonysággal (>80%) képes felszívódni a szervezetben anélkül, hogy a gyomor savas pH-ja gátolná aktivitását¹¹⁶. Rendkívül széles körű felhasználási lehetőséggel rendelkezik, a hashártyát és a központi idegrendszert érintő nehezen kezelhető fertőzések ellen is alkalmazható^{117,118}.

Kedvező farmakológiai tulajdonságai miatt a flukonazolt a klinikumban a gombafertőzések megelőzésére (profilaxis) is gyakran használják, amire többek közt szervátültetések és neutropéniával járó kórképek esetén van szükség¹¹⁶. Ez az egészségügyi gyakorlat azonban tovább növeli a rezisztens fajok térhódításának lehetőségét¹¹⁶.

3.4.2.2. Vorikonazol

A vorikonazol az 1900-as évek végén került forgalomba. Széles hatásspektruma miatt olyan *Candida* fajok ellen is alkalmazható, melyek flukonazol kezelésre kevésbé reagálnak¹¹⁰. További előnye, hogy antifungális aktivitása erős, vagyis kisebb mennyiségben alkalmazva is sikeres terápia érhető el vele^{110,119}. Használatának hátránya azonban, hogy a flukonazzal való strukturális hasonlósága miatt, *Candida* fajok esetében a két szer között gyakran figyelhető meg keresztrezisztencia¹²⁰.

3.4.2.3. Posakonazol

Amellett, hogy az azol típusú szerek forradalmasították az antifungális terápiát, az ellenük kialakuló rezisztencia számos problémát eredményez napjainkban is, ami folyamatos fejlesztést tesz szükségessé¹²¹. Ennek nyomán 2007-ben egy új triazol típusú szer, a posakonazol terápiás használata kapott engedélyt¹²². Ez strukturálisan eltér a korábban alkalmazott triazoloktól: hosszabb oldallánca szorosabban képes kötődni a lanoszterol-14- α -demetiláz enzimhez^{123,124}. Emiatt, kisebb koncentrációban mellékhatások nélkül alkalmazható és olyan fajok ellen is használható, melyek nem reagálnak a többi triazzal folytatott terápiára¹²⁵. Profilaxisra való használata is ajánlott, még olyan alaptergések mellett is, mint a HIV fertőzöttség, hematopoetikus sejt transzplantáció, illetve a rosszindulatú daganatok^{125,126}. Számos előnye, illetve az echinocandin típusú szerekhez viszonyított kedvező ára ellenére alkalmazása csak olyan esetekben elterjedt, ahol a gombafertőzés nem reagál a flukonazzal vagy vorikonazzal történő kezelésre¹²⁶. Mivel a többi azol típusú szerrel egyetemben a posakonazol is csak gátolja a gomba sejtek növekedését, így bár kisebb gyakorisággal, de ellene is jellemző a rezisztencia kialakulása¹²².

3.4.2.4. Triazol rezisztencia

Candida fajok esetében az egyik legjelentősebb rezisztenciát kiváltó folyamat az azolok célenzimének, a lanoszterol-14- α -demetiláznak (Erg11) szerkezeti változása (3. ábra)^{127–129}. Az enzimet kódoló génben, az *ERG11*-ben, 140 eltérő aminosav szubsztitúciót találtak, melyek feltehetőleg összefüggésbe hozhatók az azol rezisztencia kialakulásával¹³⁰. A számos beazonosított mutáció közül azonban kevés járul hozzá kísérletesen igazoltan is ehhez a folyamathoz^{131,132}. A génvariációk vizsgálata alapján a rezisztenciát előidéző aminosav cserék jelentős hányada három mutációs forrópontra térképezhető¹³³. A két leggyakrabban azonosított aminosav változás (R467K, G464S) egyaránt az enzim hem kötő alegységét kódoló szekvencia szakaszát érinti^{130,134}.

Szintén azol rezisztenciát eredményezhetnek, az Δ -5,6-deszaturáz enzimet kódoló génben (*ERG3*) bekövetkező pontmutációk is. Az enzim funkcióvesztése kétféleképp járul hozzá a gombasejtek túléléséhez. Egyrészt a gombasejtek membránjában az ergoszterol mennyisége lecsökken, másrészt az azol kezelés hatására aktiválódó alternatív szintetikus útvonalon, az Erg3 által katalizált reakció nélkül nem jön létre a toxikus intermedier, a 14-metilergoszta-dién-diol^{127–129}. Az így felhalmozódó intermedier a 14- α -metilfekoszterol pedig a membránba beépülve képes ellátni az ergoszterol szerepét és biztosítja a sejt túlélését és növekedését¹¹¹. *C. albicans* esetén az *ERG3* enzimben hét eddig azonosított pontmutáció okoz bizonyítottan azol rezisztenciát: A168V, S192P, G261E, T329S, A353T, Y325* és Y190*^{135,136}.

A szterol bioszintézishez köthető enzimek szerkezeti változásai mellett, azol rezisztenciát okozhat az őket szabályozó transzkripciós faktorok megváltozott aktivitása is^{113,137–139}. Az Upc2 mint transzkripciós aktivátor számos *ERG* gén, többek között az *ERG11* expressziójának szabályozását végzi. Az *UPC2*-ben bekövetkező funkcionyeréses mutációk a transzkripciós faktor konstitutív expresszióját okozzák, mely fokozott ergoszterol szintézishez és a flukonazol érzékenység csökkenéséhez vezet^{140,141}. Az *UPC2* azol rezisztenciában betöltött szerepe mind *C. albicans*-ban, mind pedig *C. glabrata*-ban is kísérletesen bizonyított. A gén eltávolítása mindkét fajból származó rezisztens izolátumokból, a membrán ergoszterol tartalom csökkenését és a gombasejt szterol bioszintézis gátlókkal szembeni érzékenységét okozza^{142,143}.

Az azolokkal szembeni rezisztencia kialakulásának másik jelentős mechanizmusa a citoplazma detoxikáló folyamataihoz köthető és efflux pumpák megemelkedett expresszióján keresztül valósul meg. *Candida* fajok esetében az efflux pumpák két típusa vesz részt bizonyítottan az antifungális szerek gombasejtből való eltávolításában. Az első típusba az ABC (ATP-binding cassette) típusú transzporter proteinek, a másodikba az MFS (major facilitator superfamily) típusú transzporterek tartoznak.

Az ABC típusú efflux pumpák két transzmembrán doménnel és két citoplazma felé lokalizálódó nukleotid kötő doménnel rendelkeznek. Ezek a transzporterek az ATP hidrolízisen keresztül nyert energia felhasználásával képesek a xenobiotikumok citoplazmából való eltávolítására^{127,129,137,144}. A *C.*

albicans genomjában 28 ABC típusú transzporter található. Ezek közül feltehetően kettő, a Cdr1 (*Candida* drug resistance 1) és Cdr2 vesz részt a rezisztens fenotípus kialakításában¹⁴⁵. A *CDR1* deléciója 4-8 nagyságrenddel növeli az azol érzékenységet, míg a *CDR2* hiánya kevésbé meghatározó¹⁴⁶. *C. glabrata*-ban egy további transzporter, az Snq2 szintén képes az azol típusú szerek szállítására¹⁴⁴. Ezen transzporter heterológ expressziója triazol érzékeny *S. cerevisiae* mutáns törzsekben is képes a rezisztens fenotípus helyreállítására, ami arra utal, hogy a *C. glabrata* mellett más *Candida* fajokban is szerepe lehet a citoplazma detoxifikálásában. Az ABC típusú efflux pumpák aktivitását a Tac1 (transcriptional activator of CDR) transzkripciós faktor szabályozza *C. albicans*-ban és *C. parapsilosis*-ban¹⁴⁷. A protein a *CDR1* és *CDR2* gének promoterének DRE (drug-response elements) régiójához kötődve iniciálja a transzporterek kifejeződését. A regulátort kódoló génben, a *TAC1*-ben bekövetkező funkcionyeréses mutációk a transzporterek konstitutív kifejeződését okozzák, ami felgyorsítja a detoxifikációt^{147,148}. *C. glabrata* esetében a Pdr1 (Pleiotropic Drug Resistance 1) transzkripciós aktivátor a Tac1-hez hasonló elven vesz részt a rezisztencia kialakításában¹⁴⁹.

Az MFS típusú transzporterek számos (12-14) transzmembrán doménnel rendelkeznek. Esetükben a transzport folyamatokhoz szükséges energiát a plazmamembrán két oldala között kialakuló protongrádiens különbség adja¹⁴⁴. *In silico* vizsgálatok alapján a *C. albicans* genomja 95 MFS típusú transzportert kódol. Ebben a fajban ezek közül mindössze egy, az Mdr1 megnövekedett expressziója vesz részt bizonyítottan az azol rezisztencia kialakításában¹⁵⁰. A transzportert kódoló gén (*MDR1*) heterológ expressziója *S. cerevisiae*-ben is képes a flukonazol rezisztencia előidézésére¹⁵¹. Az MSF transzporterek kifejeződésének szabályozását az Mrr1 (Multidrug Resistance Regulator 1) transzkripciós faktorok végzik. Hasonlóan a *TAC1*-hez, az *MRR1* funkcionyeréses mutációja is fokozza az azol rezisztenciát¹⁵². Érdekes módon az *MRR1* deléciója nagyobb mértékben csökkenti a kialakult flukonazol rezisztenciát, mint magának a transzportert kódoló génnek (*MDR1*) a deléciója. Ez arra utal, hogy az Mrr1 nem csupán az *MDR1*, hanem más azol rezisztenciát kialakító ismeretlen faktorok szabályozását is végzi¹⁵³.

A pontmutációk mellett genomi átrendeződések is összefüggésbe hozhatók az azol rezisztencia kialakulásával. Ilyen folyamatok az aneuploidia kialakulása, heterozigotizás elvesztése, illetve a kromoszóma átrendeződés. *C. albicans* sejtek azolokkal történő kezelése abnormális sejtciklus szabályzást eredményezhet, ami a citokinézist követően aneuploidiahoz vezet¹⁵⁴. *Candida* fajokban főként az 5-ös kromoszóma bal karjának aneuploidiaja okoz azol rezisztenciát. A rezisztencia kialakulása során létrejövő izokromoszóma a bal kar duplikációjával jön létre (i(5L)), így a rajta található géneket megkettőzött kópia számban tartalmazza. Ezen gének között megtalálható az *ERG11* és a *TAC1* is, melyek megnövekedett expressziója a fentebb leírtaknak megfelelően képes a rezisztencia előidézésére¹⁵⁵. A rezisztencia kialakulása nyomon követhető *in vivo* antimikotikumokkal kezelt

páciensekből származó mintavételezéssel. Ezen kísérletek alapján tudjuk, hogy a bekövetkező szekvenciaváltozások elsőként heterozigóta formában jelentkeznek, majd a heterozigotitás elvesztésével alakul ki a homozigóta állapot^{156,157}. A heterozigotitás elvesztése olyan szakaszokat is érinthet, melyek tartalmazzák a *TAC1*-et vagy az *MRR1*-et. A folyamat során a mutációt hordozó hiperaktív allél heterozigóta állapotból homozigóta állapotba kerül, ami az efflux pumpák fokozottabb kifejeződését okozza¹⁴⁸.

Az alternatív rezisztencia útvonalak között azolok esetében szintén kiemelt szerepet tölt be a Hsp90 hősokk protein, melynek gátlása növeli a gombasejtek antibiotikum érzékenységét^{158,159}. Az azolokkal szembeni rezisztenciában számos kináz, illetve kináz-asszociált szignalizációs útvonalak is részt vesznek. Ilyenek például a TOR kinázok (Target of Rapamycin), melyek a sejt metabolikus folyamatait a környezeti tápanyagellátáshoz hangolják. Bizonyított, hogy a TOR szignalizációs útvonal gátlása képes ellensúlyozni az Erg3 mediálta azol rezisztencia hatását¹⁶⁰. Ez alapján arra következtethetünk, hogy az azol rezisztencia számos jól jellemzett genetikai determinánsa mellett több komplex szignalizációs folyamat is aktívan részt vesz a fenotípus kialakításában.

Candida fajoknál emellett gyakori jelenség, hogy a biofilm képzés esetén a poliszacharid mátrixába ágyazódott gombasejtek ellenállnak az antimikotikum kezelésnek. A fizikai védelem mellett, a biofilm részét képző sejtekben számos azol rezisztenciában szerepet játszó transzporter proteint kódoló gén expressziója is megnövekedik, ami fokozott efflux aktivitásra utal^{161,162}.

3.4.2.5. A triazol rezisztencia *C. auris* esetén

Jelenlegi ismereteink alapján *C. auris* esetén a szterol bioszintézisben résztvevő enzimeket kódoló gének kópia szám változása, a bennük bekövetkező pontmutációk, valamint egyes efflux pumpák megváltozott expressziója vezethet triazol rezisztenciához.

Az *ERG11*-ben bekövetkező aminosav szubsztitúciók helye klád-specifikus. Az F126T a dél-afrikai, az Y132F a dél-amerikai míg az Y132F vagy K143R szubsztitúció kialakulása a dél-ázsiai kládhoz köthető⁶. Bár ezen mutációk *C. albicans*-ban bizonyítottan részt vesznek a triazol rezisztencia kialakításában, *C. auris* esetében a mutációt hordozó klinikai izolátumok egy része érzékeny marad flukonazol kezelésre^{163,164}. Az *ERG11* génben mesterségesen (CRISPR/Cas9) létrehozott szubsztitúciók (VF125AL, Y132F és K143R) *C. auris*-ban bár csökkentették a flukonazol érzékenységet (8-16 µg/ml), de nem okoztak teljes értékű rezisztenciát (a vizsgált törzsek nem érték el a rezisztencia határértékét). Ez arra utal, hogy a triazol rezisztencia kialakulása több tényezős folyamat eredménye¹⁶⁵. Érdekes megfigyelés továbbá, hogy az *ERG11* kópia számának aneuploidiára visszavezethető növekedése főként a klád III-ba sorolható rezisztens izolátumokra jellemző, ami klád specifikus mechanizmusok jelenlétére utal¹⁶⁶.

A flukonazol rezisztens *C. auris* törzsekben szintén gyakori az efflux pumpák fokozottabb kifejeződése. Ezen mechanizmus jelentőségére utal, hogy rezisztens izolátumok esetében, a *CDR1* deléciójának hatására a flukonazol MIC értékek akár 64 nagyságrenddel is csökkenhetnek¹⁶⁷. A *C. auris* genomja *in silico* elemzések szerint 68 olyan transzkripciós faktort kódol, melyek potenciálisan részt vehetnek az efflux pumpák expressziójának szabályozásában. Ezek között megtalálhatóak a *CaTAC1* és a *CaMMR1* ortológjai is. A *TAC1B* genomból történő eltávolítása flukonazzal, illetve vorikonazzal szemben is rezisztenciát idéz elő a klád III-ba és klád IV-be sorolható izolátumokban¹⁶⁸. *In vitro* mikroevolúciós kísérletek továbbá arra is rámutattak, hogy a *TAC1B*-t érintő aminosav szubsztitúciók (F214S és R495G) már közvetlenül a flukonazol kezelést követően detektálhatók és a *CDR1* megnövekedett expresszióját okozzák¹⁶⁴.

Feltételezhető, hogy az MFS transzportereknek, illetve az ezek szabályozását végző transzkripciós faktoroknak különleges szerepe van a klád III-ba sorolható *C. auris* izolátumokban, mivel ezek majdnem minden esetben mutációt hordoznak *MRR1* (N647T) génjükben. Az aminosav szubsztitúciót tartalmazó törzsek *MDR1* expressziója magasabb, mint a más kládba sorolható rezisztens izolátumoké¹⁶⁹. Ezzel szemben az *MDR1* deléciója sem a klád I sem a klád IV-be sorolt izolátumokban nem okozza a flukonazol tolerancia szignifikáns változását¹⁷⁰. Ez azt feltételezi, hogy az egyes kládok esetében a rezisztencia mechanizmusok nem univerzálisak és nagy fokú változatosságot mutathatnak.

C. auris esetében a biofilm képzéshez köthető rezisztencia mechanizmust 2018-ban Kean és munkatársai jellemezték részletesebben. Eredményeik szerint a biofilm képzés későbbi stádiumaiban olyan gének megnövekedett aktivitása figyelhető meg, melyek az Rdc3, Snq2, Cdr1, Yhd3 ABC- típusú, és az Mdr1 MFS-típus transzporter megnövekedett expressziójáért felelnek¹⁷¹.

3.4.3. Echinocandinok

Az echinocandinok nagyméretű, félszintetikus, ciklikus hexapeptid molekulák, melyek az UDP-glükóz J3-(1,3)-o-glükán-13(3)-o-glükoziltranszferáz (hétköznapi nevén: 1,3- β -D glükán szintáz) nem-kompetitív gátlói. A célenzim korlátozott működése az 1,3- β -D-glükán mennyiségének csökkenését okozza a gomba sejtfalában^{172,173}. Ez a rigiditás csökkentésén keresztül destabilizálja a sejtfal integritását, amely így érzékennyé válik az ozmotikus nyomásra¹⁷³. Mivel a folyamat a sejtek növekedését és osztódását nem csak gátolja, hanem aktívan elpusztítja őket, ezért az echinocandinokat fungicid szerként tartjuk számon¹⁷⁴. Emellett további előnyük, hogy a gombasejt olyan strukturális elemére – a sejtfalra- fejtik ki hatásukat, amelynek a humán sejtben nincs megfelelője, ami szelektív kezelést tesz lehetővé¹⁷⁵. Bár szisztémás *candidiasis* esetében több forrás is az echinocandinokat nevezi meg, mint az elsővonalbeli antimikotikumokat, azonban felhasználhatóságuk bizonyos helyzetekben korlátozott¹⁷⁶. Nagy molekulásúlyuk miatt orális adagolásuk nem megoldható, illetve a központi idegrendszerbe is csak korlátozott hatékonysággal képesek bejutni¹⁷³.

Az FDA (amerikai Élelmiszer- és Gyógyszerengedélyeztetési Hivatal) három echinocandin típusú szert engedélyez gombás fertőzések kezelésére. Ezek közül először 2001-ben a caspofungint, 2005-ben a mikafungint, majd 2006-ban az anidulafungint vezették be¹⁷³. Ezen antimikotikumok magas áruk miatt kevésbé elterjedtek a fejletlen, illetve fejlődő országok egészségügyi intézményeiben. Egyes tanulmányok azonban rávilágítanak, hogy mivel nem váltanak ki mellékhatásokat és ritkán alakul ki ellenük a kezelés során rezisztencia, alkalmazásuk a poliénekkal vagy azolokkal összehasonlítva minden szempontból kedvezőbb¹⁷⁷.

3.4.3.1. Mikafungin

A mikafungin szerkezete a korábban bevezetett caspofunginhoz nagyon hasonló, de egy további N-acil zsírsavláncsal rendelkezik, ami fokozza kötődési affinitását a célenzimhez¹⁷⁸. Ez a specificitás tovább növeli a kezelés sikerességének lehetőségét. A mikafungin aktivitását bizonyítja, hogy már rövid távú, alacsony koncentrációjú kezelés esetén is radikális hatással van a patogénre. A gombasejtek akár egy terápiás dózis hatására is jelentős morfológiai változáson mennek keresztül: megduzzadnak, szabálytalan alakot vesznek fel, illetve sejtfaluk elvékonyodik¹⁷⁹.

3.4.3.2. Echinocandin rezisztencia

Annak ellenére, hogy az echinocandin típusú antifungális szerek vannak a legrövidebb ideje forgalomban, számos *Candida* fajban megfigyeltek már velük szemben kialakuló rezisztenciát^{93,163,180,181}. Az echinocandin rezisztencia kialakulásának genetikai háttere rendkívül univerzális a *Candida* nemzetségben belül. A fenotípus ezekben a fajokban az *FKS* génekben bekövetkezett mutációkhoz köthető (3. ábra). *C. albicans* esetében az aminosav szubsztitúciók jellemzően két mutációs forrópont (HS1, HS2) helyére térképeződnek^{163,182,183}. Egy nemrégiben készült tanulmány egy további HS régiót (HS3) is összefüggésbe hozott a rezisztencia kialakulásával, de ennek szerepe még nem bizonyított¹⁸⁴. *C. albicans* klinikai izolátumok vizsgálata alapján a leggyakrabban előforduló aminosav csere az *FKS1* HS1 régiójában elhelyezkedő 645-ös pozícióban található szerint (S645) érinti^{127,183}. Az *FKS2* és *FKS3* szerepe a *C. albicans* echinocandin rezisztenciájában kevésbé ismert, de deléciójuk az *FKS1* megnövekedett expresszióját, illetve fokozottabb echinocandin toleranciát okoz¹⁸⁵. *C. glabrata* esetén az echinocandin rezisztencia kialakulása főleg az *FKS2* 663-as pozíciójában található szerin mutációkhoz köthető^{183,186}.

Általánosságban elmondható, hogy a *Candida* nemzetségbe sorolható fajok jól reagálnak az echinocandin kezelésre, azonban a *C. parapsilosis* (*C. parapsilosis sensu stricto*, *Candida orthopsilosis* és *Candida metapsilosis*¹⁸⁷) komplex esetében a többi fajjal összevetve magasabb MIC értékek jellemzőek¹⁸⁸. Ennek oka, hogy ezen fajok az *FKS1* génnek egy polimorf formáját hordozzák, ahol a 660-as pozícióban található rendkívül konzervált prolin helyét alanin vette át. A glükán szintáz

gátlásának kinetikai vizsgálata rámutatott, hogy a *C. parapsilosis* eredetű enzim 1-2 nagyságrenddel kevésbé érzékeny az echinocandinok jelenlétére, mint a *C. albicans* eredetű normál struktúrájú enzim. Emellett a fenotípusért felelős aminosav csere létrehozása *C. albicans*, *C. glabrata* valamint *S. cerevisiae* törzsekben is az echinocandin MIC érték növekedését okozta¹⁸³.

Az *FKS1* génben bekövetkező aminosav szubsztitúciók a β -glükán szintáz enzim aktivitását csökkentik, ami a sejtfal összetételének módosulását okozza^{189,190}. A mutációt hordozó gombasejtek így rendszerint érzékenyebbek bizonyos környezeti tényezőkkel szemben^{189–192}. Ennek következtében a rezisztens törzsek életképesség tekintetében alulmúlják vad típusú megfelelőiket, ami feltehetőleg magyarázatot ad arra, hogy miért nem jellemző a terápiára nem reagáló izolátumok közvetlen terjedése az egészségügyben¹⁹⁰. A sejtfal megváltozott összetételét – legyen annak oka akár az echinocandin kezelés, akár a rezisztencia kialakulása során mutálódott *FKS1* módosult aktivitása – *Candida* fajokban több kompenzáló folyamat is ellensúlyozhatja. A β -glükán mennyiségének csökkenése transzmembrán proteineken keresztül a Rho1 GTPáz aktivációját idézi elő. A Rho1 által szabályozott Pkc1 (Protein kináz C), illetve β -1,3-glükán szintáz alegységek aktivációja a sejtfal károsodást kompenzáló szignalizációs hálózatok működésbe lépését katalizálja. Ezen folyamatok eredményeként amellet, hogy a sejtek nagyobb mennyiségű kitint szintetizálnak, a sejtfalukat alkotó egyéb poliszacharidok kompenzációs átrendeződése is megkezdődik¹⁹³. A kitin szintéziséért, és ennek eredményeként a sejtfal integritásának megőrzéséért a PKC szignáltranszdukciós útvonal mellett két további hálózat, a HOG (High-osmolarity glycerol), illetve a Ca^{2+} -kalcineurin útvonal is felelős¹⁹⁴. A stresszválaszban szerepet játszó szignalizációs útvonalak aktivációja echinocandin kezelés esetén toleranciát idézhet elő az antifungális szerrel szemben, ami a rezisztencia kialakulásához vezető folyamat köztes szakasza lehet¹²⁹.

A poliénekhez és azolokhoz hasonlóan az echinocandinokkal szemben kialakuló rezisztenciában is szerepe van a Hsp90 hősokk fehérjéknek. Ezt bizonyítja, hogy mind a protein farmakológiai, mind genetikai gátlása *C. albicans* és *C. glabrata* esetében is megnöveli az echinocandinokkal szembeni érzékenységet. A Hsp90 echinocandin rezisztenciában betöltött szerepét feltehetően a PKC szignalizációs útvonal komponensei és a kalcineurin stabilizálásán keresztül fejt ki¹⁹⁵.

Egyes esetekben a gombasejtek plazmamembránjának összetétele is kihathat az echinocandinokkal szembeni toleranciára. Healey és munkatársai *C. glabrata* laboratóriumi törzseket és klinikai izolátumokat vizsgáltak. Megfigyeléseik szerint a szfingolipid bioszintézisben bekövetkező változások caspofunginnal szemben rezisztens, de mikafungin kezelésre hiperérzékeny *C. glabrata* törzseket eredményeznek. Ennek feltételezhető oka, hogy a módosult szfingolipid összetétel ellentétes hatással van a két vizsgált echinocandin és célenzim (Fks1) közötti interakcióra^{196,197}.

3.4.3.3. Az echinocandin rezisztencia *C. auris* esetén

C. auris esetében is az *FKS1* mutációja alakítja ki az echinocandin rezisztenciát. Az HS1 639-es pozíciójában található szerin három eltérő szubsztitúciója (S639F, S639P és S639Y) gyakori a rezisztens klinikai izolátumokban^{163,170}. Bár kisebb gyakorisággal, de egyéb további aminosav cserék is előfordulhatnak echinocandin rezisztens törzsekben. Ezek közül a D642Y, S639T, F635L/Y és a F635* a HS1-re, míg az R1354S/H a HS2-re térképeződik^{170,198}. Ezen mutációk echinocandin rezisztenciában betöltött szerepe azonban még nem nyert kísérletes bizonyítást. *In vitro* mikroevolúcióval létrehozott caspofungin rezisztens törzsek analízise az *FKS1*-ben bekövetkező aminosavcserék mellett *ERG3* mutáció kialakulásához is vezetett, mely a flukonazollal szembeni rezisztenciát okozott. Ez azt jelenti, hogy *C. auris* esetében echinocandin kezelés hatására akár specifikus szelekciós nyomás nélkül is kialakulhat triazol keresztrezisztencia¹⁰⁶.

Érdekes megfigyelés, hogy echinocandin rezisztens törzseket olyan páciensekből is izoláltak már a múltban, akik nem részesültek korábban echinocandin kezelésben. Ez alapján arra következtethetünk, hogy a klinikai jelentőségű *Candida* fajokkal ellentétben, *C. auris* törzsek esetében a szerzett rezisztencia nem jár olyan mértékű fitness veszteséggel ami csökkentené a patogén fertőzőképességét, így a rezisztens törzsek szabadon képesek terjedni a betegpopulációban¹⁹⁸.

3.5. A *C. auris* részletes jellemzése

3.5.1. A *C. auris* stressztoleranciájának jellegzetességei

A *C. auris* térhódításának megértéséhez fontos megvizsgálni azt, hogy a patogén milyen környezeti körülmények között életképes. Heaney és munkatársai 2019-ben 17 különböző *C. auris* izolátum stressztűrő képességét hasonlították össze a *Candida* nemzetség számos klinikailag releváns képviselőjével. Munkájuk alapján a *C. auris* a többi *Candida* fajhoz hasonlóan tolerálja a különböző környezeti kihívásokat, mint az oxidatív stressz, sóstressz vagy a sejtfal károsító ágensek. Emellett a vizsgált *C. auris* izolátumok a *C. albicans*-hoz képest érzékenyebbek voltak az alacsony pH-ra (pH2), viszont jobban tolerálták a lúgos körülményeket (pH13). Ez az eredmény összefüggésbe hozható azzal a megfigyeléssel, hogy a *C. auris* nem képes a gasztrointesztinális traktus kolonizációjára^{199–201}. A magas pH-n tapasztalt életképesség, valamint a *C. auris*-ra jellemző termotolerancia továbbá feltételezhetően hozzájárul a mikroba kórházi környezetben tapasztalható terjedéséhez, mivel ezek a körülmények részei az egészségügyi fertőtlenítési protokollnak^{24,199}. Ezenfelül a szerzők arra is rámutattak, hogy a *C. auris* környezeti terjedését nagy mértékben megkönnyíti, hogy műanyag felületen megtapadva nedvesség, valamint tápanyag hiányában akár 12 napig is életképes marad²⁴. Ez a tulajdonság a *Candida* nemzetségen belül mindössze a *C. parapsilosis*-ra jellemző, mely a *C. auris*-hoz hasonlóan szintén gyakran terjed egészségügyi intézményeken belül, nozokomiális járványokat kialakítva^{65,202,203}. A magas

hőmérséklettel, illetve a sós környezettel szembeni tolerancia magyarázattal szolgál arra a megfigyelésre is, hogy a bőr kolonizálása során a *C. auris* a hónalj, valamint az ágyék körüli területeket kedveli²⁰⁴.

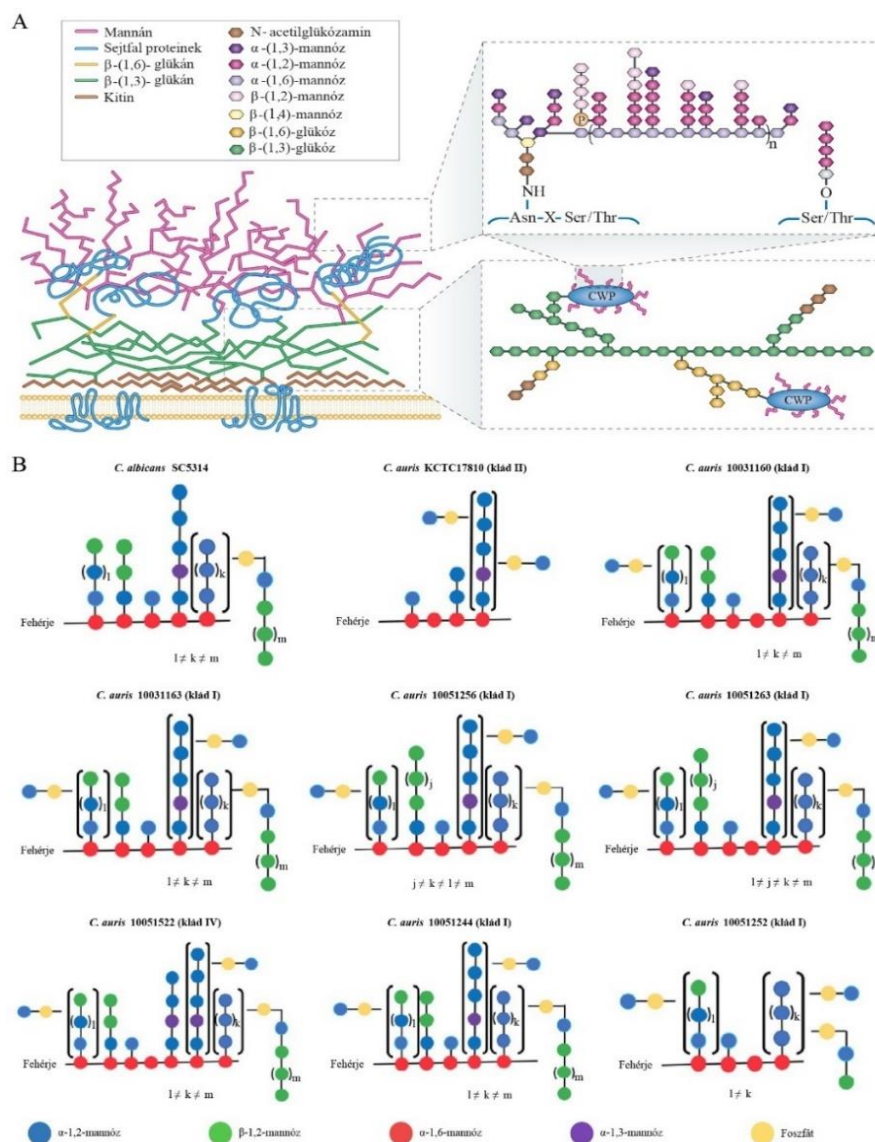
A *C. auris* nagyfokú tűrőképessége összefüggésbe hozható a stressz válaszokhoz köthető szignalizációs útvonalak, mint a HOG1 (mitogén-aktivált protein kináz) vagy PKA (protein kináz A) fokozott aktivációjával^{205–207}. Emellett a környezethez való hatékony adaptációban feltehetőleg szerepet játszhatnak kiterjedt genomi változások is, mint a kromoszóma szintű átrendeződések, aneuploidia és poliploidia, melyek a genomi diverzitás mozgatórugói^{208–210}. A genom strukturális változásai a mitózis vagy meiózis során bekövetkezett hibák, illetve paraszexuális reprodukció során is előfordulhatnak. Bravo Ruiz és munkatársai 2019-es munkájuk során 26 *C. auris* izolátum kariotípus vizsgálatát végezték el. Eredményeik arra utalnak, hogy a *C. auris* izolátumok, kládtól függetlenül, mind kromoszómaszám, mind kromoszóma méret tekintetében rendkívüli változatosságot mutatnak. Emellett megfigyelték, hogy hőstressz hatására az izolátumok kromoszóma száma anélkül csökken, hogy veszítenének életképességükből²¹¹. Ez alapján arra következtethetünk, hogy *C. auris* esetében a genomi struktúra drasztikus változása drasztikus fitnessz veszteség nélkül nyújt lehetőséget a kedvezőtlen külső tényezőkhöz való adaptációra. Emellett érdemes azt is kiemelni, hogy ezen átfogó változások számos járulékos hatással is bírhatnak, mint például fokozott sejtciklus, vagy csökkent érzékenység az antimikotikumokkal szemben²¹¹.

3.5.2. *C. auris* sejtfalli struktúrája

A gombasejtek az állati eredetű sejtekkel ellentétben sejtfallal rendelkeznek. Ez a dinamikusan változó összetételű strukturális elem szerepet játszik a sejt életképességében, morfológiájának fenntartásában, illetve patogenitásában²¹². A sejtfalli komplexitását jól szemlélteti, hogy a *S. cerevisiae* genomjának csaknem egy-ötödét a sejtfalli bioszintézisében szerepet játszó gének teszik ki^{213,214}. A gombasejt fiziológia tulajdonságainak meghatározása mellett fertőzés esetén a sejtfalli jelenti az első lehetséges érintkezési pontot a gazdaszervezet immunsejtjeivel, így kiemelt immunmoduláló hatással is bír^{212,215,216}.

Struktúráját tekintve a sejtfalli két nagy egységre bontható: a vázra és a mátrix komponensekre (4A ábra). Az evolúciósan konzervált felépítésű váz vagy belső réteg, a plazmamembrán közvetlen közelében helyezkedik el és kitin, β -(1,3)-glükán, valamint β -(1,6)-glükán alkotja^{212,216,217}. Ezt a struktúrát kívülről glikolizált proteinek tartalmazó mátrix fedi, melynek összetétele fajoként jelentősen eltérhet^{212,218}. *Saccharomyces* és *Candida* fajok esetében a sejtfalli külső rétegének fő alkotóelemei erősen mannozilált glikoproteinek. A sejtfalli ágazódó fehérjékhez a mannán alegységek kétféle módon kapcsolódhatnak. N-mannoziláció esetén az α -(1,2)- és α -(1,3)- mannán oldalláncokkal erőteljesen kiegészített lineáris α -(1,6) mannán gerinc a proteinben található aszparaginsav amino-csoportjához kapcsolódik. O-

mannoziláció során az α -kapcsolt mannóz alegységek rövid láncot alkotva a protein szerin/reonin aminosavaihoz kötődnek^{212,216}.



4. ábra

A *Candida* nemzetség sejtfalának felépítése (A), valamint a *C. auris* különleges mannán struktúrája (B)

(Natea és munkatársai, Bruno és munkatársai alapján^{216,219})

Egyes humánpatogén gombákra (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. auris*) jellemző, hogy sejtfalukban, *de novo* szintetizálódó melanint halmoznak fel. Ennek strukturális feladata a sejtfal rigiditásának növelése, míg funkcionálisan virulencia faktorként járul hozzá a gazdaszervezet kolonizációjához^{212,220,221}. Emellett, erős antioxidánsként képesek a gazdaszervezetben megóvni a gombasejteket a makrofágok és neutrofil granulociták által indukált oxidatív sejtkárosító folyamatoktól²²².

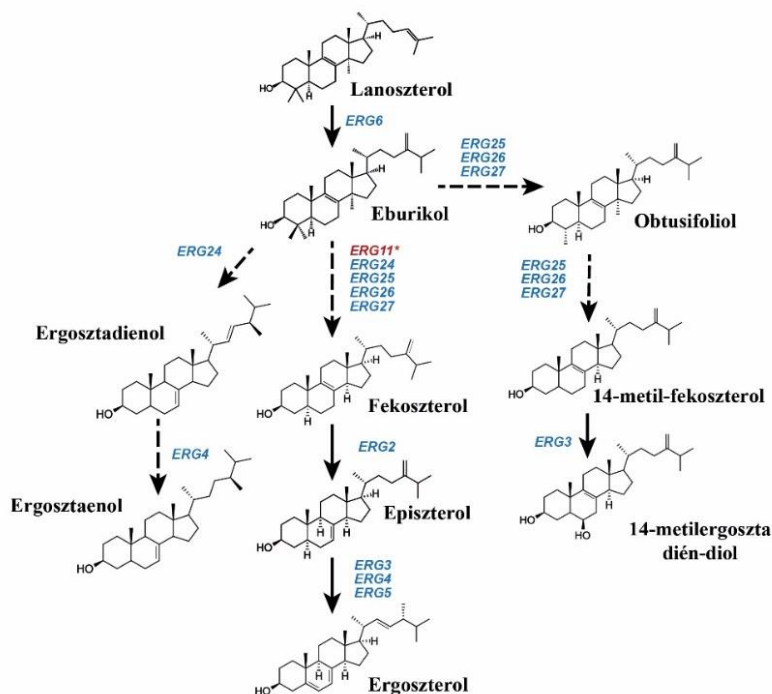
A *C. auris* sejtfalának felépítése transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálat alapján nagymértékű hasonlóságot mutat a *Candida* nemzetség többi képviselőjéhez²²³. A sejtfal részletesebb vizsgálata azonban számos strukturális elem szerkezeti eltérését fedte fel. A *C. auris* eredetű β -glükán egyes oldalláncai jellegzetesen rövidnek bizonyultak és a közöttük mért távolság nagyobb volt a *C. albicans* β -glükánjánál tapasztaltnál képest, ami lazább struktúrát feltételez. A mannánok szerkezeti vizsgálata során a két faj között fokozottabb különbség volt tapasztalható, mely izolátumonként is eltérést mutatott (4B ábra). *C. auris* eredetű N-kapcsolt mannánok a korábban említett oldalláncok mellett egyedi α -1,2-mannóz-foszfát leágazásokat tartalmaztak. Emellett a *C. auris* mannán polimerjeinek molekuláris tömege is szignifikánsan alacsonyabb ($\sim 10 \times 10^3$ Da) a *C. albicans*-hoz viszonyítva (500×10^3 Da)²¹⁹. Gombafertőzés esetén sejtfelszíni elhelyezkedésükből adódóan a mannánok, illetve a mannotoproteinek jelentik az első lehetséges kapcsolódási pontot a gombasejt és a gazdaszervezet immunsejtjei között, így ez az eltérés feltehetőleg szignifikáns hatással lehet a *C. auris* immunrendszer általi felismerésére²¹⁶.

3.5.3. Plazmamembrán felépítése és az ergoszterol bioszintézis útvonal

A plazmamembrán minden eukarióta sejt számára esszenciális sejtalkotó. Amellett, hogy elválasztja a sejtet a környezettől, transzportfolyamatok révén kapcsolatot is biztosít vele²²⁴. A gomba sejtek plazmamembránja kettős foszfolipid rétegből áll, melybe proteinek, illetve szterol származékok ágyazódnak. Az egyes komponensek lipid raftoknak nevezett funkcionálisan eltérő mikrodoméneket alkotnak, melyek a membrán többi részéhez viszonyítva nagyobb koncentrációban tartalmaznak telített zsírsavakat és szterolokat^{225,226}. Eukarióta sejtekben a szterol bioszintézis útvonalak rendkívül konzerváltak. Mind az emlős sejtekre jellemző koleszterol, mind a gomba sejtekben található ergoszterol ugyanazonokon az intermediereken keresztül, de eltérő enzimek segítségével szintetizálódik²²⁷. Funkciójuk is megegyezik: szerepet játszanak a membrán fluiditásának és permeabilitásának szabályozásában, illetve integritásának biztosításában^{224,228}. A szterol származékok *de novo* bioszintézise három modulra osztható. Az egyes reakciók katalizálásában 30 enzim vesz részt, melyek az *ERG* gének által kódoltak. Az első modul a mevalonát-, a második a fernezil pirofoszfát-, a harmadik pedig az ergoszterol bioszintézisét foglalja magába^{229,230}. A bioszintézis útvonal első két modulját érintő mutációk letálisak a sejtre nézve, mivel több, a sejt metabolizmus szempontjából esszenciális termék képződését indukálják²³¹. Az utolsó modul lépéseit katalizáló enzimek azonban hordozhatnak mutációkat.

Az első két modul során szintetizálódó lanoszterolból demetilációs (Erg11), redukciós (Erg24) és deszaturációs (Erg27) lépéseken keresztül, összetett folyamat során zimoszterol képződik. Ezt a C-24 metiltranszferáz (Erg6) fekoszterollá, majd a C-8 izomeráz (Erg2) episzterollá alakítja. A keletkezett episzterolból deszaturációs és redukciós lépéseken keresztül az Erg3, Erg5 és Erg4 által katalizált reakciók hozzák létre az ergoszterolt (5. ábra)²³².

Az Erg11 enzim működésének azolokkal történő gátlása alternatív enzimreakciók aktivációját eredményezi (5. ábra). Az így létrejövő obtuszifoliol több lépésben 14 α -metilfekoszterollá alakul, melyből az Erg3 által katalizált reakció során 14 α -metilergoszta-dién-diol képződik. Ez az szterol melléktermék a plazmamembránba beépülve fungisztatikus hatást fejt ki a gombasejtre²³³.



5. ábra

Az ergoszterol bioszintézis folyamatának sémája

(Martel és munkatársai alapján²³³)

Az *ERG* génekben bekövetkező mutációk hatására ergoszterol hiányában a sejtek membránjának fluiditása megnő, ami a diffúziós koefficiens növekedését okozza. Ennek eredményeként a sejtek környezetében jelenlévő vegyületek nagyobb hatékonysággal jutnak be passzív diffúzióval a citoplazmába. A plazmamembrán szterol egyensúlyának felbomlása tehát jellemzően növeli a gombasejtek érzékenységét a külső behatásokkal szemben²³⁴.

3.5.4. A *C. auris* multi-omikai jellemzése

A patogén gombák működésének megértéséhez fontos, hogy a sejteket komplex egységként kezeljük. Ehhez egyes életfolyamataik önálló feltérképezésére van szükség, majd ezen adatok integrálására. Az ilyen jellegű vizsgálatokhoz szolgál alapként a multi-omikai megközelítés, mellyel bővebb információt nyerhetünk többek között az antifungális rezisztencia kialakulásáról, valamint a gomba virulenciájához köthető jellegzetességekről, melyek megértése *C. auris* esetén kiemelten fontos.

3.5.4.1. Lipidomikai változások szerepe az antifungális rezisztenciában

A gombasejtek plazmamembránjának fiziológiai tulajdonságait a szterolokon kívül, további *de novo* szintetizálódó, valamint exogén eredetű lipidek is befolyásolják^{235–237}. Ezek olyan folyamatokat határoznak meg, mint a membránba ágyazott transzporterek aktivitása, vagy az ATPáz aktivitás^{237,238}. Emlős sejt eredetű ABC típusú efflux pumpákon végzett *in vitro* kísérletek alapján az optimális ATPáz aktivitás biztosításához kiemelten fontos a transzporter közvetlen környezetében található foszfolipidek összetétele^{237,239}. Az efflux folyamatok és az optimális lipid összetétel kapcsolatát tovább erősíti, hogy bizonyos ABC típusú transzporterek (*C. albicans* esetében a Cdr1) flippáz aktivitásuknak köszönhetően képesek a foszfolipidek mozgására a plazmamembrán két oldala között. Az efflux pumpák expressziójának megváltozása így a foszfolipidek egyensúlyának módosulásához vezet²⁴⁰.

Antifungális szerekekkel szemben érzékeny (MMC-2) és flukonazolra és caspofunginra nézve rezisztens (MMC-1) *C. auris* izolátumok összehasonlítása alapján az érzékeny törzsben magasabb foszfatidilkolin koncentráció, illetve a páratlan szénatom számmal rendelkező zsírsavláncok túlsúlya jellemző²⁴¹. Ezzel szemben a rezisztens törzsben a kardiolipinek, a C18:3 lipidek és C16:1 glicerolipidek arányának szignifikáns csökkenése figyelhető meg. Az analízisek alapján az MMC-1 sejtek lizofoszfolipid tartalma is megnövekedett, ami feltehetőleg fokozott foszfolipáz enzim aktivitással függ össze. Emellett ebben a törzsben a egyes szfingolipidek, mint a ceramidok, hexoceramidok és inozitolfoszoceramidok megnövekedett mennyiségét is leírták²⁴¹. A szfingolipidek hangsúlyosabb megjelenése feltehetőleg közvetlen összefügg az antifungális rezisztencia kialakulásával, mivel ezek a lipidek szerves részét képezik az efflux pumpákat magukba foglaló membrán mikrodoméneknek²³⁴. A szfingolipidek *C. auris*-ban betöltött lehetséges rezisztencia moduláló szerepét tovább erősítik Kumar és munkatársai megfigyelései, akik rezisztens *C. auris* izolátumokat vizsgálva szintén a szfingolipidek megnövekedett jelenlétét tapasztalták²⁴².

3.5.4.2. A *C. auris* genomikai sajátosságai

A *C. auris* haploid mikroorganizmus, genomjának mérete 12,1 és 12,7 Mb között mozog. A fehérjét kódoló gének száma a többi *Candida* fajhoz hasonlóan 5288 és 5601 közé tehető²⁷. Pulzáló mezejű gélelektroforézissel (PFGE) elvégzett kísérletek alapján ezek a gének 5-7 kromoszómán helyezkednek el^{48,211,243}. A többi kláddal összevetve a klád II izolátumainak genomjában kiterjedt szekvencia átrendeződések találhatók: 2 inverziós és 9 transzlokációs kromoszóma szakasz is azonosításra került, ami jelentősen eltérő kariotípust eredményez⁵⁵. A genomi diverzitás feltételezhető oka ezen törzsek esetében, hogy funkcióvesztéses mutációt hordoznak a *DCC1* génjükben⁵⁵. Ezen gén homológjának csökkent funkciója *S. cerevisiae*-ben bizonyítottan a genom instabilitásához vezet. *C. auris* esetében ez a jellegzetesség összefügg a genom plaszticitásával, ami hozzájárul a környezethez való kiemelkedő alkalmazkodó képességhez²⁴⁴.

A *C. auris* genom szekvenciájának korai vizsgálatai rámutattak, hogy a genom 42%-át hidroláz típusú enzimeket (szekretált aszpartil proteáz, szekretált lipáz) kódoló gének teszik ki, melyek főként a gomba inváziós képességében játszanak szerepet²⁰⁶. Az izolátumok széleskörű vizsgálata arra utal, hogy a *C. auris* a *C. albicans*-hoz hasonló virulencia faktorokkal rendelkezik. Az összehasonlító elemzések számos ion-, aminosav-, és oligopeptid transzporter; adhezin; illetve mannozil transzferáz kódoló szakaszának azonosítását tették lehetővé²⁰⁵. Az izolátumok jellemzése során megfigyelt rendhagyó fonalas növekedés genetikai determinánsai ez idáig ismeretlenek, mindössze az bizonyított, hogy ebben a fajban nem találhatók meg olyan klasszikusan hifa típusú növekedéssel kapcsolatba hozható gének, mint a candidalizin kódolásáért felelős *ECE1*, valamint a hifa sejtfal asszociált *HWP1*^{27,245}.

A törzsek szekvencia analízise a rendszeresen kialakuló antifungális rezisztencia megértésében is támpontként szolgálhat. Az azokkal szembeni csökkent érzékenység például egyes izolátumokban összefüggésbe hozható az antimikotikum célmolekuláját kódoló gén, az *ERG11* megnövekedett kópiaszámával. A megnövekedett enzimaktivitás ezekben a törzsekben flukonazol rezisztenciát eredményez²⁷. Egy másik klasszikus rezisztencia mechanizmus jelentőségét feltételezi a *C. auris*-ban azonosított transzporter fehérjét kódoló gének mennyisége. A *C. auris* genomja egy Cdr1/Cdr2/Cdr11 transzporterhez, két Cdr4 transzporterhez és két Snq2 transzporterhez köthető gént tartalmaz, illetve egyes izolátumok (B11221) további másolatot tartalmaznak az *SNQ2* gén ortológiából²⁷. Emellett az oligopeptid transzporterek mennyisége is szignifikánsan magasabb több *Candida* fajjal összehasonlítva. Ezen transzporterek feltehetőleg szerepet játszanak a triazol kezelésre létrejövő oxidált glutation származékok citoplazmából történő elszállításában, így védve a sejtet az oxidatív károsodástól^{27,246}.

3.5.4.3. Antifungális szerekkel történő kezeléshez köthető metabolomikai változások

C. albicans esetében flukonazol kezelés hatására a glükóz anyagcsere négy kiemelt központi intermediérének (α -ketoglutarát, glükóz-6-foszfát, fenilpiruvát és ribóz-6-foszfát) koncentrációjának növekedése figyelhető meg a sejtekben²⁴⁷. A rezisztenciában betöltött szerepük mellett ezen metabolitok igazoltan szerepet játszanak a *Candida* fajok patogenitásában is, ami arra utal, hogy ez a két tulajdonság a sejt metabolikus folyamatainak szintjén is kapcsolatban áll egymással^{248,249}. A legjelentősebb változásokat mutató metabolitok közül az α -ketoglutarát a citromsavciklus, míg a ribóz-5-foszfát a pentóz-foszfát útvonal kulcsfontosságú intermediere. Az α -ketoglutarát felhalmozódása feltehetőleg összefügg a sejt morfológia váltásával, mivel a szintéziséért felelős enzim kifejeződését a fonalas növekedést szabályozó transzkripció faktor, az Efg1 represszálja^{249,250}.

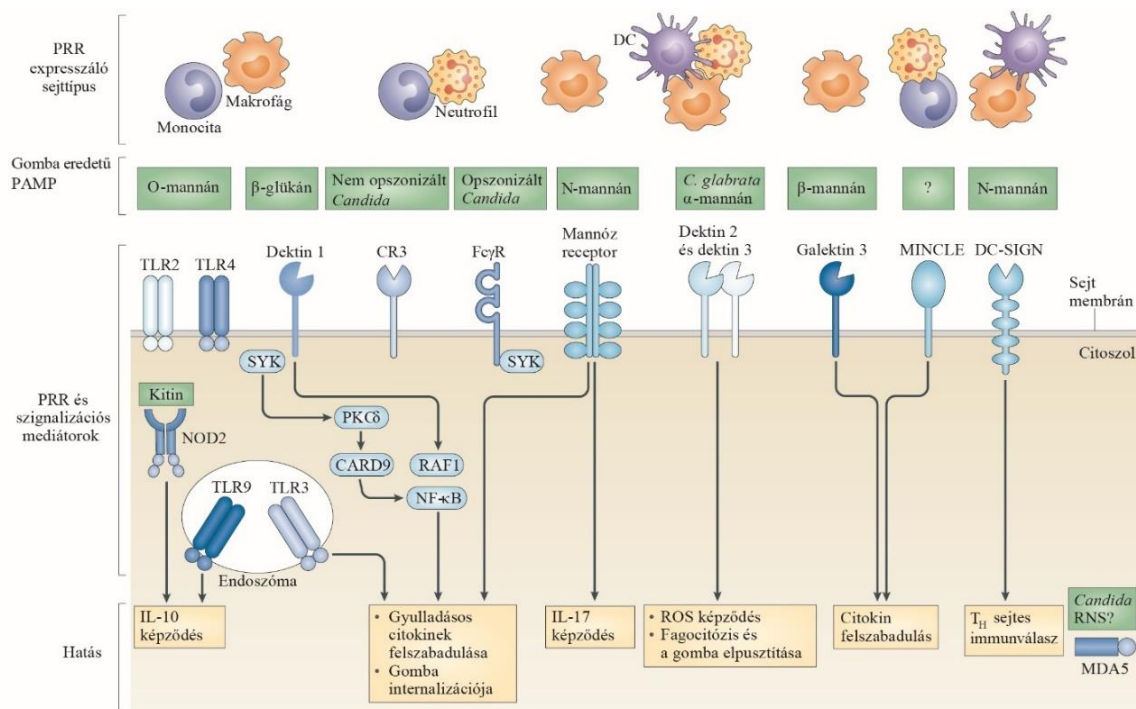
Olyan aminosavak mennyisége, mint a glicin, triptofán és aszparagin szignifikáns csökkenést mutat flukonazol kezelést követően. A *C. albicans* anyagcseréjében a glicin a cisztein prekursora, ami a sejt intracelluláris glutation tartalmának befolyásolásán keresztül részt vesz a sejt detoxifikációjában, így hatással van a gomba életképességére antifungális szerek jelenlétében^{251–253}. A flukonazol kezelés során

tapasztalt glicin koncentráció csökkenés alátámasztja, hogy az azolok az glutation szintézisének közvetett gátlásán keresztül intracelluláris oxidatív stresszt is kiváltanak²⁵⁴.

C. albicans-al összevetve *C. auris* esetében a glikolízis/glükoneogenezis metabolikus útvonalak alulműködése, illetve a citromsavciklus aktivitásának fokozódása tapasztalható²⁴¹.

3.6. A gomba patogének immunsejtek általi felismerése

Mikrobafertőzések esetében az immunválasz aktiválódásához vezető első lépés a patogén felismerése, mely receptor-ligand kölcsönhatásokon alapul²⁵⁵. *Candida* fertőzés esetén a gazdaszervezet immunsejtjein expresszált mintázatfelismerő receptorok (PRR) a gomba sejtfalának komponenseit patogén asszociált molekuláris mintázatként (PAMP) ismerik fel (6. ábra)²⁵⁶.



6. ábra

A gomba fertőzésekben szerepet játszó patogén asszociált molekuláris mintázatok és mintázat felismerő receptorok

(Netea és munkatársai alapján)²⁵⁷

A szervezet immunválaszának első védelmi vonalát a vérben keringő monociták és neutrofil granulociták adják. A monociták felszínükön Toll-szerű receptorokat (TLR), illetve C-típusú lektin receptorokat (CLR) hordoznak, melyeknek a mikroba eredetű sejtfal komponensek (mannán, β -glükán) a ligandjaik. A neutrofil granulociták ezzel szemben kisebb mértékben expresszálnak TLR receptorokat, de a komplement receptor 3 (CR3), illetve az FC γ receptor kifejezése fokozottan jellemző rájuk. A dendritikus sejtek szintén nagy számban rendelkeznek mintázatfelismerő receptorokkal. Ezen sejt típus a makrofágokkal kiegészülve antigénprezentáló funkciójának segítségével összeköttetést biztosít a

természetes és az adaptív immunválasz között. Fertőzés esetén számos PRR egyidejű aktivációja felelős a komplex immunválasz kialakításáért²¹⁶.

A gomba sejtfalban megtalálható β -glükán a CR3-hoz, illetve a dectin 1 receptorhoz való kapcsolódás útján válthat ki immunválaszt^{216,258}. A receptor-ligand kapcsolat kialakulása Syk-CARD9 (Spleen Tyrosine Kinase-caspase Recruitment Domain Protein 9) útvonalon keresztül NF- κ B aktivációhoz vezet, ami számos protektív citokin és kemokin, többek közt az IL-2, IL-6, IL-10, IL-17 stimulációjáért felelős^{259,260}.

Korai hipotézisek szerint a kitin polimerek beágyazott elhelyezkedésük miatt nem lépnek közvetlen interakcióba az immunsejtekkel, így nem vesznek részt az immunrendszer aktiválásában. Ennek azonban ellentmond, hogy a β -glükán felismerésében szerepet játszó dectin-1, gomba eredetű kitin kezelés hatására Syk függő módon képes IL-10 expressziót indukálni²⁶¹. A polimer immunmoduláló szerepére utal továbbá, hogy koncentráció függő módon képes gyulladásos vagy anti-inflammatorikus immunválasz kiváltására is. Ma már tudjuk, hogy a gombák által aktívan a környezetbe juttatott, illetve a sejtek pusztulása során kis mennyiségben felszabaduló kitin oligoszacharidokat a NOD2 és TLR9 PRR-ek képesek ligandként felismerni. A kapcsolódó szignalizációs útvonalak aktivációja csillapítja a gyulladásos folyamatok hatását és fenntartja az immunrendszer homeosztázisát. Ezzel szemben fertőzés során a patogénnel gazdaszervezetbe jutott nagy mennyiségű sejtfal eredetű kitin a dectin-1 és TLR2 receptorokon keresztül gyulladásos választ indukál²⁶².

Mivel a *Candida* fajok sejtfalának külső rétegét mannoproteinek alkotják, így a mannóz alegységek szerepe kiemelt az immunrendszer aktivációjában^{263,264}. Az első jellemzett mannán felismerő receptorok a C-típusú lektinek csoportjába tartozó mannóz receptorok (MR)²⁶⁵. Tisztított sejtfal struktúrákkal végzett *in vitro* kutatások alapján az MR-ek szelektív módon az N-kapcsolt mannán felismerésére képesek, míg a lineáris O-kapcsolt mannán felismerését a TLR4 receptor végzi^{266,267}. Ezek mellett a gomba eredetű mannóz felismerésében a dectin-2, illetve a dendritikus sejtek felszínén található DC-SIGN is szerepet játszik²⁶⁸.

A *C. albicans* és *C. auris* immunsejtekkel való interakciójának vizsgálata arra utal, hogy míg a *C. albicans* felismerésében főként a β -glükán játszik központi szerepet, addig a *C. auris* fertőzés esetén inkább mannán szerepe dominál²¹⁹. Ezen faj esetében a mannóz bioszintézisének gátlása szignifikánsan növeli a sejtek neutrofilek általi fagocitózisát. Ezek alapján feltételezhető, hogy a *C. auris* sejtekre jellemző különleges mannóz struktúra erősen maszkolja a sejtek felszínét, ami csökkenti a felismerés, illetve az elimináció hatékonyságát²²³. Ezzel feltehetőleg összefügg az a hisztopatológiai megfigyelés, mely szerint *C. auris* fertőzést követően a gombasejtek hosszú ideig képesek a gazdaszervezetben észrevétlenül fennmaradni, ami az immunstátusz megváltozásával opportunistá fertőzések forrása lehet²⁶⁹.

3.7. A rezisztencia kialakulása során bekövetkező fitness változások hatása a virulenciára

Az antifungális rezisztencia kialakulása során bekövetkező változások közvetett módon hatással lehetnek a gombapatogének fertőzőképességére is. Egy 2020-ban készült tanulmány során 70 körömgomba fertőzésből izolált *C. albicans* törzset vizsgáltak, és pozitív korrelációt találtak a gombasejtek azol típusú szerekkel (flukonazol, itrakonazol) szembeni rezisztenciája, illetve egyes virulencia faktorok, mint biofilm termelés, illetve fokozott foszfolipáz és hemolizin aktivitás között²⁷⁰. *C. glabrata* esetében a megnövekedett hemolizin aktivitás mellett, hasonló összefüggést találtak a fitáz enzim szekréciója és a gomba törzsek amfotericin B rezisztenciája, valamint az észteráz aktivitás és a mikafunginnal szembeni csökkent érzékenység között²⁷¹.

Az ismert virulencia faktorok jelenléte mellett a patogének általános fitnessa is meghatározza a patogenitást^{190,272,273}. Törzs és antifungális szer függő módon a rezisztenciával asszociált fenotípus változás a fertőzőképesség szempontjából előnyös és hátrányos is lehet a patogén számára.

A megfigyelés, miszerint amfotericin B rezisztencia ritkán tapasztalható klinikai gyakorlatban arra utal, hogy a rezisztens törzsek fertőzőképessége elmarad az érzékeny törzsekétől^{113,273}. Ezt alátámasztja, hogy mind *C. albicans*, mind pedig *C. tropicalis* esetében az amfotericin B-vel szemben rezisztens törzsek szisztémás egérmodellben avirulensek, aminek hátterében feltehetőleg az ergosterol bioszintézisben bekövetkező változások állnak^{94,136}. Hasonlóképp, az *ERG11* génben mutációt hordozó amfotericin B rezisztens *C. auris* izolátumok esetén is csökkent fertőzőképesség figyelhető meg, mind *Galleria mellonella*, mind szisztémás egér modellben²⁷⁴.

Az *ERG3* génben bekövetkező aminosav cserék mellett, hogy *C. albicans*-ban elősegítik a triazol rezisztencia kialakulását, a stressztűrő képesség csökkenését, illetve a hifaképződés gátlását is okozhatják. Annak ellenére, hogy szisztémás egérmodellben az *ERG3* mutáns törzsek nem tudnak kiváltani letális fertőzést, vaginális *candidiasis* modellben ez a virulenciacsökkenés nem megfigyelhető. Ez arra utal, hogy a mutációk patogenitásra gyakorolt hatása niche-függő is lehet²⁷⁵. Az *ERG3* mutációval összefüggésbe hozható virulencia csökkenést *C. parapsilosis* posakonazol rezisztens törzsek vizsgálata során szintén igazolták már a múltban²⁷⁶. Azon *C. albicans* klinikai izolátumokra, melyek az *ERG3* funkcióvesztéses mutációja ellenére is képesek hifaképzésre, ez a virulencia csökkenés azonban nem jellemző²⁷⁷. Az azol rezisztencia és virulencia közötti összefüggések komplexitására utal továbbá, hogy *C. glabrata* esetében a *TAC1* ortológ (*PDR1*) gén funkcionyeréses mutációja miatt rezisztens törzsek fertőzőképessége növekedést mutatott, rámutatva, hogy a rezisztencia kialakulásával a kolonizációs képesség pozitív irányba is változhat²⁷⁸.

Az echinocandinokkal szemben kialakuló rezisztencia oka leggyakrabban az *FKS1* génben bekövetkező mutáció. *C. albicans* izolátumok és *C. parapsilosis* evolválts törzsek vizsgálata alapján arra következtethetünk, hogy az *FKS1*-ben megjelenő aminosav cserék csökkentik a patogének

fertőzőképességét^{190,279,280}. Ennek feltehető oka, hogy a glükán szintáz működésének módosulása lassítja az osztódást és mérsékeli a fonalas növekedést, ami negatív irányba befolyásolja a virulenciát^{190,281}.

C. auris esetében az antifungális rezisztencia, illetve virulencia közötti összefüggések vizsgálata kiemelt jelentőséggel bír, mivel a törzsek nagy hányada ellenáll legalább egy terápiás szerrel történő kezeléssel szemben. Az egészségügyi gyakorlatban izolált rezisztens izolátumok magas száma arra utal, hogy a rezisztens fenotípus akár növelheti is a fertőzőképességet, ami fokozza a járványok kialakulásának kockázatát.

3.8. A mikroevolúció jelentősége a virulencia-rezisztencia összefüggés vizsgálatában

Az antifungális rezisztencia sok esetben a fertőzés kezelésére alkalmazott terápia során, a gazdaszervezetben alakul ki. Ebben a környezetben az antimikotikumok erős szelekciós nyomást fejtenek ki, ami mutációk felhalmozódásához vezet²⁸². Ezen mutációk egy része már ismert, ellenben keveset tudunk kialakulásuk mechanizmusáról és a fenotípusra gyakorolt közvetett hatásokról²⁸³. A mikroevolúciós kísérletek segítségével lehetőségünk adódik arra, hogy mindezen tényezőket is megvizsgáljuk – ezzel pedig megismerjük a szerzett antifungális rezisztencia evolúcióját. A mikroevolúciós eljárások két csoportját különíthetjük el: *in vivo* és *in vitro* mikroevolúció.

Az *in vivo* evolúciós vizsgálat során a fertőzést kiváltó mikroba törzset egy páciensből, többszöri mintavétellel izolálják, így nyomon követve a patogénben bekövetkező változások időbeli lefutását. Az izolátumok genomikai összehasonlítása alapján következtetni lehet a rezisztencia kialakulásáért felelős genetikai folyamatokra. Bár az *in vivo* mikroevolúció reprezentálja legpontosabban a klinikumban kialakuló drog rezisztenciát, csak korlátozottan alkalmazható²⁸². Egyrészt a szelekciós nyomás ebben az esetben sokrétű (pl: immunválasz), másrészt a fertőzést kísérő külső tényezők (hőmérséklet, antifungális szer koncentráció, tápanyag összetétel) is kontrollálhatatlanok, így a kapott eredmények nehezen reprodukálhatóak^{282,284}. Ennek ellenére számos *Candida* faj esetében eredményesen alkalmazzák ezen módszert a rezisztencia kialakulásáért felelős genomváltozások modellezésére^{283,285–288}.

Az *in vitro* evolúciós vizsgálat lehetőséget ad a rezisztencia kialakulásának szabályozott körülmények közötti tanulmányozására. A folyamat során a patogént vagy konstans körülmények között szelektív nyomás mellett tartják fenn, vagy az antifungális szerrel kiegészített tápoldat folyamatos frissítése mellett hosszabb távon tenyésztik^{282,284}. Az eljárás előnye, hogy a létrehozott rezisztens törzs közvetlenül összehasonlítható a szelekción még át nem esett szenzitív izolátummal. Így meghatározható a rezisztencia kialakulása hatása az adott törzs fitnessére, azaz reprodukív sikerére²⁸⁹. Ez az eljárás szintén széleskörűen alkalmazott *Candida* törzsek vizsgálatára^{94,290,291}. A környezeti izolátumok alacsony száma miatt ez az módszer különösen hasznos a *C. auris* vizsgálata során.

4. Célkitűzések

Munkám célja a feltörekvő humánpatogén *Candida* faj, a *C. auris* antifungális szerekkel szemben kialakuló rezisztenciájának vizsgálata.

A rezisztens törzsek létrehozására és a szerzett rezisztencia hatásának vizsgálatára az alábbi kísérletek végrehajtását tűztük ki célul:

1. Két eltérő genetikai háttérrel rendelkező, antifungális szerekkel szemben érzékeny *C. auris* klinikai izolátumból polién, triazol és echinocandin rezisztens törzsek létrehozása *in vitro* mikroevolúciós eljárással
2. A létrehozott rezisztens *C. auris* törzsek antifungális érzékenységének és abiotikus stressz rezisztenciájának vizsgálata
3. Az egyes rezisztens törzsek jellemzése genomikai, metabolomikai és lipidomikai szempontból
4. A létrehozott rezisztens törzsek virulenciájának vizsgálata *in vitro* és *in vivo* fertőzési modellekben

A munkám során kapott eredmények hozzájárulhatnak annak megértéséhez, hogy miként képes a *C. auris* rezisztencia kialakítására a jelenleg rendelkezésünkre álló valamennyi antifungális szer csoporttal szemben. Emellett pedig betekintést nyújthat majd a rezisztencia – fitness – fertőzőképesség közötti összefüggésekbe ezen faj esetében.

5. Anyagok és módszerek

5.1. ANYAGOK

5.1.1. Felhasznált gombatörzsek

A munkánk során elvégzett kísérletekhez az 1. táblázatban felsorolt gombatörzseket használtuk fel. A mikroevolúciós kísérletek alapját két, antifungális szerekkel szemben érzékeny *C. auris* klinikai izolátum (*C. auris* 0381, *C. auris* 0387) képezte. A kiindulási törzsek részei az amerikai Betegségmegelőzési és Járványügyi Központ (Center for Disease Control and Prevention- CDC) *C. auris* izolátum gyűjteményének, illetve elérhetőek a Szegedi Tudományegyetem Természettudományi és Informatikai Kar Mikrobiológiai Tanszékének törzsgyűjteményében.

1. Táblázat Felhasznált *C. auris* törzsek

Törzs	Klád	Származás	Eredet	Referencia
<i>C. auris</i> 0381 (B11220)	Klád II	Japán	humán fülváladék	⁵
<i>C. auris</i> 0387 (B8441)	Klád I	Pakisztán	humán vér	⁶
0381 AMB ^{evo}	-	mikroevolúció	<i>C. auris</i> 0381	jelen dolgozat
0381 FLU ^{evo}	-	mikroevolúció	<i>C. auris</i> 0381	jelen dolgozat
0381 POS ^{evo}	-	mikroevolúció	<i>C. auris</i> 0381	jelen dolgozat
0381 VOR ^{evo}	-	mikroevolúció	<i>C. auris</i> 0381	jelen dolgozat
0381 MICA ^{evo}	-	mikroevolúció	<i>C. auris</i> 0381	jelen dolgozat
0387 AMB ^{evo}	-	mikroevolúció	<i>C. auris</i> 0387	jelen dolgozat
0387 FLU ^{evo}	-	mikroevolúció	<i>C. auris</i> 0387	jelen dolgozat
0387 POS ^{evo}	-	mikroevolúció	<i>C. auris</i> 0387	jelen dolgozat
0387 VOR ^{evo}	-	mikroevolúció	<i>C. auris</i> 0387	jelen dolgozat
0387 MICA ^{evo}	-	mikroevolúció	<i>C. auris</i> 0387	jelen dolgozat

AMB: amfotericin B; FLU: flukonazol; POS: posakonazol; VOR: vorikonazol; MICA: mikafungin; evo: evolált törzs

5.1.2. Tápoldatok, táptalajok és egyéb reagensek

YPD/PS tápoldat (Yeast extract-Peptone-Dextrose; Élesztő-Pepton-Glükóz)

- 1 m/V% glükóz
- 1 m/V% pepton
- 0,5 m/V% élesztő kivonat
- 100 I.U/ml penicillin és 100µg/ml sztreptomicin (Lonza)

YPD/PS táptalaj (Yeast extract-Peptone-Dextrose; Élesztő-Pepton-Glükóz)

- 1 m/V% glükóz
- 1 m/V% pepton
- 0,5 m/V% élesztő kivonat
- 2 m/V% agar
- 100 I.U/ml penicillin és 100µg/ml sztreptomicin (Lonza)

A létrehozott gombatörzsek fenntartásához a szilárd YPD/PS táptalajokat az alábbiak szerint antifungális szerrel egészítettük ki:

AMB^{evo}: 8 µg/ml amfotericin B; FLU^{evo}: 64 µg/ml flukonazol; POS^{evo}: 16 µg/ml posakonazol;
VOR^{evo}: 16 µg/ml vorikonazol; MICA^{evo}: 16 µg/ml mikafungin

DMEM/FBS/PS (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)

- DMEM tápoldat (Lonza)
- 10 % hőinaktivált FBS
- 100 I.U/ml penicillin és 100µg/ml sztreptomicin (Lonza)

RPMI 1640/MOPS (Roswell Park Memorial Institute 1640- Morpolinepropanesulfonic acid) (pH 7.0)

- RPMI 1640 (Capricorn Scientific)
- 100 I.U/ml penicillin és 100µg/ml sztreptomicin
- 0,165 mol/L MOPS (Sigma-Aldrich)

PBS (Phosphate Buffered Saline; Foszfát pufferelt sóoldat) (1x) (pH 7.4)

- 137 mM NaCl
- 10 mM Na₂HPO₄
- 2,7 mM KCl
- 2 mM KH₂PO₄
- steril MilliQ desztillált vízzel kiegészítve

TE puffer (pH 8.0)

- 10 mM Tris-HCl (pH 8.0)
- 0,1 mM EDTA

FCW puffer (Flow Cytometry Wash)

- 0,5 % BSA
- 1x PBS

FCB oldat (Flow Citometry Blocking)

- 0,5 % BSA
- 2 mM NaN₃
- 1x PBS

5.1.3. Abiotikus stressz vizsgálatához használt táptalajok

Az abiotikus stressztolerancia vizsgálatokhoz minden esetben YPD/PS táptalajt használtunk, amit a következők szerint egészítettünk ki:

Növekedési képesség vizsgálata különböző ozmotikumok jelenlétében:

	Törzsoldat	Alkalmazott koncentrációk
Glicerol	87 % (steril)	8% m/V
		10% m/V
		12% m/V
NaCl	-	1 M
		1,5 M

Növekedési képesség vizsgálata oxidatív stresszor jelenlétében:

	Törzsoldat	Alkalmazott koncentrációk
H₂O₂	10 %	5 mM
		10 mM

Növekedési képesség vizsgálata különböző sejtfal stresszorok jelenlétében:

	Törzsoldat	Alkalmazott koncentrációk
Koffein	70 mM (steril)	12,5 mM
		15 mM
		17,5 mM
Kalkofluor fehér (KF)	10 mg/ml (steril)	10 µg/ml
		25 µg/ml
		50 µg/ml
Kongó vörös (KV)	10 mg/ml (steril)	10 µg/ml
		25 µg/ml
	-	50 µg/ml
		75 µg/ml

Növekedési képesség vizsgálata membránkárosító stresszor jelenlétében:

	Törzsoldat	Alkalmazott koncentrációk
SDS	20 %	0,02 % m/V
		0,04 % m/V
		0,06 % m/V

5.1.4. Antifungális szerek

	Gyártó	Oldószer
Amfotericin-B	BioChemica	DMSO
Flukonazol	Sigma-Aldrich	MilliQ desztillált víz
Posakonazol	Sigma-Aldrich	DMSO
Vorikonazol	Sigma-Aldrich	DMSO
Anidulafungin	Sigma-Aldrich	DMSO
Caspofungin	Sigma-Aldrich	MilliQ desztillált víz
Mikafungin	Sigma-Aldrich	MilliQ desztillált víz

5.1.5. Felhasznált fluoreszcens festékek, antitestek és inhibitorok

Sejtfal festés:

Kalkofluor-fehér (Sigma-Aldrich)

ConA-FITC (Concanavalin A- Fluorescein Isothiocyanate) (Invitrogen)

WGA-TRITC (Wheat Germ Agglutinin- Tetramethylrhodamine Conjugate) (Invitrogen)

IgG Fc (humán): Dectin-1 (egér) antitest (AdipoGen)

Alexa Fluor 647- konjugált anti- humán IgG Fc antitest (Invitrogen)

Efflux aktivitás:

Nílus vörös (InvitroGen)

Enniatin A (Sigma-Aldrich)

Fagocitózis:

Alexa Fluor 488 szukcinimidil észter festék (1 mg/ml) (Life Technologies)

BCY1 funkcionális vizsgálata:

Rapamycin (Cayman Chemical)

XTT (Invitrogen)

5.1.6. Felhasznált sejtvonalak

A fagocitózis vizsgálatokhoz J774.2 sejtvonalat használtuk, amely nőstény BALB/c egerek szilárd tumoros elváltozásából izolált monocita/makrofágszerű sejtvonal.

5.1.7. Felhasznált primerek listája

	Forward primer (5'-3')	Reverz primer (5'-3')
ACT1	GAAGGAGATCACTGCTTTAGCC	CTGTGTGGATTGGTGGCTC
CDR1	GGGCTGGAAGTGCAAGATTCC	CATCAAGCAAGTAGCCACCG
SNQ2a	GATGTTCAATCAGCTGCGGTG	GGCATCAAGCTCACAGGTTGA
SNQ2b	GGCAATTTCAACACGCCGCTG	GGGCGTCTCCTTCGAAGACC
MDR1	GAGAGACGAGCCCCAGCC	GAAGTATGATGGCGGGTGCC
TPO3	GCCAGACATCAACATGCCTCC	GAGAATCGGGCGTGTGAAGT
ALS3	GGCACAACCACCGCTTACAC	CGTGAGGAGTGGTGTGGCC
SSA2	GTATCCCACCAGCCCCAAG	CCGGTACCCTTCTCCAAAGC

5.1.8. *In vivo* kísérletben alkalmazott egerek

In vivo kísérleteinket 8-10 hetes nőstény BALB/c egerek (*Mus musculus*) felhasználásával hajtottuk végre. Az azol típusú antifungális szerekkel evolváztatott gombatörzsekkel történő fertőzéshez a BALB/c egértörzsek az ELKH Szegedi Biológiai Kutatóközpont állatházából kerültek beszerzésre. A további gombatörzsekkel végzett fertőzésekhez az állatokat a Charles River Laboratories biztosította. A kísérleti állatokat a következő körülmények között tartottuk: ketrecenként 4-5 egyed, 12 órás fény, illetve sötét ciklusok fenntartása, állandó 24°C hőmérséklet, kukoricacsutka granulátum alom (REHOFIX), illetve igény szerint hozzáférhető *ad libidum* elérhető ivóvíz és autoklávozható laboratóriumi rágcslótáp (VRF1). Az állatok környezetének gazdagítása céljából papír hengereket használtunk.

5.2. MÓDSZEREK

5.2.1. Felhasznált gombatörzsek fenntartása és tenyésztése

A kísérletekhez használt *C. auris* klinikai izolátumokat, penicillin- sztreptomicin keverékével kiegészített szilárd YPD táptalajon, havi frissítési ciklusok mellett, 4°C-on tartottuk fenn. A létrehozott rezisztens törzsek fenntartásához a szilárd táptalajt a mikroevolúció során használt antifungális szerrel egészítettük ki.

A kísérleteket megelőzően a felhasznált gombatörzseket 5 ml folyékony, penicillin- sztreptomicin keverékével kiegészített YPD tápoldatot tartalmazó steril centrifugacsövekbe oltottuk, majd 30°C-on 200 rpm rázatás mellett 24 órán keresztül inkubáltuk. A gombaszuszpenzióból ezt követően 150 µl mennyiséget 5 ml friss tápoldatba oltottunk át és a korábbiakkal megegyező feltételek mellett, további 16 órán keresztül inkubáltuk a mintákat, így szinkronizálva a gombasejtek életciklusát. A kísérlet napján a gombasejteket centrifugálással gyűjtöttük össze (2400 x g, 5 perc) és három alkalommal 1 ml 1x PBS pufferrel mostuk. Az egyes kísérletekhez használt gombaszuszpenziók sejtszámát Bürker kamra segítségével állítottuk be.

5.2.2. Antifungális érzékenység meghatározása

A *C. auris* törzsek antifungális érzékenységének vizsgálatát mikrodilúciós teszt segítségével, a National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) M27-A3 protokoll, illetve ennek S4 kiegészítése szerint hajtottuk végre. Referenciaként a *C. parapsilosis* ATCC 22019, és a *C. krusei* ATCC 6258 törzseket használtuk. Amennyiben szükséges volt, a szabvány protokollban foglaltakhoz képest megnöveltük a felhasznált antifungális szer koncentrációját, hogy az alkalmas legyen a létrehozott evolvált törzsek vizsgálatára (2. táblázat).

2. táblázat MIC érték meghatározásának koncentrációtartománya

Antifungális szer	Legmagasabb koncentráció	Legalacsonyabb koncentráció
Amfotericin B	16 µg/ml	0,03125 µg/ml
Flukonazol	512 µg/ml	1 µg/ml
Posakonazol	32 µg/ml	0,0625 µg/ml
Vorikonazol	32 µg/ml	0,0625 µg/ml
Anidulafungin	16 µg/ml	0,03125 µg/ml
Caspofungin	16 µg/ml	0,03125 µg/ml
Mikafungin	16 µg/ml	0,03125 µg/ml

Az egyes antifungális szerek legmagasabb koncentrációjából kiindulva 10 tagú hígítási sort készítettünk RPMI 1640-MOPS tápoldatban. Az egyes hígítási tagokból 100 µl-t 96 minta férőhelyes sejttenyésztő lemezekbe mértünk soronként. A *C. auris* törzsek előkészítése után a megfelelő gombasejtmennyiséget (3×10^3 sejt) szintén RPMI 1640-MOPS tápoldatban a sejttenyésztő lemezek első 11 oszlopába mértük. A sejttenyésztő lemez első tíz oszlopa így tartalmazta az antifungális szerek csökkenő koncentrációjával kezelt *C. auris* sejteket, a 11. oszlopba pozitív kontrollként csak a gombasejteket tartalmazó tápoldatot mértük, míg az utolsó oszlop kizárólag tápoldatot tartalmazott. A mikrotiter lemezeket 30°C-on inkubáltuk, majd összeállításukat követően 24 és 48 órával szemrevételezéssel értékeltük az eredményeket. A MIC értékét amfotericin B és echinokandinok esetében 90%-os, azolok esetében a növekedési képesség 50%-os csökkenésénél határoztuk meg. Az antifungális rezisztencia megállapításához az amerikai Betegségmegelőzési és Járványügyi Központ (CDC) által javasolt *C. auris*-ra vonatkoztatott határértékeket vettük alapul (<https://www.cdc.gov/fungal/candida-auris/c-auris-antifungal.html>), amelyet más tanulmányok alapján egészítettünk ki (3. táblázat)⁶¹. Minden törzs esetében három technikai párhuzamossal dolgoztunk. Az antifungális érzékenység meghatározását két független ismétléssel hajtottuk végre.

3. táblázat Javasolt rezisztencia határértékek *C. auris* esetén

Antifungális szer	Rezisztencia határérték (µg/ml)
Amfotericin-B	≥ 2
Flukonazol	≥ 32
Második generációs triazolok	≥ 1*
Anidulafungin	≥ 4
Caspofungin	≥ 2
Mikafungin	≥ 4

* nincs CDC által meghatározott MIC javaslat, így egyéb tanulmányokban meghatározott határértéket használtunk

5.2.3. Evolvált törzsek létrehozása

Az evolvált *C. auris* törzsek létrehozásához egy már *C. parapsilosis*-ban eredményesen alkalmazott *in vitro* mikroevolúciós eljárást alkalmaztunk^{276,280}. A módszer alapjául két, a vizsgált

antifungális szerek mindegyikére érzékeny *C. auris* izolátumot (0381, 0387) alkalmaztunk. A törzsekre ezt követően külön-külön hosszú távú szelekciós nyomást gyakoroltunk a következő antifungális szerek jelenlétével: amfotericin B, flukonazol, posakonazol, vorikonazol, mikafungin. A kezdeti és végső antifungális szer koncentrációkat a 4. táblázat tartalmazza. Mind a 0381, mind a 0387 izolátumból kiindulva, steril centrifugacsövekben 5 ml folyékony YPD/PS tápoldatban öt különálló sejt kultúrát mértünk össze, melyek optikai denzitását (OD) 600 nm-en 0,1-re állítottuk. A kultúrákat ezt követően 10 órán keresztül 30°C-on rázatva (200 rpm) inkubáltuk. A növesztést követően a gomba szuszpenziókhoz az izolátumok MIC értékeinek felével megegyező koncentrációban antifungális szert adtunk (4. táblázat). A mintákat ezt követően újabb 14 órán keresztül, a korábbiakkal megegyező feltételek mellett inkubáltuk. A gombasejteket centrifugálással gyűjtöttük össze (2400 x g, 5 perc), majd 5 ml friss, a korábbi koncentrációval megegyező mennyiségű antifungális szerrel kiegészített tápoldatban további 24 órán keresztül, 30°C-on rázatva inkubáltuk. Az tápoldat frissítését további 2 alkalommal ismételtük meg. A kísérlet összeállítását követő negyedik napon a sejt kultúrák optikai denzitását 5 ml friss YPD/PS tápoldatban újra 0,1-re állítottuk és az előző napokban használt mennyiségű antifungális szert adtunk hozzájuk. A tenyészeteket ezt követően 10 órán keresztül növesztettük, majd a korábbival megegyező koncentrációban mértük hozzá az egyes antifungális szereket, ezzel duplázva a koncentrációjukat. Az újabb 14 órás inkubációs idő leteltével a gombasejteket ismételten centrifugálással gyűjtöttük össze, majd a már duplázott antifungális szer mennyiséggel kiegészített tápoldatban vettük fel őket. A mintákon ezután három alkalommal 24 órás periódusokban cseréltük az antifungális szerrel kiegészített tápoldatot, majd a negyedik napon újra dupláztuk az antibiotikumok koncentrációját. A négy napos duplázási ciklusokat addig ismételtük, míg el nem értük az előre meghatározott végső antifungális szer koncentrációt (4. táblázat). A gombatenyészetekből ezt követően 50 µl-t, antimikotikummal kiegészített szilárd YPD/PS táptalajra szélesztettük és 48 órán keresztül 30°C-on inkubáltuk. A közvetlenül a mikroevolúciós kísérletből származó törzseket az adott antifungális szerre nézve adaptált törzseknek tekintettük (AMB^{adp}, FLU^{adp}, POS^{adp}, VOR^{adp}, MICA^{adp}). Hogy biztosítsuk a mikroevolúció stabilitását az adaptált törzseket 5 ml kiegészítetlen YPD/PS tápoldatba oltottuk és rázatás (200 rpm) mellett 24 órán keresztül 30°C-on növesztettük őket. A tenyészetekből ezt követően 100 µl-t friss tápoldatba oltottunk át és a korábbiakhoz hasonlóan inkubáltuk. Az átoltást további nyolc alkalommal ismételtük meg, majd a gombaszuszpenziókból 50 µl-t szilárd tápoldatra szélesztettünk. A 48 órás 30°C-on történő inkubációt követően az így létrehozott *C. auris* törzsekre a továbbiakban evolált törzsként (AMB^{evo}, FLU^{evo}, POS^{evo}, VOR^{evo}, MICA^{evo}) hivatkoztunk.

4. táblázat *In vitro* mikroevolúció során használt kezdeti és maximális antifungális szer koncentrációk

	Kezdeti koncentráció (µg/ml)		Maximális koncentráció (µg/ml)
	<i>C. auris</i> 0381	<i>C. auris</i> 0387	<i>C. auris</i> 0381/ <i>C. auris</i> 0387
Amfotericin-B	0,125	0,125	8
Flukonazol	2	2	512
Posakonazol	0,03125	0,125	32
Vorikonazol	0,015	0,015	32
Mikafungin	0,0625	0,25	16

5.2.4. Törzsek általános növekedési képességének meghatározása

A *C. auris* törzseket az 5.2.1. pontban leírtak szerint készítettük elő. A kísérlet során használt 10^4 sejt/200 µl sejtkoncentrációjú szuszpenziókat YPD/PS tápoldatban mértük össze. A törzsek növekedését 96 férőhelyes sejtenyésztő edényben monitoroztuk 48 órán keresztül, állandó hőmérsékleten, amely során óránként optikai denzitást mértünk 600nm-en. A növekedési görbéket tizenegy technikai párhuzamos átlagértékeiként ábrázoltuk. A vizsgálatot mind 30°C-on, mind 37°C-on, három független alkalommal ismételtük meg.

5.2.5. Evolvált törzsek abiotikus stressz toleranciájának meghatározása

Az előkészített (5.2.1.) törzsek sejtkoncentrációját 1x PBS pufferben 2×10^6 sejt/ml-re állítottuk be. Az így elkészített szuszpenziókból kiindulva három tagú 10x-es hígítási sort készítettünk, amellyel további 2×10^5 -, 2×10^4 - és 2×10^3 sejt/ml koncentrációjú sejtsuszpenziót hoztunk létre. Ezen sejtsuszpenziókból 5 µl mennyiséget cseppentettünk a kiegészítetlen YPD/PS-, illetve különböző abiotikus stresszorokkal kiegészített szilárd YPD/PS táptalaj felületére. A Petri csészéket 48 órán keresztül inkubáltuk mind 30°C, mind 37°C-os hőmérsékleten. Az alkalmazott szubjektív pontozási rendszerben a létrehozott evolvált törzseket minden esetben az alapjukat képző klinikai izolátumhoz hasonlítottuk, számításba véve a kiegészítetlen táptalajon megfigyelt osztódási kapacitás különbséget. Kísérleteinket mindkét vizsgált hőmérsékleten legalább két független alkalommal ismételtük meg.

Egyes törzsek esetében a genom szekvenálás eredményei szükségessé tették további kondíciók bevonását is kísérleteinkbe. Az azolok jelenlétében létrehozott törzsek rapamicin érzékenységének vizsgálatához a sejtsuszpenziók koncentrációját 10^6 sejt/ml-re állítottuk be folyékony YPD/PS tápoldatban. A legmagasabb vizsgált rapamicin mennyiségből YPD/PS tápoldatban (1000 ng/ml) 10 tagú felező hígítási sort készítettünk (1,95ng/ml). Az így elkészített hígítási tagokból 100 µl-t 96 mintahelyes sejtenyésztő lemezbe mértünk. A 11. oszlop rapamicin kiegészítés nélkül tartalmazta a gombasejteket, illetve a gátlószer felvételéhez használt oldószert (steril DMSO). A tenyésztőlemez 12. oszlopába

rapamicinnel kiegészített folyékony YPD/PS tápoldatot mértünk. A törzsek stresszorra adott válaszát 48 órán keresztül vizsgáltuk óránkénti OD_{600nm} méréssel 30°C és 37 °C-on. A 24-, 36- és 48 óra után mért értékeket további analízisnek vetettük alá. A növekedési képesség meghatározásához a rapamicinnel kezelt törzsek OD_{600nm} értékeit a gátolószeret nem tartalmazó minták értékeire normalizáltuk. Mindkét vizsgált hőmérsékleten három független kísérletet állítottunk össze, két technikai párhuzamosban. A kapott adatokat Graph Pad Prism 7 szoftver segítségével értékeltük ki.

5.2.6. Sejtfal összetételének meghatározása fluoreszcens festés segítségével

Az előkészített (5.2.1.) gombasejteket centrifugálással gyűjtöttük össze (2400 x g, 5 perc), majd a pelletet 200 µl, 1% BSA-val kiegészített 1x PBS oldatban szuszpendáltuk fel. A mintákat 30°C-on 30 percen keresztül folyamatos mozgatás mellett inkubáltuk. A gombasejteket ezt követően két alkalommal 1x PBS pufferrel mostuk majd 100 µl 1% BSA-val kiegészített 1x PBS-ben szuszpendáltuk fel, mely az egyes sejtfalkomponensek detektálására használt fluoreszcens festékeket a következő koncentrációban tartalmazta: 8 µl 2,5 mg/ml ConA-FITC (Concanavalin A), 1 µl 1mg/ml CW (Calcofluor White), 1 µl 1mg/ml WGA-TRITC (Wheat Germ Agglutinin). A mintákat 30 percen keresztül 30°C-on rázatva inkubáltuk a festékek jelenlétében. A festést követően a gombasejteket háromszor mostuk 100 µl 1x PBS hozzáadásával majd ugyanennyi pufferben szuszpendáltuk fel. A festett mintákat képképző áramlási citométer (Amnis FlowSight) és fluoreszcens mikroszkópia (Zeiss Observer Z1) segítségével vizsgáltuk.

A sejtfalban lévő β-glükán mennyiségének meghatározására a *C. auris* sejteket 100 µl FCB (flow cytometry blocking) pufferben 30 percig rázatva inkubáltuk 30°C-on, majd 200 µl jéghideg FCW (flow cytometry washing) oldattal mostuk három alkalommal. Majd a sejteket 800 x g-n 2 percig centrifugáltuk. A mintákat ezt követően 100 µl FCB oldatban szuszpendáltuk, mely 1 µg/ml mennyiségben tartalmazott IgG Fc (humán): Dectin-1 (egér) antitestet. A sejtszuspenziókat 60 percen keresztül jégen inkubáltuk. Három, 200 µl FCB pufferrel történő mosást követően a mintákhoz 100 µl Alexa Fluor 647- konjugált anti- humán IgG antitestet 1:200 arányban tartalmazó hideg FCB oldatot adtunk, majd 45 percig jégen inkubáltuk. Újabb háromszor ismételt mosási lépés után (200 µl FCW; 800 x g, 2 perc) a mintákat 50 µl 1x PBS-ben szuszpendáltuk fel majd képképző áramlási citometria (Amnis FlowSight) segítségével vizsgáltuk. A mintákat a fluoreszcens festést követően óvtuk a közvetlen fénytől, és a kísérletet is alacsony fényintenzitású helyen végeztük. A citometriás mérések során 10⁴ gombasejt fluoreszcens festődési intenzitását vizsgáltuk. Az eredmények analíziséhez az IDEAS 6.2 szoftvert használtuk. A sejtfal festődését minden törzs esetében legalább három független kísérletben vizsgáltuk.

5.2.7. Szterol összetétel meghatározása analitikai módszerekkel

A *C. auris* sejteket 30°C-on folyékony YPD/PS tápoldatban, rázatás mellett növesztettük 24 órán keresztül. A sejteket centrifugálással gyűjtöttük össze majd 1x PBS puffer segítségével mostuk egy alkalommal. A sejtuszpenziókból 200 µl-t, 30 ml friss YPD/PS tápoldatba mértünk át, majd a korábbiakhoz hasonló feltételek mellett inkubáltuk egy éjszakán át. Másnap a mintákat 2 alkalommal 1x PBS segítségével mostuk, majd 4 ml YPD tápoldatban szuszpendáltuk fel a pelletet. Kezeletlen minták esetében ebből a szuszpenzióból 200 µl-t 5 ml kiegészítetlen YPD/PS tápoldatba mértünk. Az antifungális szerrel kezelt törzsek esetében a mikroevolúció végén elért maximális antibiotikum koncentráció felét használtuk (FLU: 256 µg/ml, POS: 16 µg/ml, VOR: 16 µg/ml, MICA: 8 µg/ml). A kezelés összeállítása során az antimikotikumok jelenlétében szelektált törzsekből készült sejtuszpenziókból szintén 200 µl-t, míg a klinikai izolátumok szuszpenzióiból 1 ml-t adtunk a megfelelő kiegészített tápoldatokhoz. A kezelt és kezeletlen mintákat 30°C-on, 200 rpm-es rázatás mellett 16 órán keresztül inkubáltuk. Ezt követően 3 alkalommal 1x PBS puffer segítségével mostuk a gombasejteket, majd -80°C-on fagyasztottuk. A minták további előkészítését, illetve a szterol összetétel meghatározását Dr. Varga Mónika és munkatársai (SZTE-TTIK Mikrobiológiai Tanszék) végezték el.

A fagyasztott minták liofilizálását követően, 10 mg mennyiség került szappanosításra 2 ml metanolban feloldott 10%-os KOH segítségével (80°C, 90 perc). A lehűtött mintákat ezt követően 500 µl víz és 1 ml *n*-hexán keverékével vortexeltük fel (30 másodperc). A fázisokat centrifugálással szeparáltuk (4500 x g, 5 perc), majd a szterolokat tartalmazó *n*-hexán fázist sötét üvegfiolában áramló N₂ segítségével szárítottuk be. Az *n*-hexán extrakciót két alkalommal ismételtük meg. Ezt követően a beszáradt mintákat 300 µl metanolban oldottuk be, majd 0,2 µm pórusűrűségű politetrafluoroetilén membránon szűrtük át, mielőtt mintánként 5 µl-nyi mennyiség LC-MS (liquid chromatography-mass spectrometry; folyadék kromatográfia-tömeg spektrometria) rendszerbe került injektálásra.

A minták analíziséhez DionexUltimate 3000 UHPLC rendszerrel kapcsolt Q Exactive Plus hybrid quadrupole-Orbitrap tömegspektrometriás készüléket használtunk APCI ionforrással, pozitív ion módban. A komponensek elválasztása izokratikus elúcióval történt Gemini NX C18 oszlopon (150 x 2, 3µm). Az eluálást metanol/víz keverékével végeztük (95/5, V/V%), 25°C hőmérsékleten, 0,3 ml/min áramlási sebesség mellett. A méréseket *m/z* 50-550 tartományban „full scan” üzemmódban futtattuk le.

5.2.8. Efflux pumpák aktivitásának vizsgálata fluoreszcens jelölés segítségével

Az efflux pumpák aktivitását Nílus Vörös redukciós eljárással vizsgáltuk. Ehhez a sejt koncentrációt 3x10⁷/300 µl-re állítottuk be 1x PBS-ben. A sejtekhez ezt követően az efflux folyamatok gátlásához 50 µM enniatin és 10 mM nátrium-azid keverékét adtuk. A mintákat 1 órán át, 37°C-on inkubáltuk, majd 1x PBS-sel háromszor mostuk (2400 x g, 5 perc). Ezután a sejteket 300 µl, 10 µM Nílus Vörös fluoreszcens festékkel kiegészített 1x PBS-ben vettük fel. A sejteket 1 órán keresztül

37°C-on inkubáltuk, majd a festéket újabb mosási lépésekkel eltávolítottuk. A sejtszuszpenziókból a 0 perces mérésekhez 50 µl-t eltávolítottunk, amelyeket a képképző áramlási citometriás (Amnis FlowSight) mérésekig jégen tároltunk. A sejtszuszpenziók fennmaradó részét centrifugálással ülepítettük, és a pelletet az efflux folyamatok újraindításához 2% glükózt tartalmazó 1x PBS pufferben szuszpendáltuk. Ezt követően minden 30. percben 50 µl-nyi mennyiséget távolítottunk el a mintákból, amelyeket kétszer 1x PBS-sel mostunk és további felhasználásukig jégen tartottunk. Az áramlási citometriás mérések során minden időpontban 2×10^4 gombasejt fluoreszcens intenzitását mértük. Minden törzs esetén három független kísérletet végeztünk. Az adatok kiértékelését IDEAS 6.2 szoftver és a FlowJo 7.6.5 szoftver segítségével végeztük. A statisztikai szignifikancia mértékét Mann-Whitney teszt segítségével határoztuk meg. Az eredményeket szignifikánsnak tekintettük amennyiben a p-érték < 0.05 .

5.2.9. A törzsek biofilmképző képességének vizsgálata XTT redukciós próbával

A *C. auris* sejtek előkészítését (5.2.1.) követően a sejtkoncentrációt 10^6 sejt/ml-re állítottuk be RPMI-1640 tápoldatban. A sejtek szuszpenziójából 100 µl mennyiséget (10^5 sejt) 96 mintahelyes sejtenyésző lemezekben vizsgáltuk, gombatörzsneként legalább 9 technikai párhuzamossal. A mintákhoz 100 µl RPMI-1640 tápoldatot adtunk. A kísérlettől függően a lemezeket 24-, vagy 48 órán keresztül inkubáltuk, 37°C-on 5% CO₂ koncentráció mellett. A biofilm képzést követően a lemezeket mintahelyenként 100 µl 1x PBS segítségével kétszer mostuk, ezzel eltávolítva a planktonikus sejteket. A mintákra ezt követően 100 µl XTT oldatot mértünk, amit 10 mM menadionnal egészítettünk ki. A kísérletekhez festetlen és sejtmentes kontrollt alkalmaztunk. A mikrotiter lemezeket fénytől védve, 3 órán keresztül inkubáltuk 37°C-on állandó 5%-os CO₂ koncentráció mellett, majd 80 µl felülúszót új tenyésztőlemezbe mértünk és 490 nm-en spektrofotométer segítségével mértünk abszorpciót. Kísérleteinket mindkét vizsgált időpontban három biológiai párhuzamossal végeztük. Az adatokat GraphPad Prism 7 szoftver segítségével elemeztük, Mann-Whitney tesztel, előre meghatározott szignifikancia érték ($p < 0,05$) mellett.

5.2.10. RNS izolálás

A valós idejű kvantitatív RT qPCR-en alapuló génexpressziós vizsgálatokhoz a gombatörzsekből totál RNS-t izoláltunk. A nukleinsavakat RiboPure RNA Purification Kit (yeast) (Ambion) segítségével vontuk ki, majd tisztításukat Qiagen RNAase-free DNAase set segítségével végeztük el. Az RNS kivonáshoz a gyártó által meghatározott protokoll módosított változatát alkalmaztuk. A szinkronizált sejtciklusú, 1x PBS-sel mosott gombasejtekre 240 µl lízis puffer, 24 µl 10% SDS és 240 µl fenol:kloroform:izoamil alkohol keverékét mértük. A szuszpenziókhöz cirkónia gyöngyöket adtunk, majd a sejteket erőteljes vortexelés mellett tártuk fel. A fázisszeparáció után (16100 x g, 5 perc), a vizes

fázisban található RNS-ekhez 840 µl Binding puffert és 570 µl abszolút etanolt adtunk és nukleinsav kötő oszlopra vittük fel (Filter Cartridge) őket. Az oszlopokat 3 alkalommal mostuk (Wash Solution 1, Wash Solution 2/3), majd 50 µl-ben eluáltuk. A DNáz kezeléshez a mintákhoz 6 µl 10x DNáz I puffert, illetve 4 µl DNáz I enzimet mértünk, és 45 percig 37°C-on inkubáltuk őket. A reakciót ezt követően 6 µl inaktivációs reagens hozzáadásával, 5 perc szobahőn történő inkubálással állítottuk le. A mintákat 16200 x g fordulaton centrifugáltuk 3 percig, majd a keletkezett felülúszóból 50 µl-t új mikrocentrifuga csövekbe mértünk. Ezt követően a mintákhoz 600 µl 1% β-merkaptóetanollal kiegészített RLT puffert adtunk, majd a genomi DNS-t megkötő oszlopokra (gDNA Eliminator spin column) mértük őket. Centrifugálást követően (8000 x g, 3 perc) az átfolyóhoz térfogatnyi 70%-os etanolt adtunk, majd az elegyet RNS kötő oszlopra (RNeasy Mini spin column) vittük fel. Az oszlopot 350 µl RW1 puffer hozzáadásával mostuk, majd 10 µl DNáz I enzim és 70 µl RDD puffer keverékét pipettáztuk rá. A mintákat 15 percen keresztül inkubáltuk szobahőmérsékleten. Ezt követően először 350 µl RW1 puffer, majd kétszer 500 µl RPE puffer segítségével mostuk az oszlopokat. A tisztított RNS-t 35 µl eluáló puffer hozzáadásával nyertük vissza az oszlopról, majd további felhasználásig -80°C-on tároltuk. A minták DNS mentességét NanoDrop mikrocseppes spektrofotométer, illetve RT-qPCR segítségével ellenőriztük.

5.2.11. cDNS szintézis

A reverz-transzkripcióhoz RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit-et (Thermo Scientific) használtunk, a gyártó ajánlásainak megfelelően. A minták RNS koncentrációját NanoDrop mikrocseppes spektrofotométer segítségével határoztuk meg, majd a cDNS szintézishez szükséges 500 ng RNS mennyiséget nukleáz mentes vízzel történő hígítással állítottuk be. A reakció során a következő körülményeket alkalmaztuk:

cDNS szintézis 1. lépés:	65°C	5 perc
	4°C	5 perc
cDNS szintézis 2. lépés:	25°C	5 perc
	42°C	60 perc
	70°C	5 perc

5.2.12. Kvantitatív valós-idejű PCR

A génexpressziós vizsgálatokhoz Luna Universal qPCR Master Mix-et (NEB) használtunk a gyártó utasításainak megfelelően. A RT-qPCR reakciókat 25x-ös hígított cDNS minták és 300 nM koncentrációjú génspecifikus primerek (5. táblázat) segítségével állítottuk össze. A *C. auris*-ban kiválasztott géneket *C. albicans*-ban és *S. cerevisiae*-ben megtalálható ortológjaik alapján határoztuk meg, amelyhez a www.candidagenome.org adatbázist használtuk²⁹². Belső kontrollként a *C. auris* aktin fehérjéjét kódoló gént, az *ACT1*-et alkalmaztuk. RT-qPCR méréseinket CFX96™ Real-Time System

detektorral felszerelt C1000 Thermal Cycler készülék (BioRad) segítségével végeztük. A termékek olvadási görbéit 65-95°C hőmérséklettartományban, 0,5 °C-os lépésenként rögzítettük.

Alkalmazott reakciókörülmények:

- | | | |
|-------------------------|---------|--------------------------|
| 1. Elődenaturáció | 95°C | 3 perc |
| 2. Denaturáció | 95°C | 10 másodperc |
| 3. Annealing- elongáció | 60°C | 30 másodperc |
| 4. Melting analízis | 65-95°C | 5 másodperc (0,5 °C/ mp) |

A 2-3. lépések 40 cikluson keresztül ismétlődtek. A génexpressziós értékeket $2^{-\Delta\Delta C_t}$ módszer segítségével számítottuk ki²⁹³.

5. Táblázat A *C. auris* esetében vizsgált efflux pumpák ortológjai

	<i>C. auris</i> gén azonosító	<i>S. cerevisiae</i> ortológ	<i>C. albicans</i> ortológ
ABC transzporterek			
CDR1	B9J08_000164	PDR5	CDR1
SNQ2a	B9J08_001125	SNQ2	SNQ2 (orf19.5759)
SNQ2b	B9J08_004452	SNQ2	SNQ2 (orf19.5759)
MFS transzporterek			
MDR1	B9J08_003981	FLR1	MDR1
TPO3	B9J08_004775	TPO2	TPO3

5.2.13. Minták előkészítése teljes genom szekvenáláshoz

A teljes genom szekvenáláshoz a klinikai izolátumokból, illetve a létrehozott törzsekből totál DNS-t vontunk ki. Ehhez 2 ml 1% penicillin- sztreptomycin keverékével kiegészített folyékony YPD tápoldatba oltottuk és egy éjszakán át 30°C-on rázatva (200 rpm) inkubáltuk a törzseket. A sejteket centrifugálással gyűjtöttük össze (2400 x g, 5 perc) majd a felülúszó eltávolítása után a pelletet 500 µl lízis pufferben szuszpendáltuk fel. A mintákhoz ezt követően 0,25-0,5 mm mérettartományba eső üvegyöngyöket adtunk, majd a mintákat 3 percen keresztül erőteljesen ráztattuk. A sejtek feltárását követően a mintákhoz 270 µl ammónium-acetátot adtunk, majd 65°C-on 5 percig inkubáltuk őket. A mintákat ezt követően 5 percig jégen hűtöttük, majd 500 µl kloroform-izoamil alkohol 24:1 keverékét mértük hozzájuk és 10 percig 16200 x g-n centrifugáltuk. A felső vizes fázist új mikrocentrifuga csövekbe mértük majd 1:1 arányban izopropanolt adtunk a mintákhoz. A csöveket ezt követően 45 percig -20°C-on inkubáltuk, majd centrifugáltuk (16200 x g, 10 perc). A felülúszó eltávolítása után a mintákat 500 µl 70%-os etanollal mostuk (16200 x g, 5 perc). A pelletet ezt követően szobahőmérsékleten szárítottuk, majd 25 µl 1xTE oldatban szuszpendáltuk fel. A mintákat felhasználásig -20°C-on tároltuk.

5.2.14. Teljes genom szekvenálás analízise

A minták teljes genom szekvenálását a Novogene Co. Ltd. végezte. Minden törzs esetében a szekvenáláshoz három biológiai párhuzamost használtunk. A DNS minták koncentrációját és minőségét

agaróz gélen és Qubit 3.0 fluorométer segítségével ellenőriztük. A DNS könyvtár készítése a NEBNext DNA Library Prep Kit (NEB) segítségével a gyártó utasítása szerint történt. A szekvenálás Illumina platformon történt, két oldali szekvenálással PE150 bp mélységben.

A nyers adatok szekvenciává fordítása, illetve minőségének ellenőrzése CASAVA (1.8) szoftver segítségével történt. A kapott szekvenciaadatok referencia genomra történő térképezéséhez a BWA (0.7.8-r455) programot használtuk, a duplikátumokat SAMTOOLS (0.1.19-44428cd) segítségével távolítottuk el. A 0381 klinikai izolátum, illetve az ebből kiindulva generált rezisztens törzsek esetén az AMS301371v2 (GCA_003013715.2) nyíltan elérhető genomszekvencia szolgált referenciaként, míg a 0387 izolátum és asszociált törzseit a *Cand_auris_B8441_v2* (GCA_002759435.2) referenciára térképeztük. Az egyéni SNP variánsokat és InDel-eket (≤ 50 bp) SAMTools (0.1.19-44428cd); a strukturális variánsokat (SV) (>50 bp) BreakDancer (1.4.4) a szekvenciavariációkat (copy number variants- CNV) CNVnator (V0.3) programok segítségével azonosítottuk. Az azonosított változásokat ANNOVAR (2015Mar22) szoftver segítségével annotáltuk. A mutációk további vizsgálatát abban az esetben végeztük el, amennyiben azok a generált törzsek mindhárom biológiai párhuzamosában megjelentek és hiányoztak a kiindulási klinikai izolátumokból. Az aminosav változások funkcionális hatását a PROVEAN (Protein Variation Effect Analyzer) v1.1 szoftver segítségével prediktáltuk. A funkcióvesztéses mutációk azonosítására a program által alapértelmezett (-2,500) határértéket használtuk.

5.2.15. Minták előkészítése a metabolomikai és lipidomikai vizsgálatokhoz

A *C. auris* sejteket az 5.2.1. pontban leírtak szerint készítettük elő a kísérletekhez. Hogy biztosítsuk a tápoldat teljes eltávolítását, a mintákat négyszer 1x PBS segítségével mostuk, majd a felülúszó eltávolítása után a pelletet liofilizáltuk és -20°C -on tároltuk a mérésekig. A poláris és nem poláris metabolitokat két lépésben vontuk ki. A poláros metabolitok kinyeréséhez a mintákhoz $70\text{ }\mu\text{g/ml}$ ribitol-t tartalmazó metanol/víz (1/1) keveréket adtuk, majd 30 W-on 10 percig szonikáltuk őket. Vortexelést követően a feltárt sejteket centrifugálással ülepítettük ($15000 \times g$, 10 perc, 4°C) és a felülúszót üvegfialákba mértük át. $50\text{ }\mu\text{l}$ felülúszót N_2 áramoltatásával szárítottunk be, majd a GC-MS analízisre készítettük elő. A beszárított mintákat $20\text{ }\mu\text{l}$ piridinben oldott metoxiamin hidrokloriddal (20 mg/ml) kezeltük 30°C -on, 90 percig, majd $50\text{ }\mu\text{l}$ N-metil-N-trimetilszililtrifluoroacetamid-ot (MSTFA) adtunk hozzá és 40°C -on 30 percig inkubáltuk.

A pelletek kimaradó részéhez $0,1\text{ }\mu\text{g/ml}$ C17 szfingozint és C17 ceramidot tartalmazó diklórmetán/metanol (3/1) keveréket adtuk. A mintákat ezt követően 10 percig szonikáltuk, majd 90 másodpercig vortexeltük. A sejtörmeléket centrifugálással ($15000 \times g$, 10 perc, 4°C) ülepítettük majd a felülúszót elpárologtattuk. A beszárított mintákat Solvent „B” segítségével újra oldatba vittük, majd $15000 \times g$ -n 10 percig centrifugáltuk. A felülúszót ezt követően LC-HRMS segítségével vizsgáltuk.

5.2.15.1. Létrehozott törzsek metabolomikai vizsgálata (GC-MS)

Az előkészített mintákból 1 µl-es aliquotokat splitless mintabeviteli mód alkalmazásával fecskendeztünk a GC/MS rendszerbe, mely AOC 6000 (Shimadzu, Germany) automatikus mintavevő egységből, QP-2020 (Shimadzu, Germany) GC/MS rendszerből és 30m x 0,25mm x 1 µm DB 5-MS oszlopból (Agilent, USA) állt. A minták bejuttatása 280°C-on történt, míg az ionforrás 200°C-os hőmérsékleten lett alkalmazva. A hőkezelés 4 percig tartó 100°C-os kezeléssel kezdődött, majd a hőmérséklet percenként 4°C-t emelkedett míg a rendszer el nem érte a 320°C -t. A hélium konstans sebességgel (39 cm/perc) lineárisan áramlott a mérés során. A tömegspektrometriás mérések „scan” módban 45-600 *m/z* tartományban történtek. A rendszer vezérlése és az adatok analízise a GCMS Solution szoftver Acquisition and PosRun (Shimadzu, Germany) moduljának segítségével történt. Az egyes metabolitok beazonosítása a SmartMetabolite szoftver (Shimadzu, Germany) 3.1 verziójával történt. A minták előkészítését, illetve a mérés lebonyolítását Dr. Szekeres András és munkatársai (SZTE-TTIK, Mikrobiológiai Tanszék) végezték. A mérést minden törzs esetében három független párhuzamos bevonásával végeztük el. Az egyes metabolitok mennyiségét belső sztenderdhez viszonyítva állapítottuk meg. A bemutatott hőtérképen azt a 48 metabolitot ábrázoltuk, melyek mennyiségében, legalább egy vizsgált törzs esetében szignifikáns eltérést találtunk a sztenderdhez képest.

5.2.15.2. Létrehozott törzsek lipidomikai vizsgálata (UHPLC-HRMS)

A LC-HRMS mérések során a mintákat DionexUltimate 3000 UHPLC rendszerrel kapcsolt Q Exactive Plus hybrid quadrupole- Orbitrap tömegspektrométerrel analizáltuk, pozitív ionmódban. A metabolitokat Discovery HS C18 (3 µm, 150 x 2,1 mm) oszlop segítségével választottuk szét. Az apoláros metabolitok szeparálásához 0,1 % ecetsavat tartalmazó 5 mM ammónium-acetát (A) valamint 5mM ammónium-acetát és metanol/2-propanol (1/1) elegye (B) szolgált mozgófázisként. A lineáris gradiens 75% B oldattal kezdődött (3 perc), majd 35 perc alatt elérte a 100% B állapotot, amit 15 percig tartott meg. Az elegy eredeti összetételének visszaállása 1 perc alatt történt meg, majd 6 percig konstans maradt. Az áramlási sebesség 0,2 mL/perc volt, az oszlop hőmérsékletét 45°C-ra állítottuk. A mérés során 5 µl mintát elemeztünk.

A tömegspektrometriás mérések „full-scan/data-dependent MS/MS” módban történtek (teljes Ms/ddMS²). A mérések *m/z* 100-1200 tartományban történtek 70 000 felbontás mellett. Az LC-HRMS adatok regisztrálásához Trace Finder 4.0 szoftvert használtunk. A nyers adatok feldolgozása Compound Discoverer™ (2.1) szoftver segítségével történt. A minták előkészítését, illetve a mérés lebonyolítását Dr. Varga Mónika és munkatársai (SZTE-TTIK, Mikrobiológiai Tanszék) végezték.

A mérést minden törzs esetében három független párhuzamos bevonásával végeztük el. Az egyes lipidek mennyiségét belső sztenderdhez viszonyítva állapítottuk meg. A bemutatott hőtérképen azokat a

lipideket ábrázoltuk, melyek mennyiségében, legalább egy vizsgált törzs esetében szignifikáns eltérést találtunk a sztenderdhez képest.

5.2.16. *In vitro* fagocitózis vizsgálat

A szinkronizált gombatenyészeteket a mosási lépéseket (5.2.1.) követően 200 µl 1x PBS-ben szuszpendáltuk fel. A sejtes szuszpenzióhoz további 22 µl 1 M Na₂CO₃-t adtunk majd 4 µl Alexa Fluor 488 szukcinimidil észter (1 mg/ml) festéket használtunk jelölésükhöz. Fénytől elzártan 45 percen keresztül inkubáltuk a sejteket szobahőmérsékleten, majd a fluoreszcens festéket 1x PBS puffer segítségével négy mosási lépéssel (2400 x g, 5 perc) távolítottuk el. A gombaszuszpenziók sejtszámát Bürker kamra segítségével határoztuk meg. A J774.2 egér makrofágszerű sejtek koncentrációját szintén beállítottuk, majd a 2x10⁴ sejtet tartalmazó DMEM/FSB/PS tápoldatot, 12 férőhelyes sejtenyésző lemez mintahelyeibe mértük. A fagocitózis vizsgálatához, a fluoreszcensen jelölt gombasejteket az emlős sejtekhez képest ötszörös mennyiségben, 37°C-on, 5%-os CO₂ tenzió mellett ko-inkubáltuk J774.2 makrofágokkal. Az inkubációs idő letelte után a sejtenyésző lemezről eltávolítottuk a tápoldatot, majd a nem fagocitált gombasejtek eliminálása érdekében a mintahelyeket két alkalommal 600 µl hűtött 1x PBS pufferrel mostuk. A J774.2 sejteket 300 µl hideg 1x PBS segítségével erős pipettázás mellett mostuk fel a tenyésztőlemez aljáról és mikrocentrifuga csövekbe gyűjtöttük össze. A csöveket 800 x g-n 5 percig centrifugáltuk, majd a felülúszó eltávolítása után a pelleteket 50 µl 1x PBS-ben szuszpendáltuk és további felhasználásig jégen tároltuk. A fluoreszcencia intenzitás meghatározásához Amnis Flowsight képalkotó áramlási citométert használtunk. A mérési adatok kiértékelését IDEAS 6.2 szoftver segítségével végeztük el. Az *in vitro* fagocitózis kísérleteket minden gombatörzs esetében legalább két független alkalommal végeztük el.

5.2.17. *In vivo* egérfertőzési modell és a kolónia formáló egységek (CFU) kvantitatív meghatározása

A *C. auris* sejteket az 5.2.1. pontban leírtak szerint készítettük elő. A pontos gomba sejtszámot (10⁷ sejt/ml) 1x PBS pufferben állítottuk be. A kísérleti állatokat (BALB/c, 8-10 hét, nőstény) kaloda segítségével immobilizáltuk, majd laterális farokvénájukon keresztül, intravénásan (IV) fertőztük 100 µl gombaszuszpenzióval. A fertőzést követően az állatokat csoportonként, a környezettől izoláltan tartottuk és naponta szemikvantitatív állatjóléti pontrendszer alkalmazásával monitoroztuk. Amennyiben a kísérleti egyed jóléti pontszáma elérte az előre meghatározott maximum értéket, az adott állatot humánus végpont alapján termináltuk. Az általunk alkalmazott kísérleti rendszerben nem volt szükség egyetlen egyed idő előtti elaltatására sem.

A fertőzést követően az egyes kísérletekben megjelölt időpontokban a kísérleti állatokat a CO₂ szint fokozatos adagolásával túlaltattuk. Ezt követően kiválasztott szerveiket (lép, vese, máj, agy, egyes esetekben a szív) izoláltuk és meghatároztuk azok pontos tömegét. Az eltávolított szerveket 1x PBS-t

tartalmazó steril centrifugacsövekben homogenizáltuk. Az így nyert szuszpenziók mindegyikéből 100 µl-t szilárd YPD/PS táptalajra szélesztettük. Az agar lemezeket 48 órán keresztül 30°C-on inkubáltuk, majd a szervekből visszanyert gombatelepeket számszerűsítettük. Az egyes szervek kolonizáltságának mértékét úgy határoztuk meg, hogy a leszámolt gomba sejtszámot a hígítás mértékével beszorozva az adott szerv tömegére vonatkoztattuk (CFU/g). A fertőzési kísérletet minden gombatorzs esetében legalább két független alkalommal hajtottuk végre.

5.2.18. Statisztikai analízis

Adataink statisztikai analízisére, illetve a szignifikancia megállapítására GraphPad Prism 7.00 szoftvert használtunk. Kísérleti elrendezéstől függően, parametrikus eloszlású adatok esetén párosítatlan t-próbát, nem-parametrikus eloszlás esetén Mann-Whitney tesztet alkalmaztunk. Az egyes analízisek feltételeit az ábraalírásban rögzítettük. A statisztikai szignifikanciát minden esetben a következő p-értékek mellett határoztuk meg: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.005$; *** $p \leq 0.0005$; **** $p \leq 0.0001$.

5.2.19. Adatbázis hozzáférések

A létrehozott azol típusú antifungális szerekkel szemben rezisztens *C. auris* törzsek teljes genom szekvenálása során létrejövő nyers szekvencia adatok nyilvánosan elérhetőek a Nemzeti Biotechnológiai Információs Központ (NCBI) adatbázisából, a PRJNA843706 Biosample referenciaszámon. A hivatkozáson belül az egyes rezisztens törzsek hozzáférési számai a következőek: SAMN28766907 (0381 FLU^{evo}); SAMN28766908 (0381 POS^{evo}), SAMN28766909 (0381 VOR^{evo}), SAMN28766910 (0387 FLU^{evo}), SAMN28766911 (0387 POS^{evo}); SAMN28766912 (0387 VOR^{evo}); SAMN37453806 (B11220, 0381) és SAMN37453807 (B8441, 0387).

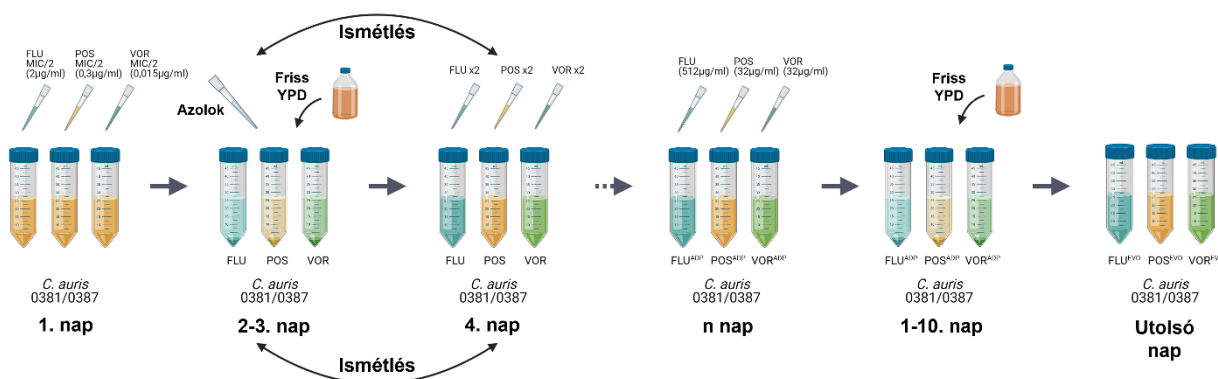
5.2.20. Etikai engedély

A dolgozatban szereplő állatkísérleteket a Szegedi Tudományegyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottság (1998, XXVIII; 40/2013), illetve az Európai Unió által előírt irányelvek (2010/63/EU) szerint hajtottuk végre. A kísérletek végrehajtásához szükséges engedélyt az Állatkísérleti Tudományos Etikai Tanács (XVI./03521/2011), illetve a Csongrád-Csanád Megyei Kormányhivatal Agrárügyi Főosztály Élelmiszerlánc-biztonsági és Állategészségügyi Osztály, a XX./511/2022. hivatkozási számon bocsátotta ki. Az állatkísérletek végrehajtásának helyszínéül a Szegedi Tudományegyetem TTIK (6726 Szeged, Közép fasor 52.) által fenntartott állatkísérleti létesítmény (XX./2018) szolgált.

6. Eredmények

6.1. Evolvált *C. auris* törzsek létrehozása

A hosszú távú *in vitro* mikroevolúciós kísérlethez két különálló kládból származó antifungális szerekkel szemben érzékeny izolátumot választottunk. A *C. auris* 0381 (AR Bank #0381, B11220 referencia törzs) az első Japánban beazonosított törzs, melyet fülvázadékból izoláltak, és a Klád II-be soroltak be. A *C. auris* 0387 törzs (AR Bank #0387, B8441) egy pakisztáni kórházban vett hemokultúrából származik és filogenetikailag a Klád I-be tartozik. A két izolátum folyadék kultúráját az 5.2.3. pontban leírtak szerint kezeltük az egyes antifungális szerek növekvő koncentrációjával (7. ábra). A maximális antibiotikum koncentráció elérése után, a csupán epigenetikai változásokon alapuló rezisztencia mechanizmusok kizárását, illetve a kialakult fenotípus stabilizálását folyamatos friss tápoldatra történő áttöltéssel értük el.



7. ábra

A rezisztens törzsek létrehozásához használt *in vitro* mikroevolúciós kísérlet fő lépéseinek sémája az azolokkal szemben evolválatott törzsek esetében

Az *in vitro* mikroevolúció során antifungális szerekkel szemben érzékeny *C. auris* törzseket kezeltük antifungális szerek (AMB, FLU, POS, VOR, MICA) növekvő koncentrációjával. A maximális antibiotikum koncentráció elérése után, az adaptált (adp) törzseket sorozatosan friss folyékony tápoldatra oltottuk stabilizálva a rezisztenciát, így létrehozva az evolvált törzseket (evo). FLU: flukonazol, POS: posakonazol, VOR: vorikonazol

6.2. Létrehozott rezisztens törzsek antifungális érzékenységének vizsgálata

A létrehozott törzsek antifungális érzékenységének vizsgálatát a CLSI M27-A3 szabvány protokoll S4 kiegészítése szerint hajtottuk végre, az 5.2.2. pontban meghatározott módosításokat figyelembe véve. Az antifungális rezisztenciát a CDC által megadott határértékek alapján határoztuk meg.

6.2.1. Amfotericin B rezisztens törzsek antifungális érzékenysége

A 0381 AMB^{ev} törzs a kiindulási klinikai izolátumhoz hasonló érzékenységi profilt mutatott, kivéve a 48 órás inkubáció után azonosított flukonazol rezisztenciát (6. táblázat). Az amfotericin B jelenlétében evolvált törzsek esetében kizárólag a 0387 AMB^{ev} törzs vált rezisztenssé a létrehozásához

használt antibiotikumra, és ez a fenotípus is csak 48 órás inkubációt követően volt megfigyelhető (7. táblázat). A rezisztencia kialakulásának hiánya ebben az esetben arra utal, hogy bár a gombasejtek képesek voltak túlélni a mikroevolúció során használt magas antifungális szer koncentrációt (8 µg/ml), a kialakult fenotípus nem volt képes stabilizálódni. Annak ellenére, hogy a szelekciós nyomás hiányában mindkét törzs visszanyerte antifungális érzékenységét, az amfotericin B magasabb MIC értéken volt képes növekedésüket meggátolni, ami feltételezi, hogy a szelekciónak volt hosszabb távú hatása a gombasejtekre.

A 0387 AMB^{evo} törzs esetében mind flukonazzal, mind vorikonazzal szemben keresztrezisztenciát tapasztaltunk, a posakonazol MIC értékeinek növekedése mellett. *Candida* fajokban az azol és polién típusú szerek közötti keresztrezisztencia egy ismert jelenség, ami visszavezethető arra, hogy mindkét antibiotikum gátló hatása a membrán ergoszterol tartalmához köthető.

6. táblázat Az antifungális érzékenység változása az amfotericin B jelenlétében szelektált, *C. auris* 0381 klinikai izolátumból származó törzsek esetében

Törzsek	MIC (µg/ml)													
	AMB		FLU		POS		VOR		AND		CAS		MICA	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h
<i>C. auris</i> 0381	0,375	0,75	4,5	12	0,0625	0,0625	0,0625	0,0625	0,03125	0,125	0,375	1	0,03125	0,03125
<i>C. auris</i> 0381 AMB ^{evo}	0,5	1	18	36*	0,0625	0,0625	0,09375	0,25	0,046875	0,046875	0,75	1	0,03125	0,046875

* rezisztencia határérték feletti MIC értékek

7. táblázat Az antifungális érzékenység változása az amfotericin B jelenlétében szelektált, *C. auris* 0387 klinikai izolátumból származó törzsek esetében

Törzsek	MIC (µg/ml)													
	AMB		FLU		POS		VOR		AND		CAS		MICA	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h
<i>C. auris</i> 0387	0,1875	0,5	1,5	8	0,0625	0,0625	0,0625	0,0625	0,078125	0,1875	0,5	0,75	0,03125	0,03125
<i>C. auris</i> 0387 AMB ^{evo}	1,5	3*	512*	512*	1,03125*	3*	12*	16*	0,0625	0,1875	1,25	3*	0,03125	0,03125

* rezisztencia határérték feletti MIC értékek

6.2.2. Triazol rezisztens törzsek antifungális érzékenysége

A triazol szelekció hatása jelentősen eltért a különböző klinikai izolátum rezisztens törzsei között. Általánosan elmondható, hogy a létrehozásához használt antimikotikumra minden törzs stabil rezisztenciát alakított ki. A 0381 izolátum esetében a FLU^{evo} és a VOR^{evo} törzsek is rezisztenciát mutattak flukonazolra és vorikonazolra, míg a POS^{evo} törzs mindhárom vizsgált triazzal szemben rezisztensnek bizonyult (8. táblázat). Ezzel szemben a *C. auris* 0387 izolátum esetében az azol-evolvált törzsek mindegyike egységesen rezisztenssé vált mindhárom azol típusú antifungális szerre (9. táblázat). Emellett ezen törzsek caspofungin keresztrezisztenciát is mutattak.

8. táblázat Az antifungális érzékenység változása az azolok jelenlétében szelektált, *C. auris* 0381 klinikai izolátumból származó törzsek esetében

Törzsek	MIC (µg/ml)													
	AMB		FLU		POS		VOR		AND		CAS		MICA	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h
<i>C. auris</i> 0381	0.375	0.75	4.5	12	0.0625	0.0625	0.0625	0.0625	0.0313	0.125	0.375	1	0.0313	0.0313
<i>C. auris</i> 0381 FLU ^{evo}	0.75	1	388.5*	512*	0.0625	0.25	3*	4*	0.0938	0.5	0.75	0.75	0.0313	0.0313
<i>C. auris</i> 0381 POS ^{evo}	0.75	0.5	>512*	>512*	>32*	>32*	>32*	>32*	0.125	0.3125	0.625	0.375	0.0313	0.0313
<i>C. auris</i> 0381 VOR ^{evo}	0.5	1	>512*	>512*	0.25	0.5	8*	16*	0.0625	0.0938	0.375	0.375	0.0313	0.0313

* rezisztencia határérték feletti MIC értékek

9. táblázat Az antifungális érzékenység változása az azolok jelenlétében szelektált, *C. auris* 0387 klinikai izolátumból származó törzsek esetében

Törzsek	MIC (µg/ml)													
	AMB		FLU		POS		VOR		AND		CAS		MICA	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h
<i>C. auris</i> 0387	0.1875	0.5	1.5	8	0.0625	0.0625	0.0625	0.0625	0.0781	0.1875	0.5	0.75	0.0313	0.0313
<i>C. auris</i> 0387 FLU ^{evo}	0.375	0.75	>512*	>512*	>32*	>32*	24*	>32*	0.75	1	>16*	>16*	0.0313	0.0781
<i>C. auris</i> 0387 POS ^{evo}	0.5	0.75	>512*	>512*	>32*	>32*	>32*	>32*	0.1875	0.5	2*	4*	0.0313	0.0469
<i>C. auris</i> 0387 VOR ^{evo}	0.5	0.75	>512	>512*	>32*	>32*	>32*	>32*	0.25	0.5	2*	3*	0.0313	0.0469

* rezisztencia határérték feletti MIC értékek

6.2.3. Mikafungin rezisztens törzsek antifungális érzékenysége

A mikafungin evolált törzsek antifungális profilja szintén eltérést mutatott a két klinikai izolátumból létrehozott evolált törzsek között. A 0381 MICA^{evo} törzs egyik echinokandin típusú antimikotikumra sem volt érzékeny, ami a rezisztencia kialakulásának egységes mechanizmusára utal (10. táblázat). A 0387 MICA^{evo} törzs a vizsgált echinokandinok mellett az azol típusú szerekkel szemben is elveszítette érzékenységét (11. táblázat). Ez alapján valószínűsíthető, hogy a mikafunginnal történő kezelés a *C. auris* bizonyos izolátumaiban széles körű antibiotikum keresztrezisztenciát alakíthat ki.

10. táblázat Az antifungális érzékenység változása mikafungin jelenlétében szelektált, *C. auris* 0381 klinikai izolátumból származó törzsek esetében

Törzsek	MIC (µg/ml)													
	AMB		FLU		POS		VOR		AND		CAS		MICA	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h
<i>C. auris</i> 0381	0.375	0.75	4.5	12	0.0625	0.0625	0.0625	0.0625	0.03125	0.125	0.375	1	0.03125	0.03125
<i>C. auris</i> 0381 MICA ^{evo}	0.375	0.5	2.5	12	0.0625	0.0625	0.0625	0.0625	>16*	>16*	>16*	>16*	>16*	>16*

* rezisztencia határérték feletti MIC értékek

11. táblázat Az antifungális érzékenység változása mikafungin jelenlétében szelektált, *C. auris* 0387 klinikai izolátumból származó törzsek esetében

Törzsek	MIC (µg/ml)													
	AMB		FLU		POS		VOR		AND		CAS		MICA	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h
<i>C. auris</i> 0387	0,1875	0,5	1,5	8	0,0625	0,0625	0,0625	0,0625	0,078125	0,1875	0,5	0,75	0,03125	0,03125
<i>C. auris</i> 0387 MICA ^{ev}	1	1	>512*	>512*	>32*	>32*	>32*	>32*	4*	4*	>16*	>16*	>16*	>16*

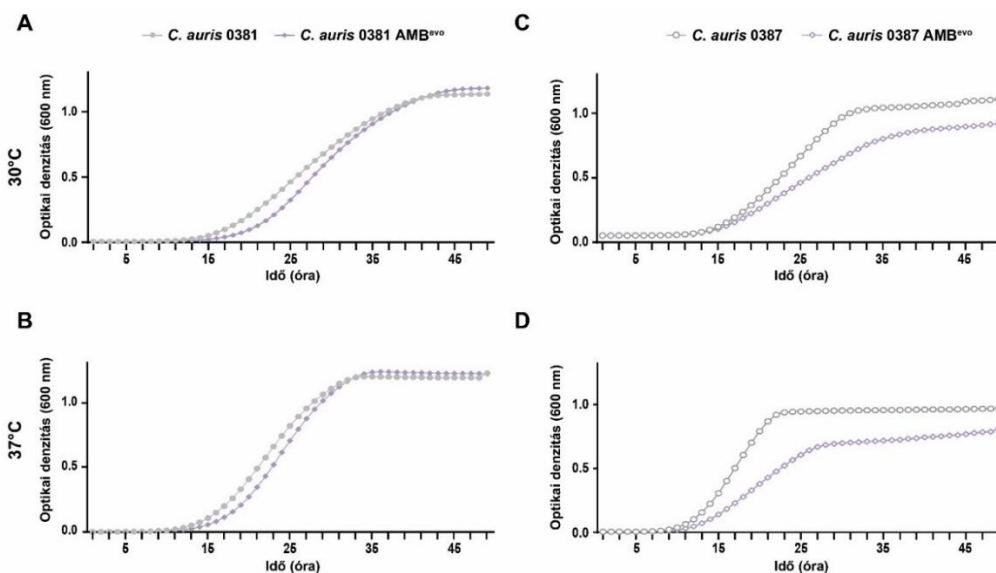
* rezisztencia határérték feletti MIC értékek

6.3. Létrehozott törzsek általános növekedési képességének vizsgálata

A rezisztens törzsek növekedését komplex (YPD) tápoldatban vizsgáltuk, majd összehasonlítottuk a létrehozásukhoz használt klinikai izolátumokkal. A kísérleteket 30°C-on, illetve humán fertőzés során a gazdaszervezetet közvetlenül modellező 37°C-on is végrehajtottuk.

6.3.1. Amfotericin B rezisztens törzsek növekedési görbéje

A poliénnel történő szelekció nem változtatta meg a 0381 AMB^{ev} törzs növekedését egyik vizsgált hőmérsékleten (30°C, 37°C) sem, a kiindulási izolátumhoz képest (8A, B ábra). Ezzel szemben a 0387 AMB^{ev} törzs esetében mindkét hőmérsékleten eltérést tapasztaltunk a klinikai izolátum növekedéséhez képest: a rezisztens törzs mindkét esetben mind osztódási sebességben, mind pedig a plató eléréséhez szükséges sejtkoncentrációban elmarad az eredeti klinikai izolátumtól (8C, D ábra).



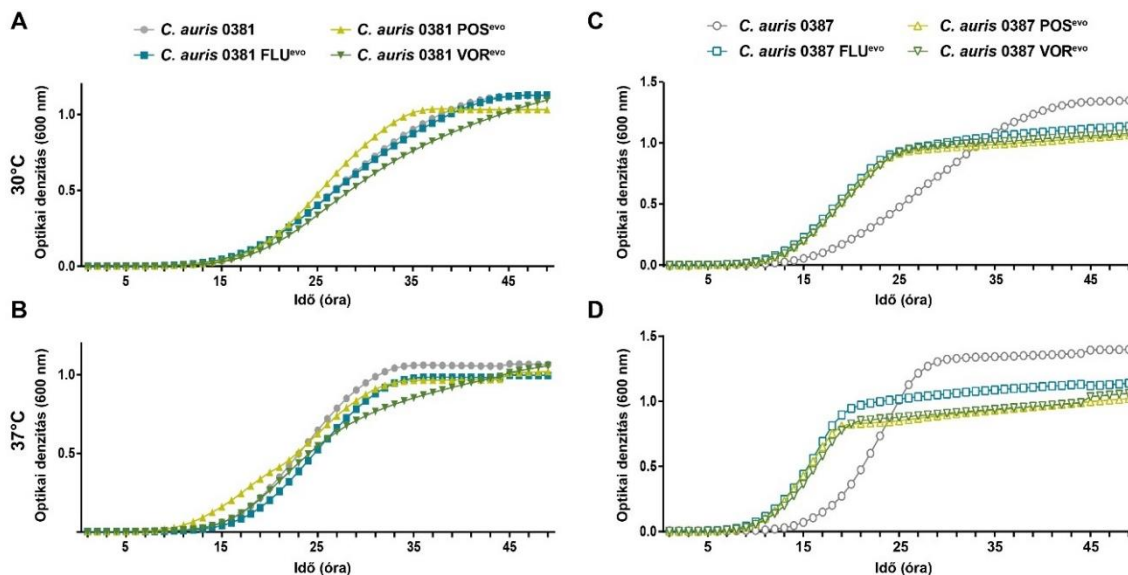
8. ábra

Az amfotericin B jelenlétében létrehozott *C. auris* törzsek növekedési képességének vizsgálata komplex tápoldatban (YPD)

A növekedési képesség vizsgálatához a létrehozott rezisztens törzseket 48 órán keresztül 30°C-on (A, C) és 37 °C-on (B, D) növesztettük. Az optikai densitás óránként történő leolvasásával (OD_{600nm}) meghatároztuk a növekedési görbéket, melyeket legalább 28 független adatpont átlagaként ábrázoltuk.

6.3.2. Triazol rezisztens törzsek növekedési görbéje

Hasonlóan a 0381 izolátumból létrehozott amfotericin B evolált törzshöz, az izolátum triazol evolált törzseinek növekedési görbéje sem mutatott jelentős eltérést a kiindulási izolátumhoz képest (9A, B ábra). Ellenben a 0387 izolátum esetében, a triazol rezisztens törzsek növekedése 30 és 37°C-on is szignifikánsan eltért a kiindulási törzshöz képest (9C, D ábra). A FLU^{evo}, POS^{evo} és VOR^{evo} törzsek növekedési görbéjének lefutása felgyorsult sejtosztódásra utal a kiindulási törzshöz képest, azonban a plató eléréséhez esetükben alacsonyabb sejtkoncentráció társul.



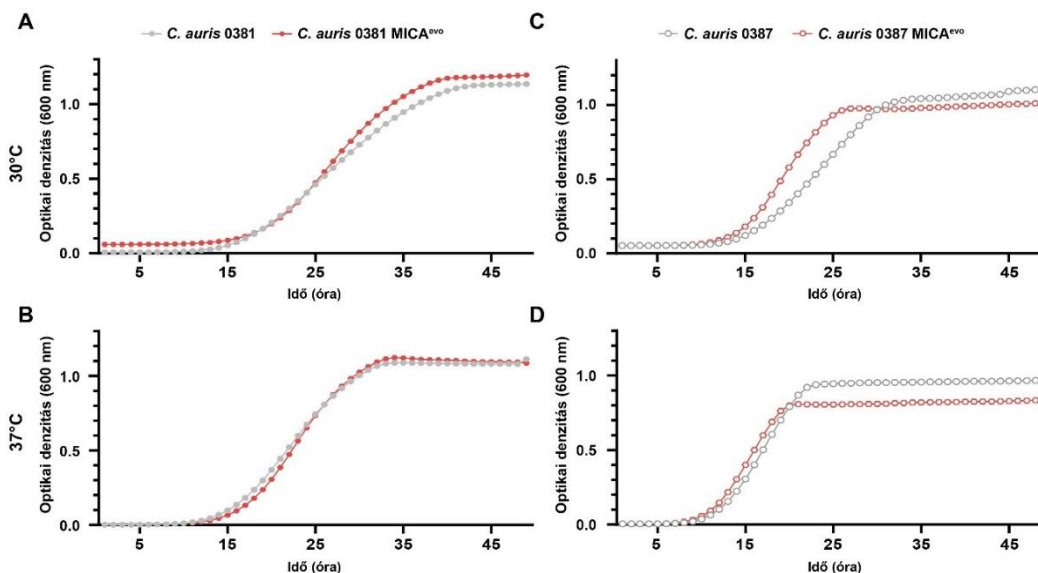
9. ábra

Az azol evolált törzsek növekedési képességének vizsgálata komplex tápoldatban (YPD)

A növekedési képesség vizsgálatához a létrehozott rezisztens törzseket 48 órán keresztül 30°C-on (A, C) és 37 °C-on (B, D) növesztettük. Az optikai densitás óránként történő leolvasásával (OD_{600nm}) meghatároztuk a növekedési görbéket, melyeket legalább 28 független adatpont átlagaként ábrázoltuk.

6.3.3. Mikafungin rezisztens törzsek növekedési görbéje

Hasonlóan a 0381 izolátumból származó további rezisztens törzsekhez, a 0381 MICA^{evo} növekedési képessége sem változott szignifikáns mértékben a kiindulási törzshöz képest egyik vizsgált hőmérsékleten sem (10A, B ábra). A 0387 MICA^{evo} törzs esetében a mikafungin jelenlétében történő szelekció szintén nem változtatta meg szignifikánsan a törzs növekedését a kiindulási izolátumhoz képest egyik hőmérsékleten sem (10C, D ábra). Csupán a rezisztens törzs osztódási sebességének moderált növekedését tapasztaltuk 30°C-on, míg 37°C-on ebben az esetben is alacsonyabb sejtkoncentráció társult a stacionárius fázis eléréséhez.



10. ábra

A mikafungin szelekcióval létrehozott *C. auris* törzsek növekedési képességének vizsgálata komplex tápoldatban (YPD)

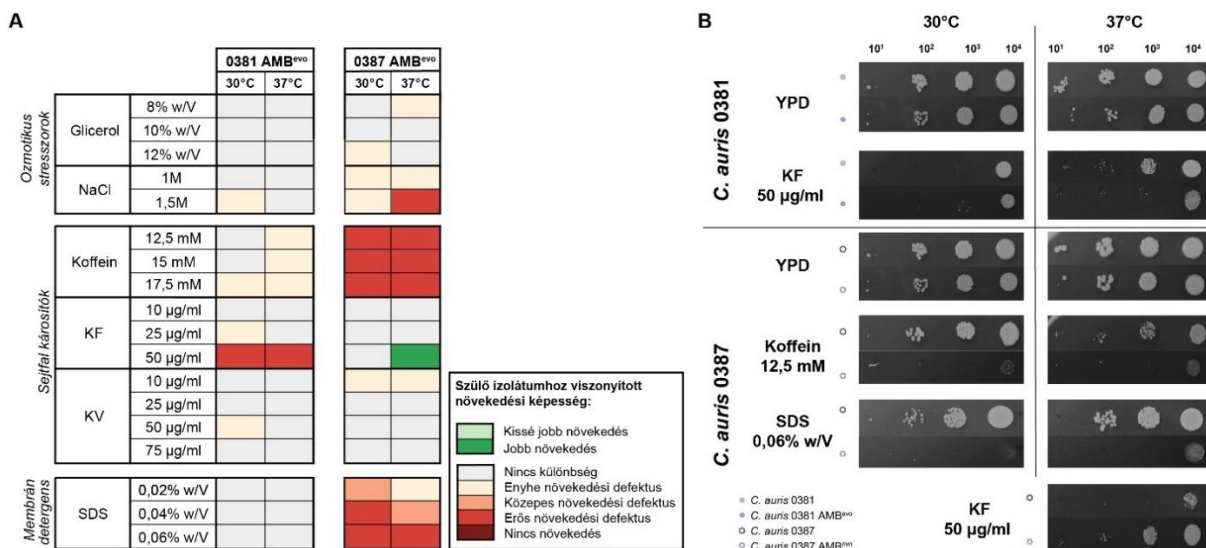
A növekedési képesség vizsgálatához a létrehozott rezisztens törzseket 48 órán keresztül 30°C-on (A, C) és 37 °C-on (B, D) növesztettük. Az optikai denzitás óránként történő leolvasásával (OD_{600nm}) meghatároztuk a növekedési görbéket, melyeket legalább 28 független adatpont átlagaként ábrázoltuk.

6.4. Az evolált *C. auris* törzsek abiotikus stressz hatásokkal szembeni érzékenységének vizsgálata

A *C. auris* hatékonyan képes alkalmazkodni a számára kedvezőtlen külső hatásokhoz, ami hozzásegíti mind a környezet, mind az emberi szervezet hatékony kolonizációjához. Hogy információt nyerjünk a szerzett rezisztencia stressz toleranciájára gyakorolt hatásáról, megvizsgáltuk a törzsek életképességét különböző stresszhatásokat modellező táptalajokon.

6.4.1. Amfotericin B rezisztens törzsek abiotikus stressz toleranciája

Általánosságban véve az amfotericin B rezisztencia kialakulása nem volt jelentős hatással a 0381 AMB^{ev} stressz toleranciájára (11. ábra). Ezen törzs esetében a szubjektív pontozási rendszer alapján mindössze egy sejtfal stresszor, a kalkofluor fehér (KF) legmagasabb koncentrációja (50 µg/ml) okozott erős növekedési defektust mindkét vizsgált hőmérsékleten a kiindulási izolátumhoz viszonyítva (11A ábra). Ez arra utal, hogy ennél az izolátumnál az AMB rezisztencia kialakulása bizonyos mértékig legfeljebb a sejtfal összetételt befolyásolhatja. Ezzel szemben a 0387 AMB^{ev} hőmérséklet független módon érzékeny volt minden vizsgált koffein koncentráció jelenlétére (11A ábra). Emellett a törzs növekedési képességét a membrán detergens SDS is gátolta, ami alapján arra következtethetünk, hogy ezen izolátum esetén a rezisztencia kialakulása a sejtfal összetétel mellett a sejtmembrán szerkezetére is hatással volt (11B ábra).



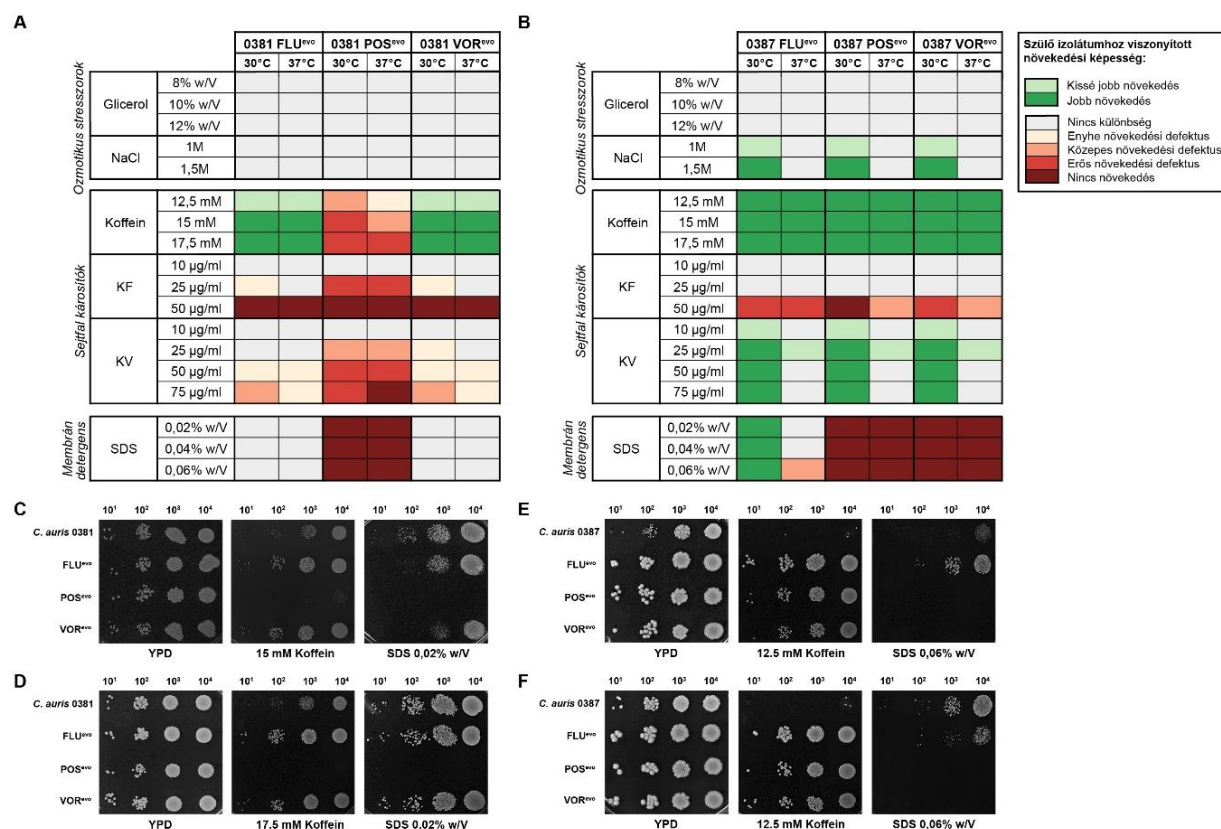
A vizsgált törzsek növekedési képességét szubjektív szabályrendszer szerint hőtésképen ábrázoltuk (A). A szülői izolátumhoz viszonyított jelentősebb eltéréseket reprezentatív képekkel ábrázoltuk (B). Minden törzs esetében három független kísérletet hajtottunk végre. KF: Kalkofluor fehér; KV: Kongó vörös

6.4.2. Triazol rezisztens törzsek abiotikus stressz toleranciája

Az ozmotikus stresszorok (glicerol, NaCl) nem befolyásolták a 0381 triazol evolált törzsek növekedési képességét (12A ábra). A 0381 POS^{ev} törzs az összes sejtfal károsító ágens (koffein, KF, KV), és a sejtmembrán detergens (SDS) jelenlétére is rendkívül érzékenyen reagált. Bár a 0381 FLU^{ev} és VOR^{ev} törzsek szintén érzékenyen reagáltak a sejtfal stresszorok (KV, KF) jelenlétére, ez a fenotípus kevésbé volt kifejezett és csak magasabb stresszor koncentrációk mellett jelentkezett. Érdekes módon, a sejtfal stresszorként funkcionáló koffeinnel szemben mindkét törzs rezisztenciát alakított ki (12B, C ábra). Ez alapján arra következtethetünk, hogy az azol rezisztencia kialakulása a posakonazol kezelés esetében jelentős hatással volt a sejtek sejtfal és membrán összetételére, ami a FLU^{ev} és VOR^{ev} törzsek vizsgálata során nem volt megfigyelhető.

Az előbbi jelenséget a 0387 izolátumból létrehozott triazol rezisztens törzseknél is megfigyeltük: a 0387 FLU^{ev}, POS^{ev} és VOR^{ev} egységesen koffein toleranciát mutatott. Emellett szintén tolerancia alakult ki az ozmotikus stresszor NaCl (30°C), és a sejtfal stresszor KV (30°C) jelenlétében. Ennek ellenére mind a sejtfal, mind pedig az ozmotikus stresszre adott toleranciára utaló válasz nem általános, mivel az ozmotikus stresszor glicerol jelenlétében nem tapasztaltunk eltérést, míg a sejtfal stresszor KF esetén - magasabb koncentrációban - növekedési defektust figyelhattunk meg a kiindulási izolátumhoz képest (12B ábra).

A membrán detergens (SDS) jelenlétében a három izolátum egységes válasza megszűnt: míg a POS^{ev0} és VOR^{ev0} fokozottan érzékenynek bizonyult, addig a FLU^{ev0} törzs esetén a klinikai izolátumhoz viszonyítva 30°C-on toleranciát figyeltünk meg (12E, F ábra).

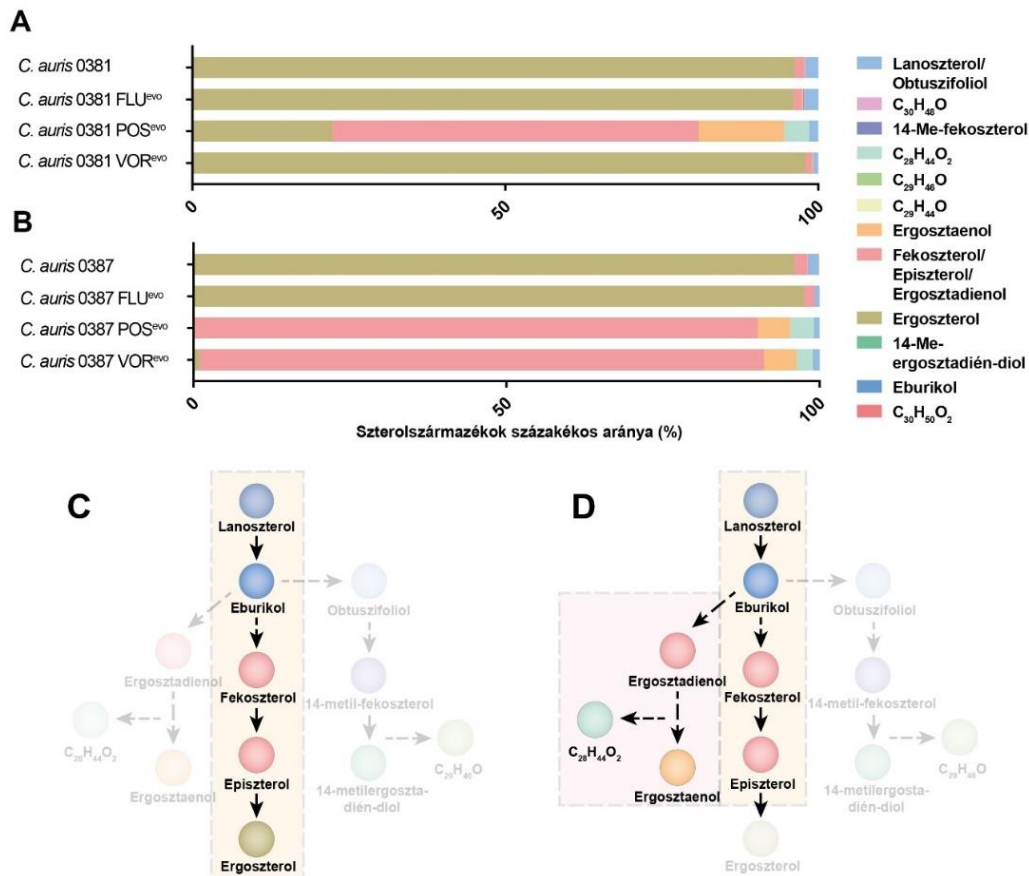


6.4.3. Mikafungin rezisztens törzsek abiotikus stressz toleranciája

A 0381 MICA^{ev0} törzs legjelentősebb növekedési deficienciáját a sejtfal stresszor KF, és a KV legmagasabb koncentrációja (75 µg/ml) okozta (13A ábra). Kisebb mértékben, de ez a törzs szintén érzékeny volt koffein jelenlétére. Emellett az SDS jelenlétére kis mértékű toleranciát tapasztaltunk. A 0387 MICA^{ev0} törzs növekedési képessége minden vizsgált körülmény mellett közel megegyezett a kiindulási izolátummal. A legmagasabb vizsgált KV koncentráción 30°C-on azonban a törzs erős növekedési defektust mutatott (13B ábra).

6.5.1. Szterol tartalom változása antifungális kezelés hiányában

A komplex tápoldatban, antifungális kezelés nélkül nevelt törzsek esetében mind a 0381 FLU^{ev0}, mind a 0387 FLU^{ev0} a kiindulási izolátumukhoz hasonló arányban (> 95%) tartalmazott ergoszterolt - a bioszintetikus útvonal végtermékét (15A, B, C ábra).



15. ábra

A szterol összetétel változása a triazol evolált törzsek esetében

Az egyes szterolszármazékok százalékos arányának vizsgálata LC-MS módszerrel, a 0381 (A) és 0387 (B) izolátumból létrehozott törzsek esetében triazol kezelés hiányában. A 0381 FLU^{ev0} és VOR^{ev0}, valamint a 0387 FLU^{ev0} törzs vizsgálata során a kiindulási izolátumokhoz hasonlóan az ergoszterol dominált (C). Ezzel szemben a 0381 POS^{ev0}, 0387 POS^{ev0} és VOR^{ev0} törzsekben az alternatív útvonal intermedierjeinek felhalmozódása volt jellemző (D).

Ezzel szemben a POS^{ev0} törzsekben jelentős csökkenést tapasztaltunk az ergoszterol mennyiségében: a 0381 POS^{ev0} törzsben az ergoszterol mennyisége 80%-os, míg a 0387 POS^{ev0} törzsben 99%-os csökkenést mutatott posakonazol kezelés hiányában is (15A, B ábra). Ugyanezen törzsekben olyan köztitermékek kompenzálták az ergoszterol hiányát, mint az ergoszteanol vagy a közösen detektált fekoszterol/episzterol/ergosztadienol.

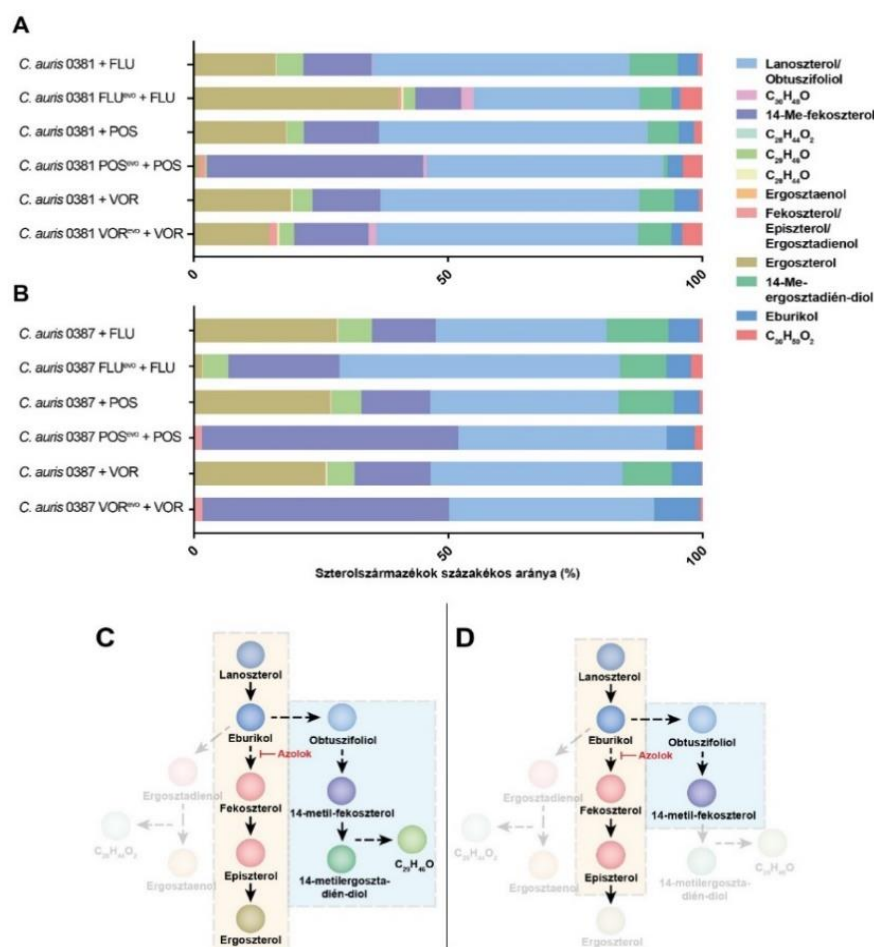
Érdekes módon a VOR^{ev0} törzsek egymástól eltérő fenotípust mutattak: míg a 0381 VOR^{ev0} törzs a klinikai izolátumhoz hasonló mintázatban tartalmazta a szterolszármazékokat, addig a 0387 VOR^{ev0}

törzsben az ergoszterol hiányát (~1%) szintén a fekoszterol/episzterol/ergosztadienol (~90%) kompenzálta.

Azokban a törzsekben, melyekben az ergoszterol mennyisége jelentősen lecsökkent, egy *Candida* fajokban még azonosíthatatlan szterol származékot ($C_{28}H_{44}O_2$; portenszterol) is detektáltunk. A szénatomok száma, illetve az ergosztadienolhoz és ergoszaenolhoz köthető megjelenés arra utal, hogy a portenszterol a bioszintetikus útvonal alternatív ágához köthető (15D ábra).

6.5.2. Szterol tartalom változása triazol kezelt minták esetén

Az triazol evolvált törzsek, illetve a kiindulási izolátumaik szterol összetételét antifungális szerekkel történő kezelés mellett is megvizsgáltuk. Ehhez minden esetben a mikroevolúció során maximálisan alkalmazott antifungális szer koncentráció felét alkalmaztuk (16. ábra).



16. ábra

A triazol evolvált törzsek szterol összetételének változása a létrehozásukhoz használt antifungális kezelés hatására

Az egyes szterolszármazékok százalékos arányának vizsgálata LC-MS módszerrel, a 0381 (A) és 0387 (B) izolátumból létrehozott törzsek esetében triazol kezelést követően. A triazol kezelés a vizsgált törzsek nagy részében aktiválta a bioszintetikus útvonal alternatív ágát (C), azonban a 0381 POS^{ev}, illetve 0387 POS^{ev} és VOR^{ev} törzsek esetében a szintézis az alternatív útvonal felé tolódott (D).

A klinikai izolátumokban a triazol kezelés minden esetben csökkentette az ergoszterol mennyiségét, aminek kompenzálásaként a lanoszterol és obtuszifoliol feldúsulása volt megfigyelhető, függetlenül az alkalmazott antifungális szertől. Ezenkívül a 14-Me-fekoszterol, és a toxikus hatású 14-Me-ergosztadién-diol megjelenése is arra utal, hogy ezen körülmények között a lanoszterol-14- α -demetiláz gátlásához köthető alternatív útvonal aktivációja fokozódott.

A triazol kezelés a 0381 evolvált törzseknél az ergoszterol mennyiségének csökkenése mellett egy, a bioszintetikus útvonalon még nem elhelyezett szterol termék, a C₂₉H₄₆O (stigmatsteron) megjelenését is okozta (16A ábra). Mivel ez a szterol származék kizárólag a toxikus melléktermékkel, a 14-Me-ergosztadién-diollal asszociáltan jelent meg, így bioszintézisük feltételezhetően közeli kapcsolatban áll egymással (16C ábra).

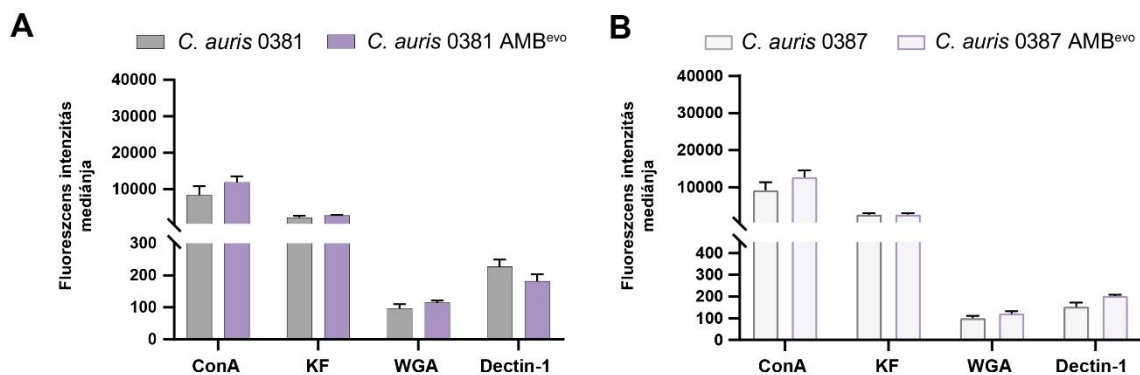
A 0387 izolátumból létrehozott triazol evolvált törzsekben kezelés hatására az ergoszterol mennyisége szignifikánsan lecsökkent (0387 FLU^{evo}) vagy nem volt detektálható (0387 POS^{evo}, 0387 VOR^{evo}) (16B ábra). A végső termék hiányát a lanoszterol/obtuszifoliol, 14-Me-fekoszterol és eburikol megjelenése kompenzálta. A toxikus 14-Me-ergosztadién-diol ellenben kizárólag a FLU^{evo} törzsben volt detektálható (~8%), és a korábban említett stigmatsteron is csak ebben a törzsben volt detektálható. Ez tovább erősíti azt a megfigyelést, miszerint a stigmatsteron szintézise a toxikus 14-Me-ergosztadién-diol megjelenéséhez köthető (16D ábra).

6.8. Az antibiotikum rezisztencia hatása a törzsek sejtfal homeosztázisára

Mivel a létrehozott rezisztens törzsek a stressztolerancia vizsgálatok során, a kiindulási izolátumokhoz viszonyítva, több esetben is eltérő érzékenységet mutattak a sejtfalkárosító ágensekkel szemben, így fluoreszcens festéssel megvizsgáltuk sejtfaluk összetételét. A kísérlet során FITC-konjugált Concanavalin-A (ConA) festéket használtunk az α -mannán, TRITC-konjugált gabona csíra agglutint (WGA) a kitin oligomerek, kalkofluor fehérlet (KF) a kitin, illetve Dectin-1 és emberből származó Immunoglobulin G Fc régió kiméra fehérjével konjugált Alexa Fluor 647 festéket a β -glükán kimutatására. Az egyes komponensek felszíni expozícióját populáció szinten áramlási citometriával, illetve jelentős eltérés esetén fluoreszcens mikroszkópiával is vizsgáltuk.

6.8.1. Amfotericin B rezisztens törzsek sejtfalának változása

Az amfotericin B jelenlétében történő hosszútávú szelekció egyik evolvált törzs esetében sem okozta a sejtfal komponensek mennyiségének szignifikáns változását (17A, B ábra).



17. ábra

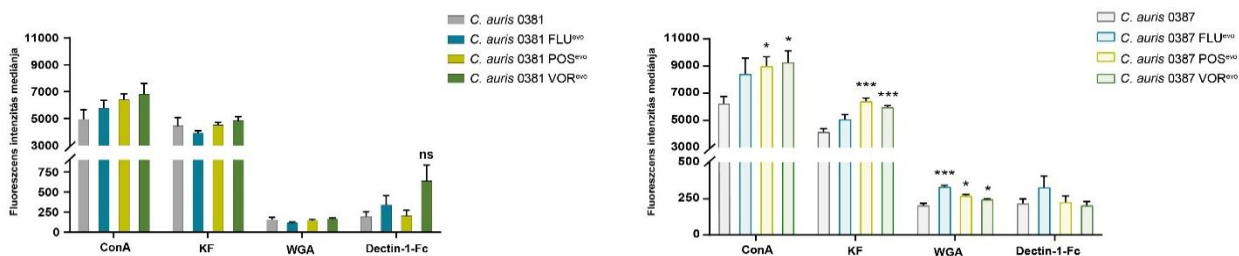
Amfotericin B evolált törzsek sejtfal összetételének vizsgálata áramlási citometriával

ConA: FITC-konjugált Concanavalin-A; KF: Kalkofluor fehér; WGA: Wheat Germ Agglutinin (Gabona csíra agglutinin); Dectin-1-Fc: Dectin-1 és emberből származó Immunoglobulin G Fc régió kiméra fehérjével konjugált Alexa Fluor 647. A feltüntetett adatok minden törzs esetében három független párhuzamos kísérletből származnak, ahol alkalmanként 10^4 gombasejt fluoreszcens jelét detektáltuk (átlag $\pm$ standard hiba). * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.005$; *** $p \leq 0.0005$; **** $p \leq 0.0001$ (párosítatlan t-teszt).

6.8.2. Triazol rezisztens törzsek sejtfalának változása

6.8.2.1. Áramlási citometria

A 0381 azol evolált törzsek esetében nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést az egyes sejtfalkomponensek sejtfelszíni megjelenésében a kiindulási izolátumhoz képest (18A ábra). Ezzel szemben a 0387 azol evolált törzsek vizsgálata során több sejtfal komponens mennyisége is szignifikánsan változott a kiindulási izolátumhoz viszonyítva (18B ábra). A 0387 POS^{ev} és VOR^{ev} törzsekben megemelkedett a sejtfal α -mannán (ConA) és kitin (KF) tartalmat tapasztaltunk. Emellett mindhárom azol evolált törzs nagyobb mennyiségben tartalmazott kitin oligomereket (WGA).



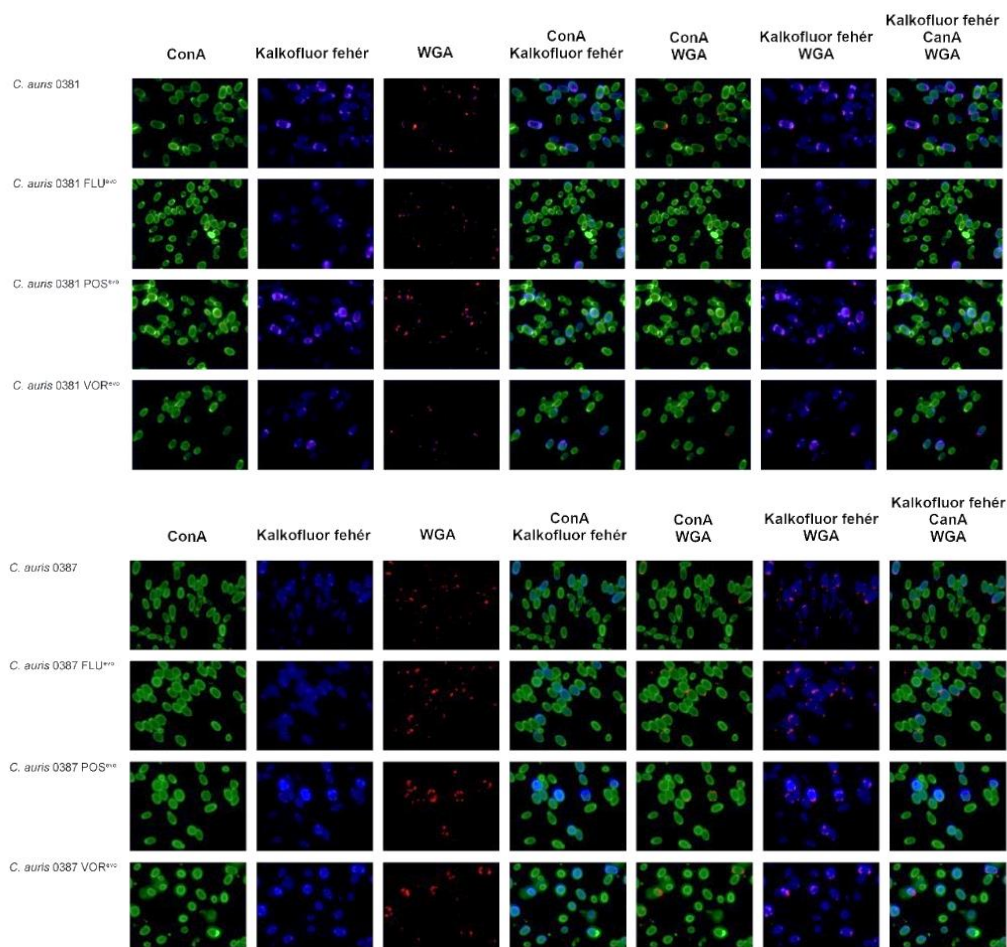
18. ábra

Triazol evolált törzsek sejtfal összetételének vizsgálata

ConA: FITC-konjugált Concanavalin-A; KF: Kalkofluor fehér; WGA: Wheat Germ Agglutinin (Gabona csíra agglutinin); Dectin-1-Fc: Dectin-1 és emberből származó Immunoglobulin G Fc régió kiméra fehérjével konjugált Alexa Fluor 647. A feltüntetett adatok minden törzs esetében három független párhuzamos kísérletből származnak, ahol alkalmanként 10^4 gombasejt fluoreszcens jelét detektáltuk (átlag $\pm$ standard hiba). * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.005$; *** $p \leq 0.0005$; **** $p \leq 0.0001$ (párosítatlan t-teszt).

6.8.2.2. Mikroszkópos vizsgálat

A triazol evolált törzsek sejtfal komponenseinek vizsgálatát fluoreszcens mikroszkópos vizsgálattal is elvégeztük (19. ábra). Bár a fluoreszcens mikroszkópos eljárás jeldetektálási érzékenysége alacsonyabb, vizuálisan is alátámasztottuk a 0387 azol evolált törzsek megemelkedett α -mannán (POS^{evo}, VOR^{evo}), kitin (POS^{evo}, VOR^{evo}) és kitin oligomer (POS^{evo}, VOR^{evo}, FLU^{EVO}) tartalmát.



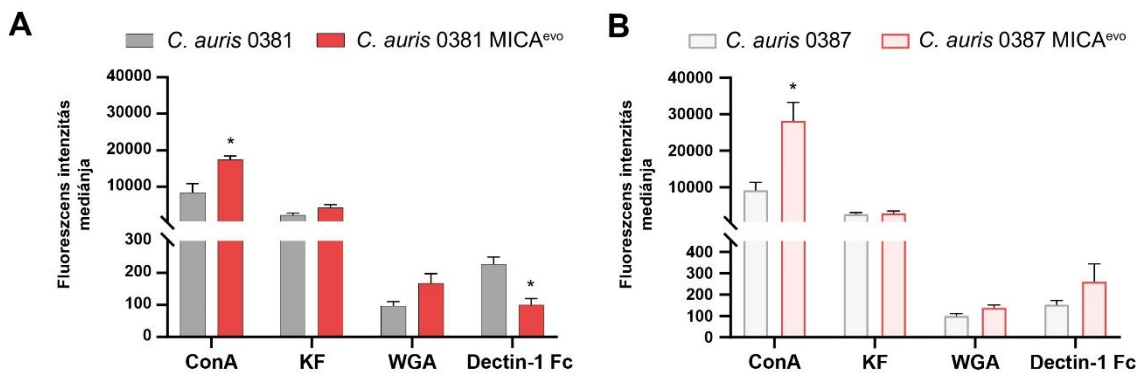
19. ábra

A sejtfal összetételének mikroszkópos vizsgálata a triazol evolált törzsek esetében

A sejtfal összetevők festésére az áramlási citometriás eljáráshoz hasonlóan ConA (α -mannán), Kalkofluor fehér (kitin) és WGA (kitin oligomerek) fluoreszcens festékeket használtunk.

6.8.3. Mikafungin rezisztens törzsek sejtfalának változása

A 0381 és 0387 MICA^{evo} törzsek esetében egyaránt megemelkedett a sejtfal α -mannán mennyisége (ConA) (20A, B ábra). A fluoreszcens intenzitás medián értékei alapján a 0381 MICA^{evo} törzsben kétszereződött, míg a 0387 MICA^{evo} törzsben háromszorozódott az α -mannán sejtfelszíni expozíciója. A β -glükán kimutatására használt Dectin-1 Fc-vel történő jelölés arra utal, hogy mikafunginnal szembeni rezisztencia kialakulása a két törzs esetén eltérő előjellel befolyásolta a komponens mennyiségét.



20. ábra

Mikafungin evolált törzsek sejtfal összetételének vizsgálata

ConA: FITC-konjugált Concanavalin-A; KF: Kalkofluor fehér; WGA: Wheat Germ Agglutinin (Gabona csíra agglutinin); Dectin-1-Fc: Dectin-1 és emberből származó Immunoglobulin G Fc régió kiméra fehérjével konjugált Alexa Fluor 647. A feltüntetett adatok minden törzs esetében három független párhuzamos kísérletből származnak, ahol alkalmanként 10^4 gombasejt fluoreszcens jelét detektáltuk (átlag $\pm$ standard hiba). * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.005$; *** $p \leq 0.0005$; **** $p \leq 0.0001$ (párosítatlan t-teszt).

6.9. Triazol evolált törzsek efflux pumpa aktivitás vizsgálata

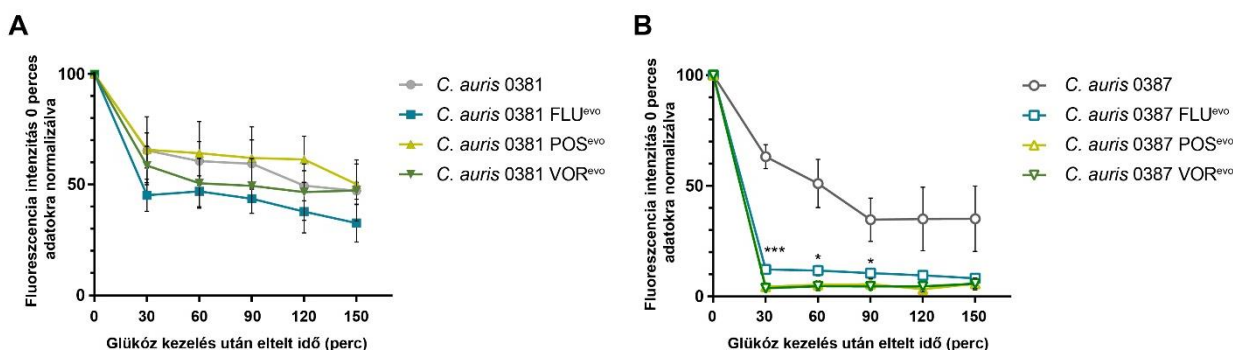
Az azol típusú antifungális szerekkel szemben kialakuló rezisztencia egyik leggyakoribb mechanizmusa egyes transzporter proteinek expressziójának fokozódására vezethető vissza. Az ABC és MFS típusú transzporterek egyes képviselői képesek a citoplazmába diffundált antimikotikumok megkötésére és azok extracelluláris térbe juttatására. Azért, hogy megvizsgáljuk, hogy az efflux folyamatokhoz köthető detoxifikálási folyamatok szerepet játszanak-e a létrehozott törzsek azokkal szembeni toleranciájában, génexpressziós illetve funkcionális kísérleteket végeztünk el.

6.9.1. Efflux pumpák funkcionális vizsgálata

Szakirodalmi adatok alapján mind az ABC típusú transzportereknek (Cdr1, Cdr2), mind egyes MFS típusú transzportereknek (Mdr1) szerepe van a *C. auris* azokkal szembeni rezisztenciájában. Ahhoz, hogy megvizsgáljuk az efflux folyamatok szerepét a létrehozott rezisztens törzsekben, funkcionális kísérleteket végeztünk. Ehhez a gombasejteket Nílus Vörös fluoreszcens próbával festettük, ami *Candida* fajokban a Cdr1, Cdr2 és Mdr1 transzporterek ligandja. A minták kezelését követően a fluoreszcens intenzitás változását áramlási citometriával vizsgáltuk különböző időpontokban (21. ábra). A fluoreszcens festék túl korai eltávolítását efflux pumpa gátlókkal (Na-azid és enniatin) akadályoztuk meg, majd a festés után a fiziológias efflux folyamatok visszaállítását glükózzal történő aktivációval értük el. A festék mennyiségének csökkenését 150 percen keresztül monitoroztuk (30 perces időközönként), a kapott intenzitási medián értékeket a glükóz kezelés előtti (0 perc) értékekre normalizáltuk.

A 0381 FLU^{evo}, POS^{evo} és VOR^{evo} törzsek a kiindulási izolátumhoz hasonló efflux aktivitást mutattak (21A ábra). A klinikai izolátum esetében 30 perc inkubációt követően a fluoreszcens intenzitás

átlagosan 35%-ot csökkent, míg 150 perc után 53%-ot. A 0381 FLU^{evo} törzsnél az efflux aktivitás kis mértékű növekedését tapasztaltuk: 30 perc után 55%, majd 150 perc után 67%-os fluoreszcens jel veszítést detektáltunk. A POS^{evo} törzs a glükóz indukció hatására 30 perc után 34%-ot, 150 perc után 50%-ot veszített a fluoreszcens jeléből. A FLU^{evo} törzshöz hasonlóan a VOR^{evo} törzs esetében is kis mértékben, de nőtt az efflux folyamatok aktivitása: 30 perc után 41%-os, 150 perc után 52%-os csökkenést mértünk.



21. ábra

Az efflux pumpák aktivitásának vizsgálata fluoreszcens festéssel

A transzporterek funkcionális vizsgálatára Nílus Vörös fluoreszcens festéket használtunk. A glükózzal történő kezelést követően fél órás időközönként detektáltuk a gombasejtek fluoreszcens jelének fogyását (A, B). A feltüntetett adatok minden törzs esetében három független párhuzamos kísérletről származnak, ahol alkalmanként 2×10^4 gombasejt fluoreszcens jelét detektáltuk, majd az adatokat a 0 percnél mért értékekre vonatkoztattuk (átlag $\pm$ standard hiba). * $p \leq 0.05$; *** $p \leq 0.0005$ (párosítatlan t-teszt).

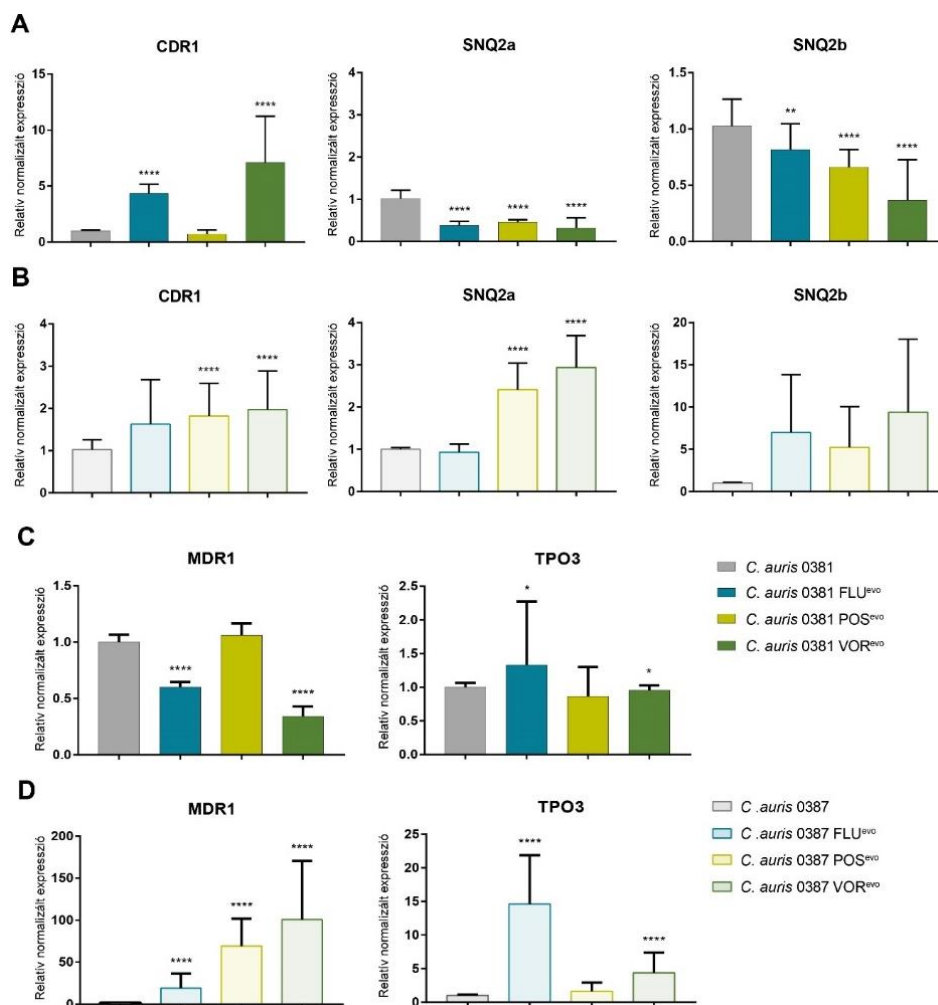
A 0381-es izolátumhoz viszonyítva a 0387 klinikai izolátum magasabb efflux aktivitást mutatott. A glükóz kezelés után 30 perccel a fluoreszcens intenzitás 40%-ot csökkent, majd 90 perc körül 40%-on stabilizálódott (21B ábra). A 0387 izolátumból származó törzsek vizsgálata rendkívül magas efflux aktivitásra utalt. A glükóz aktivációt követően 30 perccel a FLU^{evo} törzs fluoreszcens intenzitása 82%-kal, a POS^{evo} törzsé 96%-kal míg a VOR^{evo} törzsé 97%-kal csökkent, ami a festék citoplazmából történő szinte azonnali eliminációját jelenti.

6.9.2. Efflux pumpák expressziójának vizsgálata valós idejű RT-qPCR módszerrel

Ahhoz, hogy meghatározzuk pontosan mely efflux pumpák vehetnek részt a törzsek antimikotikum detoxifikálásában, valós idejű kvantitatív PCR segítségével vizsgáltuk az antifungális rezisztenciával asszociált transzportereket kódoló gének expresszióját. Kísérleteinkbe három ABC-típusú transzportert - Cdr1, Snq2a, Snq2b -, illetve két MFS-típusú transzportert - Mdr1, Tpo3, - vontunk be, *C. albicans*-ban ismert ortológjaik alapján (22. ábra).

A 0381-es törzs esetében a *CDR1* expressziója szignifikánsan megnövekedett a FLU^{evo} és VOR^{evo} törzsekben, míg a POS^{evo} törzsben a klinikai izolátumhoz hasonló értékeket kaptunk (22A ábra). A másik két ABC- típusú transzportert kódoló gén (*SNQ2a*, *SNQ2b*) mindhárom triazol rezisztens törzsben

csökkent kifejeződést mutatott a klinikai izolátumhoz képest. Emellett a 0381 FLU^{ev0} és VOR^{ev0} törzsekben az *MDR1* expressziója is csökkent, míg a POS^{ev0} törzsben nem tapasztaltunk változást (22C ábra).



22. ábra

ABC- és MFS- típusú efflux pumpákat kódoló gének expressziója a triazol evolált törzsekben

A sejtek detoxifikálásában feltehetőleg szerepet játszó efflux pumpákat kódoló gének expresszióját valós idejű PCR segítségével vizsgáltuk. Mind az ABC- (A, B), mind az MFS-típusú (C, D) transzporterek esetében szignifikáns változásokat tapasztaltunk a kódoló gének expressziójában a klinikai izolátumokhoz viszonyítva. Az ábrázolt adatok 3 független kísérlet adataiból származnak (átlag ± szórás). * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.005$; *** $p \leq 0.0005$; **** $p \leq 0.0001$ (Mann-Whitney teszt).

A 0387 FLU^{ev0} törzsben a *CDR1* expressziója mérsékelten emelkedett meg, míg a POS^{ev0} és VOR^{ev0} törzsekben jelentősen fokozódott (22B ábra). Az utóbbi két törzsben emellett az *SNQ2a* expressziója is szignifikánsan megnövekedett. Érdekes módon mindhárom törzsben az MFS típusú transzporterek extrém magas expresszióját tapasztaltuk a kiindulási izolátumhoz viszonyítva (22D ábra).

6.10. A létrehozott törzsek genomszekvenciájának analízise

A kialakult antifungális rezisztenciához köthető genetikai változások azonosítása érdekében teljes genom szekvenálást végeztünk. Az így talált aminosav változások hatását *in silico* módszerrel prediktáltuk.

6.10.1. Triazol evolált törzsek

A szekvencia analízis eredményeként mind a 0381 FLU^{evo}, mind a 0381 VOR^{evo} törzs esetében aminosav cserét detektáltunk a Tac1b transzkripciós faktort kódoló génben (B9J08_004820) (12. táblázat). Bár *in silico* adatok alapján a FLU^{evo} törzsben talált aminosav szubsztitúció neutrális hatású, funkcionális vizsgálataink (megemelkedett *CDR1* expresszió) arra utalnak, hogy a VOR^{evo} törzshöz hasonlóan ebben az

esetben is funkcióvesztéses mutáció jött létre. A 0381 VOR^{evo} törzsben ezen felül duplikálódott egy megközelítőleg 60 gént magába foglaló szekvenciaregión, ami tartalmazta az Erg11 fehérjét kódoló gént. Érdekes módon a 0381 POS^{evo} törzsben mindössze egy duplikációt találtunk, ami az *RFG1* gént érintette, melynek *C. albicans*-ban a fonalas növekedés gátlásában van szerepe.

12. táblázat A *C. auris* 0381-es izolátum evolált törzsekben azonosított mutációk jellemzői és funkciójuk

<i>C. auris</i> 0381 FLU^{evo}					
Mutáció típusa	Gén	<i>C. albicans</i> ortológ	<i>S. cerevisiae</i> ortológ	Aminosav csere	Funkció
Pontmutáció	B9J08_004820 (TAC1b)	HAL9	HAL9	N690S	Transzkripciós faktor

<i>C. auris</i> 0381 POS^{evo}					
Mutáció típusa	Gén	<i>C. albicans</i> ortológ	<i>S. cerevisiae</i> ortológ	Aminosav csere	Funkció
Exonikus kópia szám változás	B9J08_004089	RFG1	ROX1	-	Transzkripciós faktor; fonalas növekedés represszora

<i>C. auris</i> 0381 VOR^{evo}					
Mutáció típusa	Gén	<i>C. albicans</i> ortológ	<i>S. cerevisiae</i> ortológ	Aminosav csere	Funkció
Pontmutáció	B9J08_004820 (TAC1b)	HAL9	HAL9	S19I	Transzkripciós faktor
Duplikáció	CJI96_0001194-CJI96_0001248*			-	

A 0387-es klinikai izolátumból létrehozott azol rezisztens törzsek esetében funkcióvesztéses mutációt azonosítottunk a *BCY1* génben (13. táblázat). Az érintett gén *C. albicans* esetében a cAMP függő protein kináz A (cAMP/PKA) szignalizációs útvonal regulátora. Emellett, a 0387 FLU^{evo} törzsben egy további funkcióvesztéssel járó aminosav cserét azonosítottunk a *HGT4* génben, amely a glükóz és fruktóz transzmembrán transzportjáért felelős. A 0387 POS^{evo} törzs továbbá tartalmazott egy korai STOP

kodon beépülését előidéző aminosav cserét az *ERG3* génben. Ez amellet, hogy egy klasszikus azol rezisztencia mechanizmus megjelenésére utal, első kísérletes bizonyítékként szolgál a szerzett posakonazol rezisztencia és az *ERG3* mutációja közötti potenciális kapcsolatra.

13. táblázat A *C. auris* 0387-es izolátum evolált törzsekben azonosított mutációk jellemzői és funkciójuk

<i>C. auris</i> 0387 FLU ^{evo}					
Mutáció típusa	Gén	<i>C. albicans</i> ortológ	<i>S. cerevisiae</i> ortológ	Aminosav csere	Funkció
Pontmutáció	B9J08_002818	<i>BCY1</i>	<i>BCY1</i>	R160S	cAMP függő protein kináz inhibitor
Pontmutáció	B9J08_002259	<i>HGT4</i>	<i>SNF3</i>	P95T	Glükóz, fruktóz transzmembrán transzporter

<i>C. auris</i> 0387 POS ^{evo}					
Mutáció típusa	Gén	<i>C. albicans</i> ortológ	<i>S. cerevisiae</i> ortológ	Aminosav csere	Funkció
Pontmutáció	B9J08_002818	<i>BCY1</i>	<i>BCY1</i>	R160S	cAMP függő protein kináz inhibitor
Pontmutáció	B9J08_003737	<i>ERG3</i>	<i>ERG3</i>	S316X	C5 szterol deszaturáz

<i>C. auris</i> 0387 VOR ^{evo}					
Mutáció típusa	Gén	<i>C. albicans</i> ortológ	<i>S. cerevisiae</i> ortológ	Aminosav csere	Funkció
Pontmutáció	B9J08_002818	<i>BCY1</i>	<i>BCY1</i>	R160S	cAMP függő protein kináz inhibitor

6.10.2. Mikafungin evolált törzsek

Az echinocandin rezisztencia kialakulása legtöbb esetben a 1,3- β -D- glükán szintetáz enzimet kódoló *FKS1* gén mutációjára vezethető vissza. A MICA^{evo} törzsekben három különböző helyre térképezhető aminosav cserét azonosítottunk be (D642Y, R1345S, S639Y), melyek feltételezhetően a fehérje funkciójának károsodásával jártak.

A 0381-es izolátum azol evolált törzseinek esetében további sejtmétabolizmust érintő (*TRP5*, *MET16*), sejt polarizációban és sejtadhézióban szerepet játszó (*BJI96_0003540*, *AAF1*), illetve GTPáz aktivátort érintő (*SAC7*) genomi változást is detektáltunk (14. táblázat). Az utóbbi gének esetében a fehérjék funkciója inszerció vagy delécio során kialakuló frameshift vagy korai STOP kodon beépülése miatt módosulhat.

14. táblázat A 0381 MICA^{EVO} törzsben azonosított mutációk és jellemzőik

C. auris 0381 MICA ^{EVO}					
Mutáció típusa	Gén	C. albicans ortológ	S. cerevisiae ortológ	Aminosav csere	Funkció
Pontmutáció	CJI96_0001351 (B9J08_000964) (FKS1)	GSC1 (FKS1)	GSC2 (FKS2)	D642Y (Del) R1354S (Del)	1.3-β-D-glükán szintetáz alegység
Pontmutáció	CJI96_0003689 (B9J08_004899)	orf19.1430	-	M59I (Neu)	Ismeretlen funkció
Inszerció (leolvasási keret eltolódás)	CJI96_0001886 (B9J08_003349)	TRP5	TRP5		Triptofán szintáz
Inszerció (leolvasási keret eltolódás)	CJI96_0003540 (B9J08_000555)	C6_02090C_A	PXL1		Sejtpolarizáció kialakításához és fenntartása
Inszerció (leolvasási keret eltolódás)	CJI96_0004094 (B9J08_005307)	MET16	MET16		Foszfoadenilil-szulfát redukáz
Deléció (leolvasási keret eltolódás)	CJI96_0001295 (B9J08_001347)	SAC7	SAC7		GTPáz aktivátor
Pontmutáció (STOP kodon elvesztése)	CJI96_0004322 (B9J08_004831)	AAF1			Sejtadhézió

A 0387 MICA^{EVO} törzsben a triazol evolált törzsekhez hasonlóan a *BCY1* génben is aminosav cserét találtunk, mely ezúttal korai STOP kodon beépülést eredményezett (15. táblázat). Érdekes módon, ebben a törzsben a *Bcy1* által gátolt *Tpk2* katalitikus alegységet kódoló génben is funkcióvesztéses aminosav cserét azonosítottunk. Ezen megfigyelés alapján azt feltételezhetjük, hogy a PKA szignalizációs útvonal inhibitorának (*BCY1*) mutációjából eredő konstitutív működést ellensúlyozza a katalitikus alegység (*TPK2*) csökkent aktivitása.

15. táblázat A 0387 MICA^{EVO} törzsben azonosított mutációk és jellemzőik

C. auris 0387 MICA ^{EVO}					
Mutáció típusa	Gén	C. albicans ortológ	S. cerevisiae ortológ	Aminosav csere	Funkció
Pontmutáció	B9J08_002788 (TPK2)	TPK2	TPK2	R375K (Del)	cAMP függő protein kináz katalitikus alegység
Pontmutáció	B9J08_003737 (ERG3)	ERG3	ERG3	S243L (Del)	C5 szterol desaturáz
Pontmutáció	B9J08_000964	GSC1 (FKS1)	GSC2 (FKS2)	S639Y (Del)	1.3-β-D-glükán szintetáz alegység
Pontmutáció	B9J08_000053	TOM20	TOM20	L108F (Neu)	Mitokondriális transzporter
Pontmutáció (korai STOP kodon)	B9J08_004233	BUD6	BUD6	E519X (Del)	Sejtpolarizáció kialakításához
Pontmutáció (korai STOP kodon)	B9J08_002818	BCY1	BCY1	S330X (Del)	cAMP függő protein kináz inhibitor
Pontmutáció (STOP kodon elvesztése)	B9J08_002272	C3_03560W_A	ICP55		Aminopeptidáz

A 0387 MICA^{ev} törzsben ezenfelül egy szintén feltételezhetően funkcióvesztést okozó *ERG3* mutációt is találtunk, ami magyarázatot ad az evolált törzsek azokkal szembeni keresztrezisztenciájára. A már említett genomi változásokon kívül további mutációkat azonosítottunk a sejtpolarizációért felelős *BUD6* génben is.

6.11. Triazol evolált törzsek metabolomikai vizsgálata

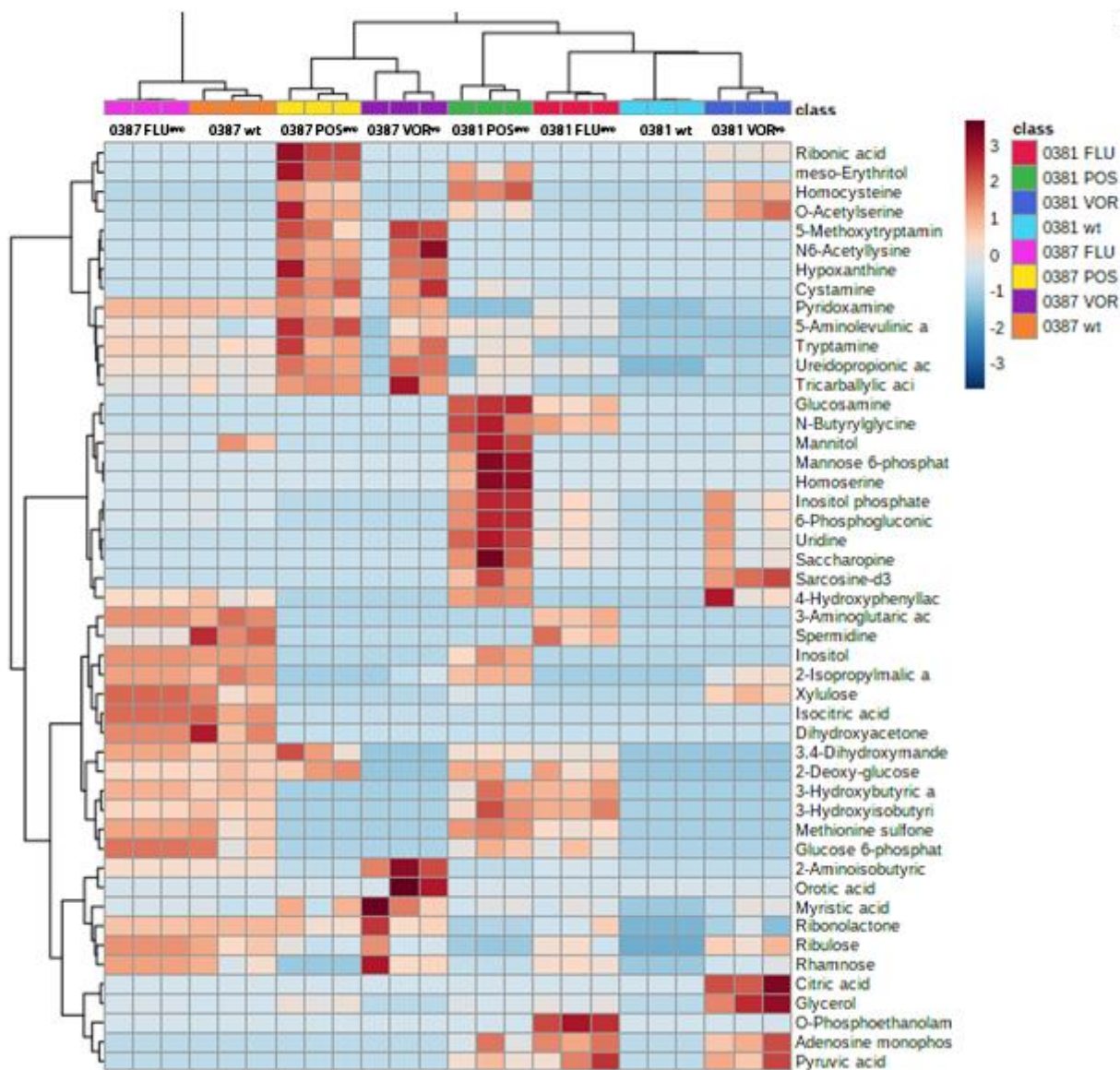
A *C. auris* szekvencia analízisét megnehezíti, hogy a genom annotációja napjainkban még rendkívül hiányos. Valószínűleg ez az oka annak, hogy a klasszikus mechanizmusokon kívül (*ERG3*, *TAC1b* mutáció, *ERG11* duplikáció) triazol evolált törzsek vizsgálata során sok esetben nem találtuk meg a rezisztens fenotípus közvetlen genetikai determinánsát. Mivel feltételezhető, hogy ezekben az esetekben a rezisztencia kialakulása alternatív folyamatok eredménye, így elvégeztük a törzsek metabolomikai és lipidomikai analízisét.

A két klinikai izolátum összehasonlítása során eltérő metabolomikai profilt kaptunk, ami alapján arra következtethetünk, hogy már a két kiindulási törzs anyagcsereje is jelentősen különbözik. Ez tovább erősíti azt a megfigyelést, hogy egyes *C. auris* törzsek között általában rendkívüli diverzitás jellemző.

A 0381 azol evolált törzsek esetén, a FLU^{ev} törzs metabolit profilja hasonlított leginkább a kiindulási izolátum profiljához (23. ábra). A FLU^{ev} törzsben detektált metabolitok közül a foszfoetanolamin fokozott kifejeződése a legkiemelkedőbb. Ennek az etanolamin származéknak főként a glicerofosfolipidek és szfingofosfolipidek felépítésében van kiemelkedő szerepe, így összefüggésbe hozható a megváltozott membrán homeosztázissal. Ennek alapján az adenzin-monofoszfát (AMP) koncentrációjának emelkedése szintén feltételezhetően visszavezethető az intenzív zsírsav szintézissel járó energiafelhasználásra. Ezen utóbbi metabolit mennyisége a VOR^{ev} törzsben szintén megemelkedett, a citromsav, glicerol és a szarkozin-d3 mennyiségével együtt. Míg az előbbi két metabolit olyan esszenciális folyamatokban vesz részt, mint a sejtlégzés és a triacilglicerol anyagcsere, addig a szarkozin-d3 funkciója gombákban ismeretlen. A 0381 POS^{ev} törzs esetében a rezisztencia kialakulása számos detektált metabolit mennyiségére hatással volt: a mannitol és a mannóz-6-foszfát fokozott termelődése a mannóz metabolizmus fokozódására utal. A további megváltozott mennyiségben beazonosított metabolitok száma arra enged következtetni, hogy ezen törzs esetében az antifungális rezisztencia kialakulása radikálisan változtatta meg a sejtek anyagcserejét. Érdekes módon egyetlen metabolit esetében mindhárom evolált törzsnél koncentráció emelkedést azonosítottunk. Ez a metabolit a glükóz anyagcsereiben szerepet játszó piroszőlősav volt.

A 0387 FLU^{ev} metabolit profilja nagy mértékű hasonlóságot mutatott a kiindulási izolátummal. A két törzs között jelentősebb eltérést a koenzim A bioszintézisében szerepet játszó spermidin esetében tapasztaltunk, mely a FLU^{ev} törzsben alacsonyabb szinten volt jelen.

Mind a 0387 POS^{evo}, mind a VOR^{evo} törzsek metabolit összetétele jelentősen eltért a kiindulási izolátumtól, azonban egymáshoz több ponton is hasonlítottak. Míg egyes eltérő mennyiségben detektált metabolitok, mint a hipoxantin, cisztamin a nukleinsav anyagcsere átalakulására utalnak; addig a piridoxamin megemelkedett mennyisége aminosav anyagcsere útvonalak érintettségét feltételezi. A triptamin és az 5-metoxitriptamin koncentrációjának növekedése érdekes összefüggésre mutat rá, ugyanis ennek a két metabolitnak a jelenléte arra utal, hogy a sejtekben a triptofán anyagcsere egy alternatív ága aktiválódik, melynek végterméke a melatonin.



23. ábra

A kiindulási klinikai izolátumok és a triazol rezisztens törzsek metabolomikai analízise

A tömegspektrográfias (GC-MS) vizsgálat során nyert adatokat hőtérképen ábrázoltuk. Az egyes metabolitok arányát belső sztenderdhez hasonlítva adtuk meg. A vizsgálatot minden törzs esetében 3 független leoltásból származó mintán végeztük el. Az ábrán a klinikai izolátumokat wt jelzéssel láttuk el.

A klinikai izolátumok, illetve az evolált törzsek metabolomikai vizsgálata megerősíti, hogy a *C. auris* egyes izolátumai között sejanyagcsere szintjén is jelentős különbségek vannak. Emellett kiemelendő, hogy az egyes antifungális szerekkel szembeni rezisztenciához köthető metabolomikus változások is izolátum függést mutatnak, ami arra enged következtetni, hogy a folyamat nem univerzális.

6.12. Triazol evolált törzsek lipidomikai vizsgálata

A továbbiakban a klinikai izolátumok, illetve az evolált törzsek lipid összetételét vizsgáltuk (24. ábra). A metabolomikai analízishez hasonlóan ebben az esetben is szembetűnő volt a két klinikai izolátum közötti jelentős eltérés. Míg a 0381 klinikai izolátumban jellemzően a különböző foszfatidilkolin és foszfatidiletanolaminok mennyiségében figyeltünk meg kisebb növekedést, addig a 0387 esetében a foszfatidilglicerol és a betainok (DGTS, DGTA) jelenléte fokozódott számottevően.

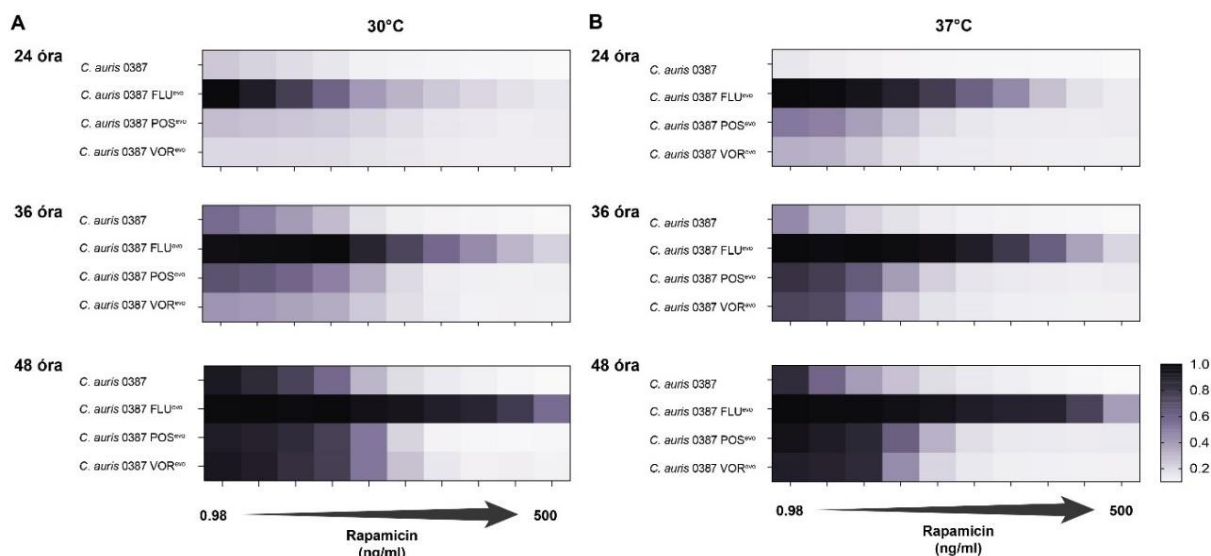
A 0381 FLU^{ev} törzs esetében a klinikai izolátumra jellemző telített foszfatidilkolinok mennyisége lecsökkent és a ceramidok, illetve diacilglicerolok és triacilglicerolok mennyisége növekedett meg. A 0381 klinikai izolátum evolált törzsei közül a legjelentősebb eltéréseket a POS^{ev} törzs esetén detektáltuk. A megváltozott lipid homeosztázis ebben a törzsben főleg az eltérő hosszúságú zsírsavlánccal rendelkező telített foszfatidilkolinok és foszfatidiletanolaminok mennyiségének jelentős növekedésével járt. Emellett, a ceramidok és diacilgliceridek, valamint triacilgliceridek mennyiségében is szignifikáns növekedést tapasztaltunk. A VOR^{ev} törzs esetében részben a POS^{ev}-val megegyező telített foszfatidilkolinok koncentrációja emelkedett jelentősen.

A klinikai izolátumhoz viszonyítva a 0387 FLU^{ev} törzsben a telítetlen foszfatidilglicerolok és betainok aránya jelentősen lecsökkent. Ezen törzs esetében egyes ceramidok (36:1; 44:0; 18:0) mennyiségében szintén csökkenést tapasztaltunk. A POS^{ev} és VOR^{ev} törzsekben ezzel szemben hasonló mintázatban számos lipid mennyiségének növekedését tapasztaltuk. Ezen lipidek bár rendkívül változatosak voltak, jellemzően telítetlen zsírsav lánccal rendelkeztek.

A metabolomikai eredményekhez hasonlóan a lipid összetétel vizsgálatának esetében is azt tapasztaltuk, hogy a rezisztencia kialakulása izolátum függő módon, rendkívül változatosan befolyásolta az evolált törzsek lipid profilját.

6.13.1. Rapamicin érzékenység vizsgálata

A rapamicin rezisztencia megjelenése kapcsolatban áll a cAMP/PKA szignalizációs útvonal működésével, mind *S. cerevisiae*-ben, mind *C. albicans*-ban. A rapamicin, a koffeinhez hasonlóan a TORC1 (Target of Rapamycin Complex 1) komplex gátlásán keresztül fejt ki hatását, így több downstream folyamatot (stressz válasz, protein és riboszóma bioszintézis) is befolyásolhat. Mivel a 0387 triazol evolált törzsekben a *BCY1* funkcióvesztéses mutáció minden esetben megnövekedett koffein toleranciával párosult, így feltételezhető, hogy *C. auris* esetében más gombákhoz hasonlóan a cAMP/PKA útvonal szoros kapcsolatban áll a TORC1 működésével. Ennek alátámasztására megvizsgáltuk a létrehozott törzsek rapamicin érzékenységét, különböző rapamicin koncentrációk mellett. A kapott OD értékeket a kezeletlen törzsek esetében mért értékekre normalizáltuk, majd hőtérképen ábrázoltuk (25. ábra).



25. ábra

A *C. auris* 0387 triazol evolált törzsek rapamicin érzékenysége

A *C. auris* 0387 triazol evolált törzsek rapamicin érzékenységét 30°C-on (A) és 37°C-on (B) vizsgáltuk. Az egyes minták optikai denzitását (OD_{600nm}) 48 órán keresztül monitoroztuk spektrofotometria segítségével. Három időpontban a leolvasott értékeket a rapamicin mentes negatív kontroll minták OD értékeire normalizáltuk majd hőtérképen ábrázoltuk. A kísérleteket két független alkalommal hajtottuk végre, két technikai párhuzamos felhasználásával.

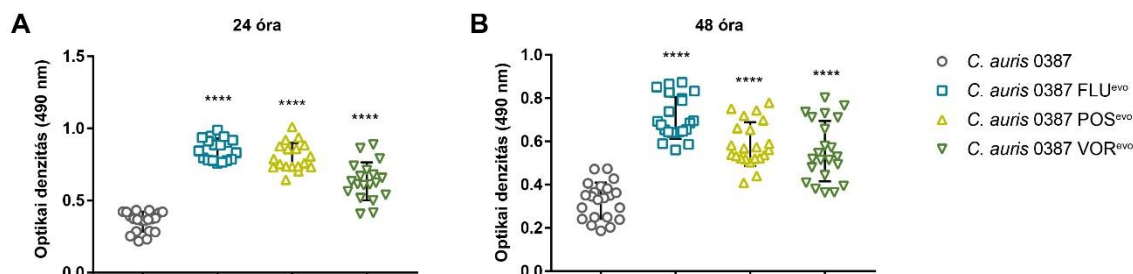
A 0387 törzsek esetén a FLU^{ev} egyértelműen rezisztenciát mutatott a rapamicinnel szemben, míg a POS^{ev} és VOR^{ev} törzsek esetében csak mérsékelt toleranciát tapasztaltunk a kiindulási izolátumhoz képest mindkét vizsgált hőmérsékleten (25A, B ábra). A megfigyelt fenotípus 37°C-on volt a legkifejezettebb, amit a meghatározott MIC értékek is alátámasztottak (16. táblázat).

16. táblázat A rapamicinnel történő kezelés során meghatározott MIC értékek

Törzsek	MIC (ng/ml)					
	24h		36h		48h	
	30°C	37°C	30°C	37°C	30°C	37°C
<i>C. auris</i> 0387	4,23	1,63	18,23	7,16	41,67	14,32
<i>C. auris</i> 0387 FLU ^{evo}	187,50	250	>500	>500	>500	>500
<i>C. auris</i> 0387 POS ^{evo}	36,46	15,63	52,08	20,83	62,50	31,25
<i>C. auris</i> 0387 VOR ^{evo}	5,86	5,86	52,08	18,23	62,50	20,83

6.13.2. Biofilm képzés

A cAMP/PKA szignalizációs útvonalhoz köthető funkciók alapján feltételeztük, hogy a *BCY1* mutációja hatással lehet a 0387 triazol evolált törzsek biofilm képző képességére is. Ennek vizsgálására 24-, és 48 órás biofilmeken XTT redukciós vizsgálatot végeztünk (26. ábra). A biofilm képzés időtartamától függetlenül minden vizsgált törzs esetében szignifikánsan megnövekedett biofilm mennyiséget figyeltünk meg (26A, B ábra).



26. ábra

0387 triazol evolált törzsek biofilm képző képességének vizsgálata

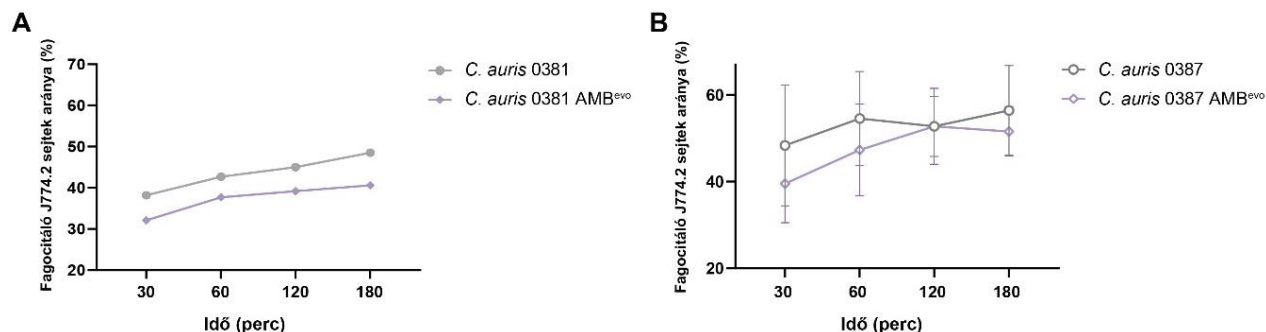
A 0387 klinikai izolátumból létrehozott triazol rezisztens törzsek biofilm képző képességét XTT redukciós vizsgálat segítségével analizáltunk. A kísérlet során 24 órás (A) és 48 órás (B) biofilmeket kezeltünk a reagenssel majd 490 nm-en leolvastuk a minták optikai denzitását. Három független kísérletet hajtottunk végre, melyek során törzsenként minimum 18 adatponttal dolgoztunk (átlag $\pm$ szórás). * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.005$; *** $p \leq 0.0005$; **** $p \leq 0.0001$ (Mann-Whitney teszt).

6.14. A J774.2 makrofágok fagocitáló képességének vizsgálata *C. auris* törzsek jelenlétében

Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk, hogy a szerzett rezisztencia kialakulása során bekövetkező sejtfal és sejtmembrán változások hogyan befolyásolják a gombasejtek makrofágokkal történő interakcióját, egérből származó J774.2 makrofág-szerű sejteket fertőztünk a létrehozott rezisztens *C. auris* törzsekkel. A makrofágok fagocitáló képességét áramlási citométer segítségével 30 percenként vizsgáltuk.

6.14.1. AMB^{ev} törzsek J774.2 makrofág szerű sejtek általi felvételének *in vitro* vizsgálata

Az AMB^{ev} törzsek fagocitózisában nem tapasztaltunk szignifikáns változást a kiindulási izolátumhoz képest, egyik vizsgált időpontban sem (27A, B ábra).



27. ábra

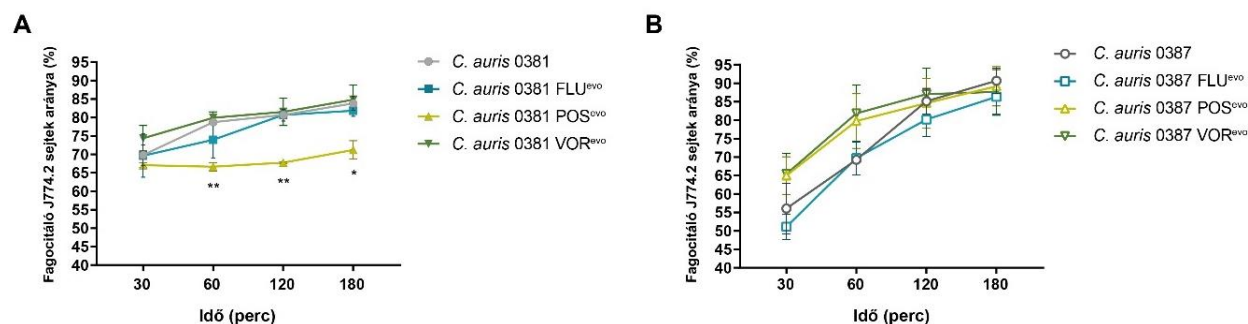
J774.2 makrofágok fagocitáló képességének vizsgálata AMB^{ev} törzsek jelenlétében

A makrofágok *C. auris* 0381 (A) és 0387 (B) amfotericin B evolált törzsekkel szembeni fagocitózis hatékonyságát vizsgáltuk (átlag ± szórás). A kísérlet során az emlős sejteket 1:5 arányban fertőztük a gombasejtekkel majd a fagocitózis hatékonyságát áramlási citométer segítségével detektáltuk 30 percenként. A feltüntetett adatok a 0381 törzs esetében egy, míg a 0387 törzs esetében három független párhuzamos kísérletből származnak, ahol alkalmanként 10⁴ gombasejt fluoreszcens jelét detektáltuk. * p ≤ 0.05; ** p ≤ 0.005; *** p ≤ 0.0005; **** p ≤ 0.0001 (párosítatlan t-teszt).

6.14.2. Triazol evolált törzsek J774.2 makrofág szerű sejtek általi felvételének *in vitro* vizsgálata

A 0381 izolátum evolált törzsei esetén a FLU^{ev} és VOR^{ev} törzsek fagocitózisa nem tért el jelentős mértékben a kiindulási izolátum vizsgálata során tapasztaltaktól (28A ábra). Ezzel szemben az egér makrofágok már alig egy órával a koinkubációt követően is kisebb hatékonysággal voltak képesek bekebelezni a 0381 POS^{ev} sejteket.

A 0387 triazol evolált törzsek esetében nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést a fagocitáló J774.2 sejtek arányában a klinikai izolátumhoz képest (28B ábra).



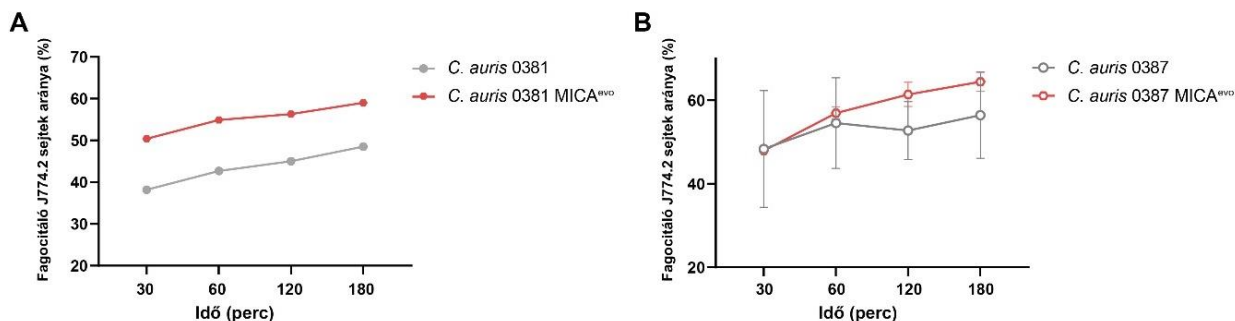
28. ábra

J774.2 makrofágok fagocitáló képességének vizsgálata triazol evolált törzsek jelenlétében

A makrofágok *C. auris* 0381 (A) és 0387 (B) triazol evolált törzsekkel szembeni fagocitózis hatékonyságát vizsgáltuk (átlag ± szórás). A kísérlet során az emlős sejteket 1:5 arányban fertőztük a gombasejtekkel majd a fagocitózis hatékonyságát áramlási citométer segítségével detektáltuk 30 percenként. A feltüntetett adatok minden törzs esetében három független párhuzamos kísérletből származnak, ahol alkalmanként 10⁴ gombasejt fluoreszcens jelét detektáltuk A * p ≤ 0.05; ** p ≤ 0.005; *** p ≤ 0.0005; **** p ≤ 0.0001 (párosítatlan t-teszt).

6.14.3. MICA^{ev0} törzsek J774.2 makrofág szerű sejtek általi felvételének *in vitro* vizsgálata

A 0381 és 0387 MICA^{ev0} törzsek esetében szintén nem találtunk szignifikáns különbségeket a fagocitáló makrofágok arányában (29A, B ábra).



29. ábra

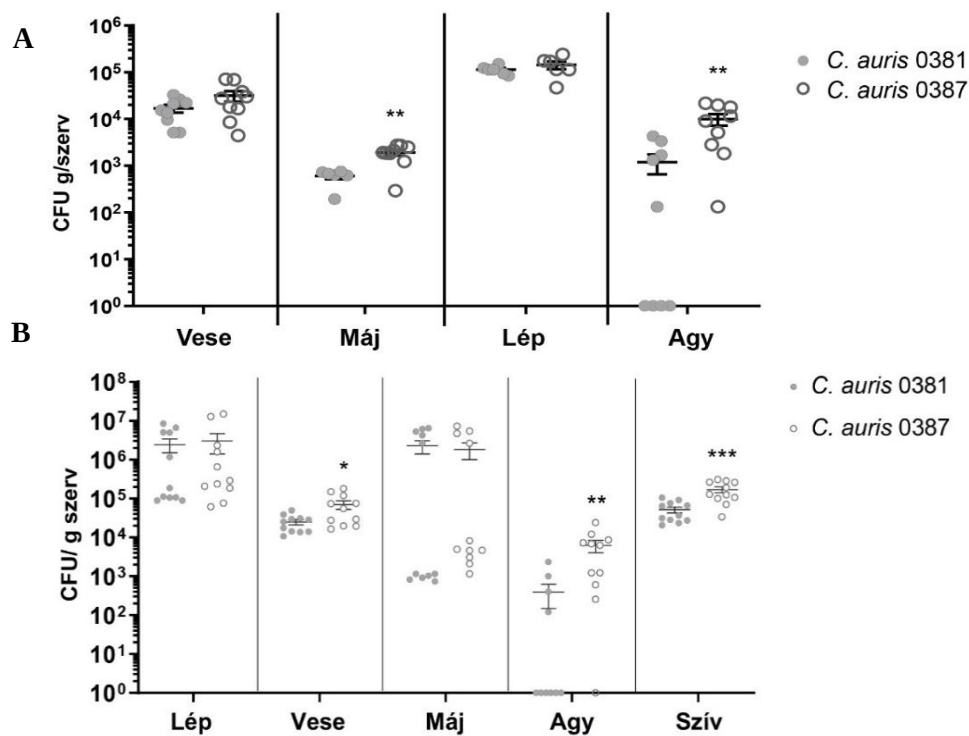
J774.2 makrofágok fagocitáló képességének vizsgálata MICA^{ev0} törzsek jelenlétében

A makrofágok *C. auris* 0381 (A) és 0387 (B) mikafungin evolált törzsekkel szembeni fagocitózis hatékonyságát vizsgáltuk (átlag $\pm$ szórás). A kísérlet során az emlős sejteket 1:5 arányban fertőztük a gombasejtekkel majd a fagocitózis hatékonyságát áramlási citométer segítségével detektáltuk 30 percenként. A feltüntetett adatok a 0381 törzs esetében egy, míg a 0387 törzs esetében három független párhuzamos kísérletből származnak, ahol alkalmanként 10^4 gombasejt fluoreszcens jelét detektáltuk. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.005$; *** $p \leq 0.0005$; **** $p \leq 0.0001$ (párosítatlan t-teszt).

6.15. *In vivo* virulencia vizsgálat egér intravénás fertőzési modellben

A mikroevolúcióval létrehozott rezisztens törzsek virulenciájának változását *in vivo* szisztémás fertőzési modell segítségével vizsgáltuk. Ehhez 8-10 hetes nőstény BALB/c egereket fertőztünk intravénásan az egyes törzsekkel, majd 3 napos inkubációt követően megállapítottuk az egyedek veséjének, májának, lépének és agyának gomba kolonizáltságát. Első lépésként összehasonlítottuk a két klinikai izolátum virulenciáját.

A kísérletek első körében a 0387 klinikai izolátum esetében a májból, illetve az agyból visszanyert élőcsíraszám szignifikánsan magasabbnak bizonyult, mint a 0381 esetében (30A ábra). A fertőzést eltérő forrásból beszerzett állatokon végrehajtva szintén a 0387 izolátum bizonyult virulensebbnek. Ebben az esetben a vesék, az agy és a szív is magasabb gomba kolonizáltságot mutatott. Ennek a megfigyelésnek feltételezhető oka, hogy ez az izolátum mivel hemokultúrából származik, eredeténél fogva már átesett egy patogenitásra vonatkozó szelekción (30B ábra).



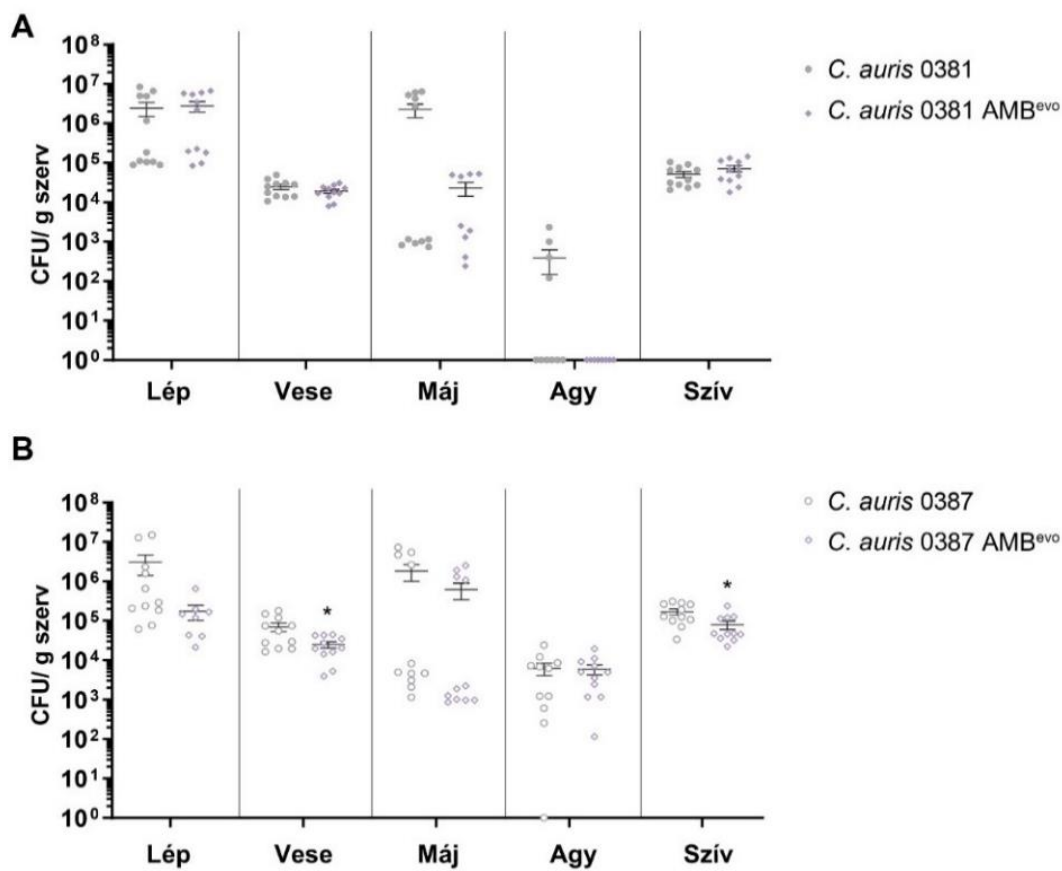
30. ábra

A *C. auris* klinikai izolátumok *in vivo* virulenciájának összehasonlítása

A *C. auris* 0381 (A) és 0387 (B) klinikai izolátumok virulenciáját két eltérő forrásból származó kísérleti állatsoporton is összehasonlítottuk. A gombasejteket (10^6 db) farokvénán keresztül történő fertőzéssel juttattuk az állatokba, majd szerveik kolonizáltságát 3 nap elteltével élőcsíraszám meghatározással vizsgáltuk. A kapott CFU értékeket az adott szerv tömegére vonatkoztattuk (átlag $\pm$ szórás). Kísérleteinket két független alkalommal ismételtük meg 5-5 kísérleti állat bevonásával. A kiugró értékeket statisztikai analízissel szűrtük ki. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.005$; *** $p \leq 0.0005$; **** $p \leq 0.0001$ (párosítatlan t-teszt).

6.15.1. AMB^{ev0} törzsek virulenciájának vizsgálata

A 0381 AMB^{ev0} virulenciájában nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést a klinikai izolátumhoz képest (31A ábra). Ezzel szemben a 0387 AMB^{ev0} törzs csökkent mértékben volt képes kolonizálni a kísérleti állatok vese és szív szövetét a kiindulási törzshez képest (31B ábra).



31. ábra

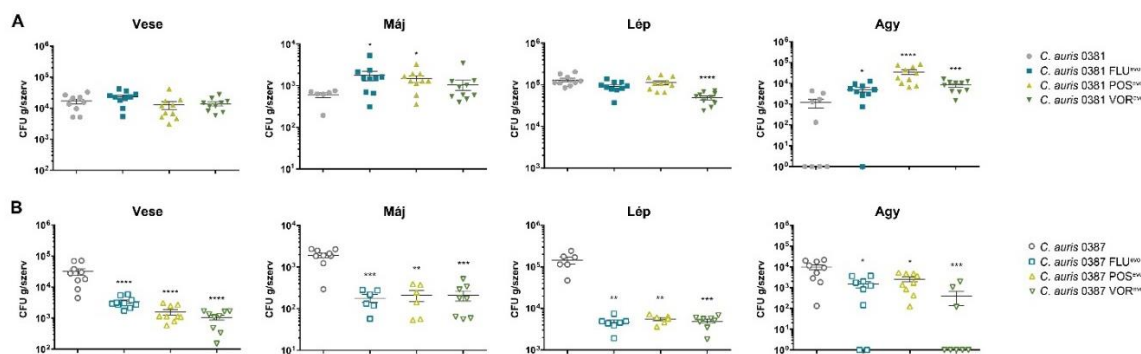
Amfotericin B evolált törzsek virulenciája *in vivo* egér fertőzési modellben

A *C. auris* 0381 (A) és 0387 (B) izolátumok, illetve a belőlük létrehozott amfotericin B evolált törzsek virulenciáját egérmodellben vizsgáltuk. Az állatokat farokvénán keresztül fertőztük (10⁶ db gombasejt), majd szerveik kolonizáltságát 3 nap elteltével élőcsíraszám meghatározással vizsgáltuk. A kapott CFU értékeket az adott szerv tömegére vonatkoztattuk (átlag± szórás). Kísérleteinket két független alkalommal ismételtük meg 5-5 kísérleti állat bevonásával. A kiugró értékeket statisztikai analízissel szűrtük ki. * p≤ 0.05; ** p≤ 0.005; *** p≤ 0.0005; **** p≤ 0.0001 (Mann-Whitney teszt).

6.15.2. Triazol evolált törzsek virulenciájának vizsgálata

A 0381 FLU^{evo} és POS^{evo} eredményesebben volt képes a máj és az agy kolonizálására, mint a klinikai izolátum (32A ábra). A 0381 VOR^{evo} esetében bár a vesékben szignifikánsan alacsonyabb CFU-t detektáltunk, az agyban ez a törzs is hatékonyabban volt képes a megtelepedésre.

Ezzel szemben a 0387 klinikai izolátumból létrehozott triazol rezisztens törzsek minden vizsgált szervet szignifikánsan kisebb mértékben voltak képesek kolonizálni, ami egységes virulenciacsökkenésre utal (32B ábra).



32. ábra

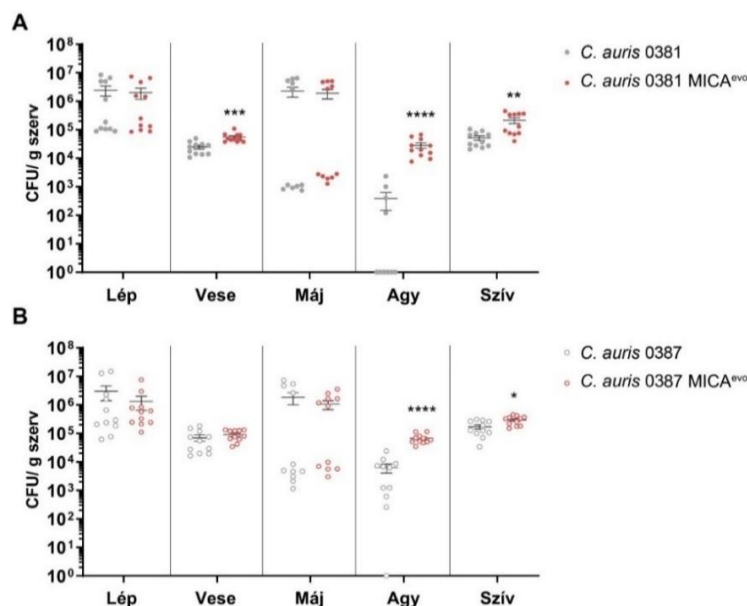
Triazol evolált törzsek virulenciája *in vivo* egér fertőzési modellben

A *C. auris* 0381 (A) és 0387 (B) izolátumok, illetve a belőlük létrehozott triazol evolált törzsek virulenciáját egérmodellben vizsgáltuk. Az állatokat farokvénán keresztül fertőztük (10^6 db gombasejt), majd szerveik kolonizáltságát 3 nap elteltével élőcsíraszám meghatározással vizsgáltuk. A kapott CFU értékeket az adott szerv tömegére vonatkoztattuk (átlag $\pm$ szórás).

Kísérleteinket két független alkalommal ismételtük meg 5-5 kísérleti állat bevonásával. A kiugró értékeket statisztikai analízissel szűrtük ki. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.005$; *** $p \leq 0.0005$; **** $p \leq 0.0001$ (Mann-Whitney teszt).

6.15.3. MICA^{ev} törzsek virulenciájának vizsgálata

A MICA^{ev} törzsek virulenciájában számos eltérést tapasztaltunk a klinikai izolátumhoz képest. A 0381 MICA^{ev} törzs nagyobb hatékonysággal volt képes a vesék, agy és szív kolonizációjára (33A ábra). A 0387 MICA^{ev} esetében pedig a kísérleti állatok agyában és szívében tapasztaltunk szignifikánsan magasabb CFU értékeket (33B ábra).



33. ábra

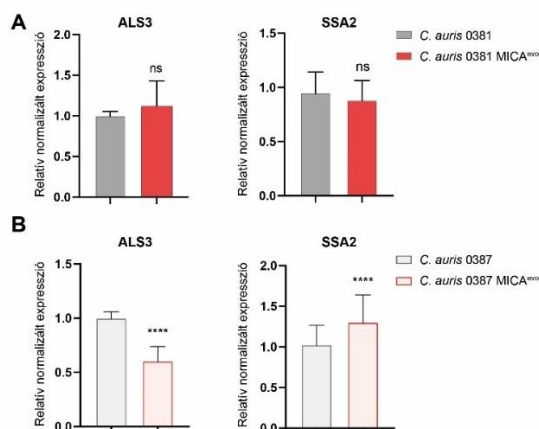
Mikafungin evolált törzsek virulenciája *in vivo* egér fertőzési modellben

A *C. auris* 0381 (A) és 0387 (B) izolátumok, illetve a belőlük létrehozott mikafungin evolált törzsek virulenciáját egérmodellben vizsgáltuk. Az állatokat farokvénán keresztül fertőztük (10^6 db gombasejt), majd szerveik kolonizáltságát 3 nap elteltével élőcsíraszám meghatározással vizsgáltuk. A kapott CFU értékeket az adott szerv tömegére vonatkoztattuk (átlag $\pm$ szórás). Kísérleteinket két független alkalommal ismételtük meg 5-5 kísérleti állat bevonásával. A kiugró értékeket statisztikai analízissel szűrtük ki. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.005$; *** $p \leq 0.0005$; **** $p \leq 0.0001$ (Mann-Whitney teszt).

6.16. Az agyszövet kolonizációjához köthető gének expressziójának vizsgálata MICA^{ev0} törzsekben

Candida fajokban az echinocandin rezisztencia jelentős fitness csökkenéssel társul, ami csökkenti a törzsek virulenciáját. Ezzel szemben, a *C. auris* esetében, mindkét MICA^{ev0} törzs szervkolonizáló képessége szignifikánsan fokozódott több szervben is, a kiindulási törzshöz képest. Ez különösen az agyban volt jelentős. Mivel az agyszövet gombák általi kolonizációja több neurodegeneratív betegség esetében is ismert, így célunk volt ennek a jelenségnek a szélesebb körű vizsgálata. Ehhez olyan gének expresszióját vizsgáltuk, melyek szakirodalmi adatok alapján potenciálisan szerepet játszhatnak az agyszövet kolonizációjában.

A 0381 MICA^{ev0} törzs esetében sem a *ALS3* sem az *SSA2* gének expressziójában nem tapasztaltunk különbséget a kiindulási izolátumhoz képest (34A ábra). Ezzel szemben a 0387 MICA^{ev0} törzsben az *ALS3* csökkent expressziója mellett, az *SSA2* kifejeződésének megemelkedését tapasztaltuk (34B ábra).



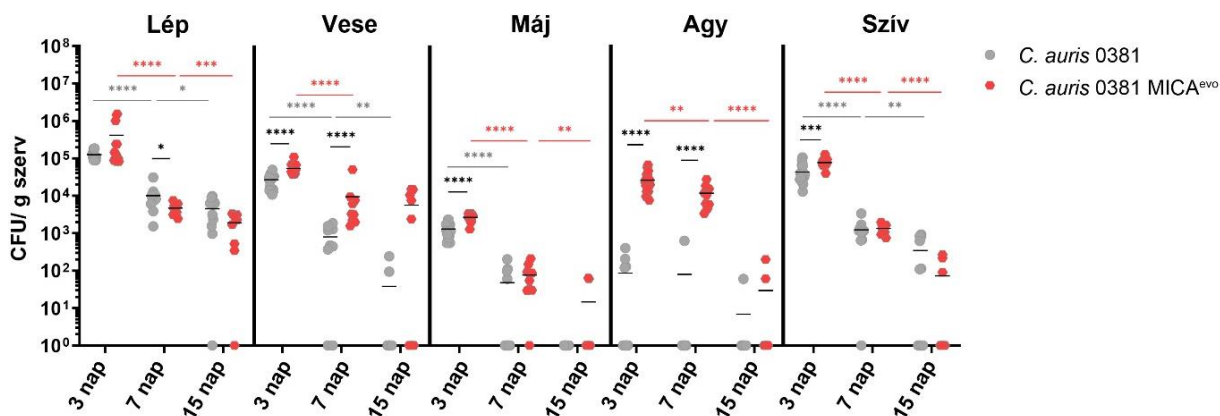
34. ábra

Megnövekedett agyi kolonizációval összefüggésbe hozható gének expressziójának vizsgálata

Az agyszövet megnövekedett kolonizációjában feltehetőleg szerepet játszó gének expresszióját valós idejű PCR segítségével vizsgáltuk. Az ábrázolt adatok 3 független kísérletből származnak (átlag $\pm$ szórás). * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.005$; *** $p \leq 0.0005$; **** $p \leq 0.0001$ (Mann-Whitney teszt).

6.17. Szervek gomba kolonizáltságának vizsgálata hosszú távú fertőzés esetén

A 3 napos fertőzési időt követően mindkettő MICA^{ev0} törzs eredményesebben volt képes kolonizálni egyes szerveket (vese, agy, szív), mint a klinikai izolátumok. Ezekkel a törzsekkel hosszabb távú *in vivo* kísérleteket is elvégeztünk választ keresve arra a kérdésre, hogy a gazdaszervezet hosszútávú védekező funkciói képesek-e akadályt szabni a fertőzés további terjedésének. Ezen kísérletek esetében a kísérleti állatok fertőzését a korábbiak szerint, ugyanazzal a gomba dózissal hajtottuk végre, de a 3 napos inkubációs idő mellett az egyes szervekben a CFU értékeket 7 nap, 15 nap (35. ábra), illetve a 0387 törzsek esetében 30 nap után is meghatároztuk (36. ábra).



35. ábra

A 0381 MICA^{evo} törzs szerv kolonizációs képessége hosszú távú kísérlet esetén

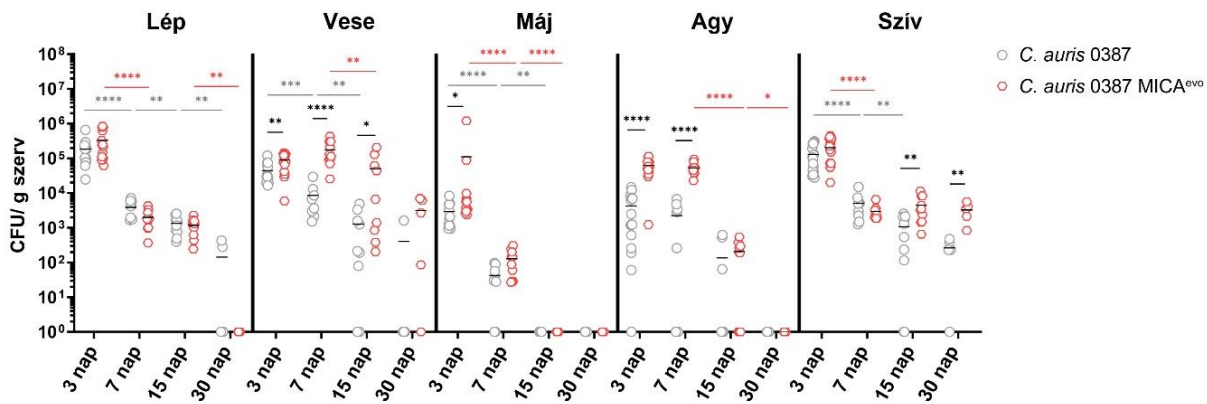
A *C. auris* 0381 izolátum, illetve a belőle létrehozott mikafungin evolált törzs virulenciáját 8-10 hetes, nőstény BALB/c egérmodellben vizsgáltuk. A gombasejteket (10⁶ db) farokvénán keresztül történő fertőzéssel juttattuk az állatokba, majd szerveik kolonizáltságát 3 nap, 7 nap és 15 nap elteltével élőcsíraszám meghatározással vizsgáltuk. A kapott CFU értékeket az adott szerv tömegére vonatkoztattuk (átlag± szórás). Kísérleteinket két független alkalommal ismételtük meg alkalmanként minimum 5 kísérleti állat bevonásával. A kiugró értékeket statisztikai analízissel szűrtük ki. * p ≤ 0.05; ** p ≤ 0.005; *** p ≤ 0.0005; **** p ≤ 0.0001 (Mann-Whitney teszt).

A 0381 klinikai izolátum és MICA^{evo} esetében is általánosságban elmondható, hogy a fertőzéstől számított idő előrehaladtával a vizsgált szervekben detektálható gombasejtek mennyisége csökken, ami a feltisztulási folyamat eredményességére utal. Ez alól kivételt képez a 0381 MICA^{evo} törzsszel fertőzött kísérleti állatok veséje. Ezen szerv esetében megfigyelhető, hogy amellet, hogy az evolált törzsre minden vizsgált időpontban magasabb élőcsíra szám volt jellemző, a szöveti feltisztulás sem történt meg két héttel a fertőzést követően sem. Ezzel szemben, annak ellenére, hogy a veséhez hasonlóan az evolált törzs rövid távú fertőzés esetében (3nap) a májat, agyat és a szívet is hatékonyabban kolonizálta, mint a klinikai izolátum, a hosszútávú eredmények arra utalnak, hogy az adaptív immunfolyamatok ezekben a szervekben képesek a gombasejtek eliminációjára.

A 0387 törzsekkel fertőzött állatok esetében szintén megfigyelhető az egyes szervek feltisztulása az idő előrehaladtával. A 0381 MICA^{evo} törzshöz hasonlóan a 0387 MICA^{evo} esetében is azt tapasztaltuk, hogy hatékonyabban és tartósabban képes a vese kolonizációjára, mint a klinikai izolátum. A vesék mellett, a kísérlet korai időpontjaiban, a máj és az agy kolonizáltsága szintén magasabb volt az evolált törzsszel fertőzött állatok esetében. A klinikai izolátumhoz hasonlóan azonban ezekben a szervekben is a kísérlet 30. napjára a gombasejtek teljes eliminációját figyeltük meg. Emellett érdemes kiemelni, hogy a kísérlet későbbi időpontjaiban (15 nap, 30 nap) a MICA^{evo} törzsszel fertőzött kísérleti állatok szívében nem figyeltünk meg jelentős CFU csökkenést.

A hosszú távon elvégzett *in vivo* vizsgálatok eredményei arra utalnak, hogy mind a 0381 mind a 0387 MICA^{evo} törzs az adaptív immunrendszer aktiválódásának ellenére is eredményesebben képes a vesék kolonizálására, mint a klinikai izolátumok. Emellett a 0381 MICA^{evo} esetében a vesében

perzisztációt is megfigyeltünk. Ez a jelenség a 0387 MICA^{evo} törzssel fertőzött állatok szívében még markánsabban jelent meg. Ebben az esetben a fertőzést követő 7. és 30. nap közötti időintervallumban az élőcsíraszám nem mutatott csökkenést, ami alapján azt feltételezhetjük, hogy a szövetben kialakult egy stabil, perzisztálni képes gombasejt populáció.



36. ábra

A 0387 MICA^{evo} törzs szerv kolonizációs képessége hosszú távú kísérlet esetén

A *C. auris* 0387 izolátum, illetve a belőle létrehozott mikafungin evolált törzs virulenciáját 8-10 hetes, nőstény BALB/c egérmodellben vizsgáltuk. A gombasejteket (10⁶ db) farokvénán keresztül történő fertőzéssel juttattuk az állatokba, majd szerveik kolonizáltságát 3 nap, 7 nap, 15 nap és 30 nap elteltével élőcsíraszám meghatározással vizsgáltuk. A kapott CFU értékeket az adott szerv tömegére vonatkoztattuk (átlag± szórás). Kísérleteinket két független alkalommal ismételtük meg alkalmanként minimum 5 kísérleti állat bevonásával. A kiugró értékeket statisztikai analízissel szűrtük ki. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.005$; *** $p \leq 0.0005$; **** $p \leq 0.0001$ (Mann-Whitney teszt).

7. Értékelés

Az *in vitro* mikroevolúción alapuló kísérletek eredményesen használhatóak mind az antifungális rezisztencia okának, mind hatásának vizsgálatára. A környezeti izolátumok alacsony száma, és a nagy filogenetikai változatosság miatt ez az eljárás különösen előnyös *C. auris* esetében, mivel lehetőséget biztosít az antifungális szerekkel szemben érzékeny és rezisztens törzsek közvetlen összehasonlítására. Ezen kísérletek a legtöbb esetben a fertőzések ellen leggyakrabban alkalmazott flukonazolra koncentrálnak. A *C. auris* flukonazzal szembeni csökkent érzékenysége azonban gyakran szükségessé teszi a gyakorlatban ritkábban alkalmazott gombaellenes szerek nagyobb arányú használatát. Mivel ezen szerek alkalmazásának hatása az antifungális rezisztencia kialakulására, illetve következményeire kevésbé kutatott terület, így a megfelelő terápiás szer megválasztásához elengedhetetlen az ismereteink ezirányú bővítése.

7.1. Amfotericin B mikroevolúció

Az amfotericin B jelenlétében történő szelekciót követően, eredményeink meglepő módon arra utaltak, hogy bár a MIC értékek növekedtek, de a *C. auris* ebben a kísérleti elrendezésben jellemzően nem volt képes stabil rezisztenciát kialakítani ezzel az antimikotikummal szemben. Ez alapján feltételezhető, hogy a mikroevolúciós kísérlet során a törzsek MIC érték feletti antifungális szer koncentráció mellett tapasztalt növekedési képességében epigenetikai változásoknak is szerepe van²⁹⁴. Ez a jelenség összefügghet azzal a megfigyeléssel, hogy a *Candida* fajok azért alakítanak ki ritkán rezisztenciát amfotericin B-vel szemben, mert a folyamat jelentősen csökkenti a sejtek fitneszt, így az átmeneti változások előnyösebbek lehetnek, mint a tartós mutációk⁹⁴. A 0387 AMB^{ev0} törzs esetében csökkent érzékenységet tapasztaltunk mind flukonazzal, mind vorikonazzal szemben. Ennek feltehető oka, hogy mindkét antifungális szer csoport a plazmamembrán károsításán keresztül fejti ki hatását¹²⁹. A keresztrezisztencia, illetve a megemelkedett amfotericin B MIC értékek az ergoszterol bioszintetikus útvonal módosulására utalnak a 0387 AMB^{ev0} törzsben¹⁰⁵.

Annak ellenére, hogy az evolált törzsek nem érték el a rezisztencia határértékét, a mikroevolúciós kísérlet során egyes fenotípus jegyeik esetében változásokat tapasztaltunk. A 0381 AMB^{ev0} törzs a kiindulási izolátumhoz képest kevésbé tolerálta a sejtfal károsító ágensek (koffein, KF) jelenlétét, míg a 0387 AMB^{ev0} mind a sejtfalat (koffein), mind a membránt (SDS) érintő stresszhatásokkal szemben érzékenyebbnek bizonyult. A növekedési vizsgálat alapján az utóbbi törzs, emellett lassabban osztódott és alacsonyabb sejtkoncentráció elérésére volt képes folyékony tápoldatban mint a kiindulási izolátum, ami a viabilitás csökkenésére utal. Ennek fényében érdekes megfigyelés, hogy míg a 0381 AMB^{ev0} törzs esetében a detektált CFU értékek közvetlenül összevethetőek a klinikai izolátum esetén azonosított értékekkel, addig a 0387 AMB^{ev0} törzsszel fertőzött állatok veséiben és szívében, csak kis mértékben tapasztaltuk a gomba kolonizáció csökkenését²⁹⁵.

Eredményeink alapján annak ellenére, hogy a rezisztencia kialakulása nem volt stabil, az amfotericin B tolerancia fokozódása *in vitro* körülmények között csökkentette a törzsek fitneszt, ami *Candida* fajok esetében egy általánosan megfigyelt jelenség⁹⁴. Azonban ez a fitness csökkenés egyik evolváló törzs esetében sem volt elég ahhoz, hogy *in vivo* körülmények között a virulencia jelentős mérséklődését vagy avirulens fenotípus kialakulását okozza²⁹⁵.

7.2. Triazol mikroevolúció

Az antifungális tesztek alapján minden triazol jelenlétében szelektált törzs stabil rezisztenciát mutatott a létrehozásához használt antifungális szerre. A klinikai vizsgálatok során tapasztalt flukonazol és vorikonazol közötti keresztrezisztencia szintén megfigyelhető volt minden FLU^{evo} és VOR^{evo} törzs esetében, bár ennek genetikai háttere több esetben is tisztázatlan maradt²⁹⁶. A POS^{evo} törzsek mindhárom vizsgált antifungális szerrel szemben rezisztenciát alakítottak ki. A posakonazol keresztrezisztencia megjelenése azonban különbözött a 0381 és 0387 klinikai izolátumból létrehozott FLU^{evo} és VOR^{evo} törzsek között. Míg a 0381 FLU^{evo} és VOR^{evo} vizsgálata során csupán megemelkedett MIC értékeket tapasztaltunk, addig a 0387 FLU^{evo} és VOR^{evo} esetén jelentős keresztrezisztencia volt megfigyelhető posakonazzal szemben is. Egy 2017-ben készült esettanulmányban You és munkatársai jellemezték egy *C. tropicalis* izolátumot, amely posakonazol profilaxist követően pán azol rezisztenciát mutatott²⁹⁷. Eredményeik alapján a szokatlan rezisztencia profil megnövekedett *MDR1* efflux pumpa expresszióra volt visszavezethető. Ez alapján azt feltételezzük, hogy a 0387-es törzsek vizsgálata során tapasztalt pán azol rezisztenciát, *C. auris* esetében is az *MDR1* jelentősen megnövekedett aktivitása okozhatja, amit az efflux pumpákra vonatkozó expressziós eredmények is alátámasztanak. Emellett, a 0387 azol rezisztens törzsei caspofunginnal szemben is rezisztensnek bizonyultak. Ennek oka az azol rezisztencia kialakulása során létrejött közvetett sejtfal változás lehet. Mivel a kitin és kitin oligomerek mennyisége megemelkedett ezekben a törzsekben, feltételezhetjük, hogy ez az ismert mechanizmus állhat az echinokandinokkal szembeni megváltozott érzékenység mögött²⁸¹.

A sejtfal összetételének módosulása mellett a törzsek szterol homeosztázisában is eltéréseket tapasztaltunk. Érdekes módon a csökkent ergoszterol mennyiség egyik POS^{evo} és a 0387 VOR^{evo} törzs esetében sem okozott amfotericin B rezisztenciát. Hasonló megfigyelést korábban már *C. parapsilosis* esetében is leírták²⁷⁶. Az, hogy az amfotericin B ergoszterol hiányában is képes a gombasejtek elpusztítására azt feltételezi, hogy létezik az antifungális szernek egy ergoszterol független hatása is²⁹⁸. Az egyes szterolok közötti strukturális hasonlóság lehetőséget nyújt arra, hogy az amfotericin B ergoszteroltól eltérő szterol komponenshez kötődjön és így fejtse ki antifungális hatását. Az ergoszterol mennyiségének csökkenése a 0381 POS^{evo}, 0387 POS^{evo} és 0387 VOR^{evo} törzsekben pozitív korrelációt mutatott a törzsek membrán detergenssel (SDS) szembeni érzékenységével. A 0381 triazol evolváló törzsek esetében általános érzékenységet tapasztaltunk olyan sejtfalat károsító ágensekkel szemben, mint

a Kalkofluor fehér (KF) vagy a Kongó vörös (KV). Ez a csökkent érzékenység azonban sem a sejtfal összetételére, sem a törzsek kolonizációs képességére nem volt hatással, ami arra utal, hogy a megfigyelt fenotípus változás nem rendelkezik *in vivo* relevanciával. A sejtfal károsító ágensekkel szembeni érzékenység ellenére mind a 0381 FLU^{evo} mind a VOR^{evo} törzsek rezisztensnek bizonyultak a koffeint jelenlétére. Erre magyarázatot adhat, hogy bizonyos ABC típusú transzporterek a koffeint szubsztrátjukként használva képesek a sejtek detoxifikálására. *S. cerevisiae* esetében mind az Snq2 és Pdr5 efflux proteinek is bizonyítottan képesek a koffeint citoplazmából való eltávolítására²⁹⁹. Az ABC transzporterek expressziójának mintázata feltételezi, hogy *C. auris* evolált törzseiben hasonló folyamat lehet felelős a koffeint toleranciáért. A *PDR5* *C. auris*-ban található ortológja a *CDR1* megnövekedett expressziója a 0381 FLU^{evo} és VOR^{evo} törzsekben arra utal, hogy ez a transzporter szintén képes lehet a sejtfal károsító ágens eltávolítására. *C. parapsilosis* mikroevolúcióval létrehozott triazol rezisztens törzseiben hasonló megfigyelést szintén potenciálisan az ABC transzporterek megemelkedett expressziójára vezettek vissza²⁹⁹.

Az azolokkal történő hosszútávú kezelés szignifikánsan megváltoztatta a törzsek membrán szterol összetételét. Míg a 0381 FLU^{evo}, 0381 VOR^{evo} és 0387 FLU^{evo} a klinikai izolátumokhoz hasonló szterol profilt mutattak, addig a 0381 POS^{evo}, 0387 POS^{evo} és 0387 VOR^{evo} törzsekben az ergoszterol mennyiségnek szignifikáns csökkenése vagy teljes hiánya volt jellemző. Ezekben a törzsekben olyan melléktermékek akkumulációja volt megfigyelhető, mint a fekoszterol/episzterol/ergosztadienol. Annak ellenére, hogy az ergoszterol fő feladata a membrán integritás fenntartása, egyes *C. albicans* klinikai izolátumokban megfigyelték, hogy alternatív szterol melléktermékek is képesek hasonló funkciót ellátni^{300–302}. Ez alapján feltételezhetjük, hogy az evolált törzsekben ezen alternatív szterolok szintén képesek a membrán homeosztázis stabilizálására.

A vizsgálat során egy korábban karakterizálatlan szterol terméket is azonosítottunk. Az ismeretlen szterol összegképlete, illetve annak alapján, hogy az ergoszterolhoz kapcsolódva jelent csak meg, azt feltételeztük, hogy a C₂₈H₄₄O₂ (portenszterol) egy alternatív útvonal aktivációjához köthető.

Az antifungális kezelést követően minden törzs esetében, ahol a membrán tartalmazott ergoszterolt, annak mennyisége lecsökkent. Az ergoszterol/fekoszterol/episzterol helyett azonban ezen törzsek membránjában lanoszterol/obtusifoliol és 14-metil-ergoszterol volt megfigyelhető. Ez összeegyeztethető az azolok hatásmechanizmusával, mivel ezek a termékek az Erg11 által katalizált reakciótól upstream jellemzőek. Mindkét klinikai izolátumban az alternatív útvonal aktivációjára utal a 14-metil-fekoszterol, illetve az ebből képződő toxikus 14-metil-ergosztadién-diol megjelenése. A toxikus melléktermék azonban hiányzott a 0387 POS^{evo} és VOR^{evo} törzsekben. Az ezidáig karakterizálatlan C₂₉H₄₆O (stigmatsteron) szintén csak ebben a két törzsben volt jellemző, amiből arra következtethetünk, hogy a szterol termék ehhez az alternatív útvonalhoz köthető. A 14-metil-ergosztadién-diol, illetve az

ergosterol teljes hiánya a 0387 POS^{evo} törzsben a C5 deszaturáz (*ERG3*) funkcióvesztésére utal. Ez a megfigyelés a teljes genom szekvenálás során igazolást nyert. A 0387 POS^{evo} *ERG3* génjében olyan aminosav cserét tapasztaltunk, ami korai STOP kodon beépülését eredményezi. Szakirodalmi adatok hiányában így első alkalommal találtunk összefüggést *C. auris*-ban a posakonazol rezisztencia kialakulása és az *ERG3* mutációja között. Egyes evolált törzsek lipid összetétele szintén a plazmamembrán homeosztázisának megváltozására utal. A 0387 FLU^{evo} törzset leszámítva minden generált rezisztens törzs esetében számos, változatos zsírsavlánc hosszúsággal és telítettséggel rendelkező foszfatidilkolin és foszfatidilinozitol komponens megnövekedett jelenlétét találtuk. Bár ezek az eredmények összhangban vannak a szakirodalmi adatokkal, azonban érdemes megjegyezni, hogy az evolált törzsek lipid profilja egymástól is jelentős eltérést mutatott, utalva a rezisztencia kialakulásának változatosságára^{240,241}. Szfingolipidek közül a ceramid mennyiségének növekedését tapasztaltuk a 0387 POS^{evo} és VOR^{evo} törzsekben. Feltételezhető, hogy ezen komponens - mint az efflux pumpákat magába foglaló mikrodomének alkotója -, közvetlenül is részt vesz az antifungális rezisztencia kialakításában²⁴¹. A ceramid feltételezett funkciójának ellentmond, hogy a 0387 FLU^{evo} esetében nem találtunk egyértelmű korrelációt a ceramidok mennyisége, illetve az efflux pumpák expressziós mintázata között. Ezen adatok alapján a ceramidok efflux proteinekkel való feltételezett asszociációja további vizsgálatokat igényel.

A lipidomikai analízis mellett a sejtek metabolomikai vizsgálata is arra utal, hogy *C. auris* esetében az antifungális szerekhez történő adaptáció során bekövetkező anyagcsere változások nem univerzálisak és törzsenként eltérhetnek egymástól. Egyetlen olyan metabolitot azonosítottunk, melynek mennyisége antifungális szertől független módon mindhárom 0381 evolált törzsben megnőtt. Szakirodalmi adatok alapján azt feltételezhetjük, hogy a piroszőlősav, hozzájárult ahhoz, hogy ezen törzsek hatékonyabban voltak képesek *in vivo* körülmények között a gazda szerveinek kolonizálására^{303,304}. A 0387 POS^{evo} és VOR^{evo} törzsekben detektált megemelkedett triptamin és 5-metoxitriptamin mennyisége arra utal, hogy a sejtekben a triptofán anyagcsere alternatív ága aktiválódott. Ezen alternatív útvonal végterméke a melatonin, egy bioaktív molekula, ami *S. cerevisiae* esetében bizonyítottan antioxidánsként játszik szerepet a gombasejtek oxidatív károsodással szembeni védelmében. Bár vizsgálataink során nem tapasztaltuk, hogy ennek az anyagcsere változásnak *in vivo* körülmények között hatása lenne a patogén életképességére, mégis érdemes kiemelni, hogy *C. auris* esetében ezen indirekt hatások feltételezhetően nagyban hozzájárulnak ahhoz, hogy az antifungális rezisztencia kialakulása csak ritkán csökkenti drasztikusan a sejtek fertőzőképességét^{305,306}.

Korábbi triazol rezisztens izolátumokkal foglalkozó tanulmányokkal egyetemben a teljes genom szekvenálás során a 0381 FLU^{evo} és VOR^{evo} törzsekben mutációt találtunk a *TAC1B* génben. Rybak és munkatársainak munkája alapján tudjuk, hogy a gén által kódolt transzkripció faktor felelős a Cdr1 transzporterek expressziójának szabályozásáért¹⁶⁴. *Candida* fajok esetében a rezisztencia kialakulásának

egyik leggyakoribb mechanizmusa az efflux aktivitás növekedése. A transzporterek funkcionális aktivitását Nílus vörös fluoreszcens festék segítségével vizsgáltuk. Eredményeink alapján a 0381 klinikai izolátum eredetű evolált törzsek kevésbé hatékonyan voltak képesek a festék citoplazmából történő eltávolítására, mint a 0387 eredetű rezisztens törzsek. A jelentős eltérések pontosabb vizsgálta érdekében génexpressziós vizsgálatokat is végeztünk. A 0381 FLU^{evo} és 0381 VOR^{evo} törzsben tapasztalt megnövekedett *CDR1* expresszió jól korrelált a teljes genom szekvenálás során talált *TAC1B* mutációval. A 0387 triazol evolált törzsek egységesen magas *MDR1* expressziót mutattak. Ez alapján azt feltételezhetjük, hogy az Mdr1 nagy hatékonysággal képes a Nílus vörös citoplazmából történő eltávolítására.

A szekvencia analízis alapján a 0387 azol evolált törzsek egységesen funkcióvesztést okozó aminosav cserét (R160S) hordoztak a *BCY1* génjükben. A *BCY1* a cAMP-függő protein kináz (PKA) szignalizációs útvonal szabályozásáért felelős alegységet kódol *S. cerevisiae*-ben és *C. albicans*-ban is. *Candida* fajokban a Bcy1 a Tpk1 és Tpk2 katalitikus alegységekhez kötődve képes gátolni a PKA útvonal működését. Bizonyos extracelluláris stimulusok hatására (glükóz, aminosavak), a Bcy1-hez cAMP kötődik, ami a fehérje konformáció változását és a gátlás megszűnését okozza³⁰⁷. A PKA más szignalizációs hálózatokkal is szoros kapcsolatban működik. Ilyenek például a TORC1 (Target of Rapamycin Complex 1), illetve a CWI (Cell Wall Integrity) útvonalak, melyek sejtes funkciók széles spektrumát szabályozzák^{308,309}. 2015-ös tanulmányukban Chatterjee és munkatársai a *C. auris* genomjának analízise során kiemelték a PKA útvonal potenciális jelentőségét az antifungális rezisztencia kialakulásában²⁰⁶. Emellett korábbi munkájukban Zamith-Miranda és munkatársai a Tpk2 megemelkedett mennyiségét találták a flukonazol rezisztens *C. auris* MMC-1 törzsben, tovább erősítve a szignalizációs útvonal potenciális jelentőségét²⁴¹. Eredményeink alapján feltételezhető, hogy a 0387 azol rezisztens törzsek koffein rezisztenciája kapcsolatba hozható a *BCY1*-ben megfigyelt funkcióvesztéses mutációval. *S. cerevisiae* esetében tudjuk, hogy a *BCY1* delécioja rapamicin rezisztenciát okoz. Mivel a rapamicin a koffeinhez hasonlóan a TOR szignalizáció gátlásán keresztül fejt ki hatását feltételezhető, hogy a két szignalizációs útvonal kapcsolatban áll egymással³¹⁰. A *BCY1*-ben mutációt hordozó törzsek rapamicinnel való kezelése során azt tapasztaltuk, hogy az evolált törzsek toleránsabbak a rapamicin jelenlétére, mint a klinikai izolátumok. Ez a fenotípus a 0387 FLU^{evo} törzs esetén volt a leghangsúlyosabb. Ennek valószínűsíthető oka, hogy a másik két törzsben az ergosterol hiányában megváltozott membrán permeabilitás fokozta a toxikus anyagok intracelluláris akkumulációját³¹¹. Ezt alátámasztják korábbi tanulmányok, melyek alapján az ergosterol bioszintézisben résztvevő enzimek (*ERG3*, *ERG5*, *ERG6*) mutációja növeli a rapamicinnel szembeni érzékenységet^{312,313}. Az azonosított *BCY1* pontmutáció számos fenotípus változással összefüggésbe hozható. Más gombafajok vizsgálata alapján ismert, hogy a PKA szignalizációs útvonal konstitutív

működésének hatására a gombasejtek nem képesek a környezet tápanyag-ellátottságához megfelelően alkalmazkodni, így a források kimerülése után gyorsan veszítenek életképességükből³¹⁴. Ezt alátámasztja, hogy a növekedési kinetika alapján a *BCY1* génjükben mutációt hordozó 0387 triazol rezisztens törzsek komplex tápoldatban gyorsabban osztódnak a klinikai izolátumnál, viszont korábbi időpontban és alacsonyabb sejtkoncentrációnál érik el az osztódás plató fázisát, utalva a tápanyag források kimerülésére. *C. albicans* esetében a PKA szignalizációs útvonal az Efg1 és Flo8 transzkripció faktorok szabályozásában is szerepet játszik, amik egyaránt hatással vannak a biofilm képzésre, az antifungális rezisztenciára és a virulenciára^{315,316}. Ezt alátámasztva a 0387 klinikai izolátum eredetű rezisztens törzsek mind 24, mind 48 óra után fokozott biofilm képzést mutattak. Kim és munkatársai szintén kiemelték a cAMP/PKA útvonal szerepét *C. auris*-ban. Munkájuk alapján a *BCY1* deléciója ebben a fajban is számos sejtes folyamatot befolyásol. Kimutatták, hogy a szabályozó fehérje hiánya megemelkedett *CDR1* és *MDR1* expressziót, az ergosterol bioszintézis útvonalban bekövetkező változásokat és megemelkedett biofilm képzést eredményez³¹⁷. Ez alapján feltételezhetjük, hogy a hosszútávú antifungális kezelés hatására kialakult *BCY1* mutáció közvetlenül kapcsolatba hozható a triazol rezisztencia kialakulásával.

Az *in vivo* vizsgálatok első lépéseként a szakirodalmat alátámasztva, két eltérő forrásból származó kísérleti állatok felhasználásával is bizonyítottuk a 0387-es, eredetileg hemokultúrából izolált törzs fokozott virulenciáját a fülvadákból származó izolátumhoz (0381) viszonyítva. A 0381 azol evolált törzsek esetében a kísérleti állatok májában és agyában is fokozott gomba általi kolonizációt tapasztaltunk. Érdekes módon a legjelentősebb CFU növekedés a 0381 POS^{evo} törzzsel fertőzött kísérleti állatok agyában volt jellemző, annak ellenére, hogy ez a törzs reagált legérzékenyebben az abiotikus stressz hatásokra. A 0387 azol rezisztens törzsekkel fertőzött állatok esetében egységesen a CFU értékek csökkenését tapasztaltuk. Erre esetleg magyarázatot adhat az evolált törzsekben megfigyelt eltérő sejtfal kompozíció. Bruno és munkatársai kimutatták, hogy bár a *C. auris* sejtekben a *C. albicans*-hoz viszonyítva a mannánok sejtfelszíni jelenléte kevésbé kifejezett, azonban a sejtfal komponens tisztított formában jelentősebb citokin válasz kiváltására képes PBMC sejtekben²¹⁹. Ez arra utal, hogy a 0387 azol evolált sejtekben az α -mannán megnövekedett mennyisége fokozott immunválaszt és ebből adódóan a szervek gyorsabb feltisztulását okozza. A mannánok mellett a kitin, valamint a kitin oligomerek mennyisége is megnövekedett, ami szintén az immunsejtek általi felismerés eredményességét növelheti³¹⁸. Feltételezhető továbbá, hogy ezekben a törzsekben a PKA útvonal konstitutív aktivációja is hozzájárul a virulencia csökkenéséhez az által, hogy gátolja a megváltozott tápanyag ellátottsághoz való optimális adaptációt³¹⁷.

7.3. Mikafungin mikroevolúció

Az antifungális érzékenység tesztek alapján mindkét mikafungin jelenlétében növesztett törzs (0381 MICA^{evo}, 0387 MICA^{evo}) stabilan rezisztenciát szerzett a létrehozásukhoz szükséges antifungális szerrel szemben. A mikafungin mellett mindkét evolált törzs rezisztensnek bizonyult egyéb echinocandinokkal, mint az anidulafunginnal és caspofunginnal szemben is. Az univerzális echinocandin rezisztencia mellett a 0387 MICA^{evo} törzs esetében jellemző volt az azol keresztrezisztencia (flukonazol, posakonazol, vorikonazol) megjelenése is, továbbá az amfotericin B MIC érték is jelentősen megnövekedett - bár ezutóbbi a CDC által javasolt rezisztencia határértéket nem lépte át. A multidrog rezisztencia kialakulása ellenére ez a törzs, a klinikai izolátumhoz viszonyítva nem mutatott jelentős érzékenységet a vizsgált abiotikus stresszhatásokra. Ezzel szemben a 0381 MICA^{evo} törzs érzékenynek bizonyult az alkalmazott sejtfa károsító ágensekkel szemben, ami arra utal, hogy az antifungális szerekekkel szembeni adaptáció a sejtfa szintézis módosulását okozta. Ennek bizonyítására a létrehozott törzsekben vizsgáltuk az egyes sejtfa alkotó komponensek arányát. Mindkét törzs esetében az α -mannán mennyiségének szignifikáns növekedését tapasztaltuk. Emellett a dectin-1 Fc fluoreszcens intenzitása a β -glükán mennyiségének szignifikáns csökkenésére utal a 0381 MICA^{evo} törzs esetében, míg a 0387 MICA^{evo} törzsnél emelkedő tendenciát tapasztaltunk. Mivel a β -glükán szintéziséért felelős enzim az echinocandin típusú antifungális szerek cél enzime, így a sejtfa komponens eltérő mennyisége arra utal, hogy a rezisztencia mechanizmusa nem teljesen egyezik meg a két törzsben¹²⁹. Az, hogy az α -mannán megemelkedett mennyisége ellenére nem tapasztaltunk szignifikáns változást az evolált törzsek J774.2 eger makrofág-szerű sejtek általi fagocitózisában arra utal, hogy ezen sejtvonal esetében az α -mannán nem vesz részt a gombasejtek felismerésében^{318,319}. Ezt a megfigyelést a 0387 azol rezisztens törzsek vizsgálta során tapasztalt eredmények is alátámasztották.

A mikafungin jelenlétében evolált törzsek teljes genom szekvenálása alapján mindkét esetben az *FKS1* gén mutációjára vezethető vissza a rezisztens fenotípus. A 0381 MICA^{evo} törzs a két funkcióvesztéssel járó *FKS1* mutáció (D642Y, R1354S) mellett, az *AAF1* sejtadhézióban szerepet játszó génben is hordozott mutációt. Az utóbbi esetben a detektált aminosav csere a STOP kodon elvesztését okozta, ami feltehetőleg hosszabb transzkriptet és megváltozott funkciót eredményez. A 0387 MICA^{evo} törzsben található *ERG3* pontmutáció az enzim aktivitásának csökkenését okozta. Ez magyarázatot ad az antifungális tesztelés során megfigyelt triazol keresztrezisztenciára¹²⁹. Szekvencia adatok alapján ez a törzs szintén feltehetőleg funkcióvesztéssel járó aminosav cserét hordozott az *FKS1* génben, ami az echinocandin rezisztenciát okozta. Érdekes megfigyelés továbbá, hogy a 0387 MICA^{evo} a triazol evolált törzsekhez hasonlóan mutációt hordozott a *BCY1* PKA inhibitor kódoló génben. Ehhez azonban a *BCY1* által gátolt katalitikus alegységet kódoló génben (*TPK2*) is társult egy pontmutáció. Ez alapján feltételezhető, hogy az inhibitor funkcióvesztése miatt konstitutívan aktív PKA szignalizációt

ellensúlyozza a katalitikus alegység redukált működése, mely ezidáig még ismeretlen módon játszhat szerepet a *C. auris* antifungális rezisztenciájában³¹⁷. Ezt az elméletet alátámasztja, hogy a 0387 MICA^{ev0} törzs esetében nem tapasztaltuk a *BCY1* mutációra visszavezethető koffein rezisztenciát.

Annak ellenére, hogy a szakirodalmi adatok alapján az *FKS1* gén mutációja, illetve a szerzett echinocandin rezisztencia a *Candida* nemzetség klinikailag releváns képviselőiben virulencia csökkenést okoz, ezt a fenotípus változást *C. auris* esetében nem figyeltük meg¹⁹². Az *in vivo* kísérletek során mind a 0381 MICA^{ev0}, mind a 0387 MICA^{ev0} törzsekkel történő fertőzés során a kísérleti állatok agyának és szívének fokozott kolonizációját figyeltük meg. Szakirodalmi adatok alapján *C. albicans* esetében az agyi kolonizációban szerepet játszik az *ALS3*, illetve az *SSA2* gének expressziójának növekedése³²⁰. *C. auris* esetében csupán a 0387 MICA^{ev0} törzsben figyeltük meg az *SSA2* transzkriptek növekedését. Ez arra utal, hogy a két eltérő izolátumból kiindult evolválts törzs esetében feltehetőleg különbség van a megfigyelt magasabb agyi kolonizáció mögött álló mechanizmusban. Annak vizsgálatára, hogy a magasabb élőcsíraszám stabilan megmarad-e a gazdaszervezetben az *in vivo* kísérleteket hosszabb inkubációs idők bevonásával is elvégeztük. Eredményeink alapján a korai időpontban tapasztalható magas kolonizáltság ellenére az agyszövet mindkét evolválts törzs esetében csaknem teljesen feltisztult. Ezzel szemben míg a 0381 MICA^{ev0} törzs a vesében, addig a 0387 MICA^{ev0} törzs a szívben volt képes fennmaradni és stabil gombasejt populációt kialakítani. Ez az eredmény egybeesik azon megfigyelésekkel, melyek szerint a *C. auris* egyes törzsei képesek tartósan perzisztálni a szervezetben, ami az immunstátusz gyengülése esetén potenciális fertőzésforrást eredményezhet^{76,269,321}. Az, hogy ezen törzsek annak ellenére is képesek a szervezetben fennmaradni, hogy csaknem az összes rendelkezésre álló antifungális szerrel szemben rezisztenciát biztosító mutációkat hordoznak, arra utal, hogy a *C. auris* nagy ütemű terjedéséhez az is hozzájárul, hogy ez a feltörekvő patogén a rezisztencia kialakulásának ellenére nem veszít számottevően a fertőzőképességéből.

8. Összefoglalás

A gombák által okozott fertőzések jelentős egészségügyi jelentőséggel bírnak. A humánpatogének közül a *Candida* fajok tehetőek felelőssé a megbetegedések (*candidiasis*) jelentős hányadáért. A *Candida* fajok jellemzően opportunista módon képesek a szervezet megtámadására és súlyosabb esetben az egész szervezetet érintő invazív fertőzéseket idéznek elő. A már viszonylag széleskörűen tanulmányozott *C. albicans* helyett napjainkban a kevésbé ismert *Candida* fajok által kiváltott fertőzések aránya egyre növekszik. Az invazív *candidiasis* kezelésére napjainkban mindössze három antifungális szer csoport van forgalomban. Ezek közül az első a poliének csoportjába sorolható amfotericin B, ami a gomba sejtmembránjában található ergosterolhoz kötődve csatornákat hoz létre, így felborítva a sejt homeosztázisát. Mivel az eukarióta sejtek közül csak a gombák membránjára jellemző az ergosterol megjelenése, így ideális célpontjai a gomba ellenes kezeléseknek. Azonban az ergosterol és az emlős sejtek membránjában található koleszterol jelentős strukturális hasonlósága miatt az ezen komponenst célzó gomba ellenes szerek gyakran a gazdaszervezetet is károsítják. Az antifungális szerek másik csoportját képező triazolok szintén ergosterol függő módon hatnak, de ezek a bioszintézis gátlásán keresztül befolyásolják a gomba osztódását. Abból adódóan, hogy ezek a szerek nem pusztítják el aktívan a gombasejtet, gyakran alakul ki ellenük rezisztencia. A legrövidebb ideje forgalomban lévő gomba ellenes szerek az echinocandinok, melyek a gomba sejtfal esszenciális komponensének, a β -glükánnak a bioszintézisét gátolják.

A *Candida* nemzetségbe sorolható feltörekvő patogének egyik legrövidebb múltra visszatekintő tagja a *C. auris*. Ezt a patogént elsőként 2009-ben Japánban izolálták, egy kórházi páciens fülváladékából. Jellemzését követően az egyes *C. auris* törzseket izolálásuk földrajzi helye, majd később genetikai alapon öt kládba sorolták. Az egyes kládokon belül az izolátumok nagy mértékű genetikai hasonlóságot mutatnak, azonban az egyes kládok képviselői között akár több százezer nukleotid különbség is előfordulhat. Epidemiológiai adatok alapján főként az I, III és IV kládból származó törzsek képesek szisztémás fertőzések kialakítására. Emellett ezen kládok esetében figyelhető meg legnagyobb arányban a *C. auris*-ra kiemelten jellemző antifungális rezisztencia kialakulása is, melynek már számos mechanizmusát azonosították ebben a fajban.

A klinikumban izolált *C. auris* rezisztens törzsek nagy része mutációt hordoz az antifungális szer célnímét kódoló *ERG11* génben. További gyakran azonosított triazol érzékenységet csökkentő mechanizmus az ABC típusú, Cdr1 efflux transzportert kódoló gén megnövekedett expressziója. Ez a jelenség több független szerző által bizonyítottan, a Tac1B transzkripció faktor kódolásáért felelős génben bekövetkező aminosavcserére vezethető vissza. A *C. auris* izolátumok nagyjából egyharmadára jellemző amfotericin B rezisztencia, amit általában az ergosterol bioszintézisében szerepet játszó gének

mutációja okoz. A többi klinikailag jelentős *Candida* fajhoz hasonlóan az echinocandin rezisztencia ezen faj esetében is az *FKS1* glükán-szintáz kódoló gén módosulásához köthető.

Munkánk során *in vitro* mikroevolúciós módszerrel hoztunk létre antifungális szerekkel szemben rezisztens törzseket. Ehhez két eltérő genomi háttérű, antimikotikumokra érzékeny klinikai izolátumot használtunk. A 0381 (klád II) törzset fülvadákból izolálták, míg a 0387 (klád I) hemokultúrából származik. Ezen törzseket a poliének csoportjába sorolható amfotericin B, a triazolok közé tartozó flukonazol, posakonazol és vorikonazol, míg az echinocandinok csoportjába tartozó mikafungin emelkedő koncentrációjával kezeltük. A létrehozott törzsek antifungális vizsgálata rámutatott, hogy amfotericin B-vel szemben ebben a kísérleti felépítésben nem alakul ki stabil rezisztencia. A további törzsek minden esetben rezisztenciát mutattak a létrehozásukhoz használt antifungális szerrel szemben. Emellett több esetben keresztrezisztenciát is tapasztaltunk az egyes szerek, illetve szercsoportok között. Kiemelendő, hogy a keresztrezisztenciák megjelenése főként a 0387 klinikai izolátumból létrehozott törzsekre volt jellemző. A 0387 MICA^{evo} az antifungális érzékenység alapján csupán az amfotericin B kezelésre reagált, de ezen szer MIC értéke is jelentősen megnövekedett, így a törzs csaknem pán-drog rezisztensnek volt tekinthető (PDR).

A létrehozott rezisztens törzsek jelentős részében megváltozott abiotikus stressz toleranciát tapasztaltunk. A mikafungin szelekció hatására a 0381 MICA^{evo} törzs általános érzékenységet mutatott a sejtfal károsító ágensekkel szemben annak ellenére, hogy a sejtfal komponensek mennyiségének arányában nem találtunk jelentős eltéréseket ebben a törzsben. A triazol rezisztens törzsek esetén tapasztalt membrán detergens érzékenység (0381 POS^{evo}, 0387 POS^{evo}, 0387 VOR^{evo}) korrelációt mutatott az ergosterol mennyiségének csökkenésével, amit a szterol összetétel vizsgálata során tapasztaltunk. Annak ellenére, hogy *in vitro* körülmények között több törzs is érzékeny volt a sejtfal károsítására, a virulencia vizsgálatok során nem észleltünk csökkent életképességből eredő kolonizációs képesség romlást. Emellett eredményeink arra utalnak, hogy *C. auris* esetében a membrán homeosztázisát jelentősen befolyásoló ergosterol mennyiségének szignifikáns csökkenése (0381 POS^{evo}) sincs negatív befolyással a gazdaszervezet kolonizációjára. Az *in vivo* fertőzések során egyedül a 0387 triazol evolált törzsek esetében tapasztaltuk a virulencia csökkenését. Feltételezhetjük, hogy ebben az esetben a rezisztencia kialakulása miatt jelentkező negatív hatásokat mérséklendő, a sejtekben változás következett be a sejtfal bioszintézisében. Az így sejtfelszínre kerülő α -mannán, kitin és kitin oligomerek könnyen felismerhetővé tették a patogént az immunrendszer effektor sejtjei számára. Szakirodalmi adatokkal összevethető módon az általunk létrehozott törzsekben azonosított *TAC1B* mutáció a 0381 FLU^{evo} és VOR^{evo} törzsekben is a *CDR1* expressziójának növekedését okozta. A 0387 klinikai izolátumból létrehozott triazol evolált törzsek egységesen kiemelkedően magas *MDR1* expressziót mutattak. Bár ennek közvetlen genetikai determinánsát nem találtuk meg, a funkcionális

vizsgálatok és a keresztrezisztencia profil alapján feltételezhető, hogy ez a folyamat jelentős szerepet játszik az antimikotikumokkal szembeni csökkent érzékenységben. A 0381 POS^{evo} törzsben tapasztalt általános rezisztencia a triazolok ellen, feltételezhetően az *ERG3* génben bekövetkező funkcióvesztéses mutáció eredménye. Az Erg3 által katalizált reakció hiányában a toxikus szterol termék nem halmozódik fel a membránban, ami a szterol összetétel alapján bizonyítást is nyert ebben a törzsben.

Érdekes megfigyelés továbbá, hogy mindhárom 0387 azol evolált rezisztens törzs azonos helyen hordozott pontmutációt a *BCY1* génben. Funkció tekintetében a *BCY1* a Protein Kináz A (PKA) szignalizációs útvonal szabályozó alegységét kódolja. Funkcióvesztése esetén nem képes kapcsolódni a Tpk1/Tpk2 katalitikus heterodimerrel, így a szignalizációs útvonal konstitutívan aktiválódik. Feltételezésünk szerint a 0387 triazol evolált törzsek esetében tapasztalt fokozott növekedési aktivitás annak eredménye lehet, hogy a PKA folyamatos aktivációja miatt a sejtek nem képesek reagálni a környezet megváltozott tápanyag ellátottságára. A *BCY1* funkcióvesztéses mutációját szintén megtaláltuk a 0387 MICA^{evo} törzsben is, ahol emellett a Bcy1 által szabályozott Tpk2-t kódoló gén, a *TPK2* is hordozott egy aminosav cserét. Feltételezéseink alapján ez a kombináció a PKA konstitutív aktivációjának hiányát okozza. Erre utal, hogy a triazol evolált törzsek jelentős toleranciát mutattak koffeinnel, illetve rapamicinnel szemben is, míg a 0387 MICA^{evo} esetében ez a fenotípus nem jelentkezett. Érdekes azonban megjegyezni, hogy bár több feltételezés is született arról, hogy a PKA-nak *C. auris* esetében lehet szerepe az antifungális rezisztencia kialakításában, a szignalizációs útvonalat alkotó egyes komponensek konkrét funkcióját ebben a fajban még nem ismerjük.

BALB/c kísérleti egerek fertőzésével nyert *in vivo* eredményeink arra utalnak, hogy *C. auris* esetében nem jellemző az a más *Candida* fajok vizsgálata során gyakran megfigyelt fenotípus, miszerint az antifungális rezisztencia kialakulása miatt jelentkező általános fitness vesztés csökkentené a törzsek fertőző képességét. Ez magyarázatot adhat arra a megfigyelésre, hogy a *C. auris* rezisztens törzsei miért képesek eredményesen terjedni a kórházi környezetben.

A tanulmány létrehozása során végrehajtott kísérletekkel célunk a *C. auris* antifungális rezisztencia mechanizmusainak pontosabb megértése, illetve a kialakult rezisztencia következményeinek feltárása volt. Az antifungális szerekekkel szembeni rezisztencia klasszikus és jól jellemzett okai mellett, olyan alternatív útvonalak jelentőségét is kiemeltük, mint a protein kináz A megváltozott működése. Emellett több kísérlet során bizonyítottuk, hogy a rezisztens fenotípus kialakulása *C. auris* esetében izolátum függő, ami arra utal, hogy ez a faj eltérő stratégiák széles tárházát képes felvonultatni az eredményes terápia elkerülésére. Ezen széles eszköztár mellett azonban az teszi igazán kiemelkedő feltörekvő patogénné a *C. auris*-t, hogy más *Candida* fajokkal ellentétben a rezisztens fenotípus kialakulása csak ritkán vált ki csökkent fertőzőképességet.

9. Summary

Infections caused by fungal pathogens hold significant healthcare importance. Among human pathogens, *Candida* species are responsible for a substantial portion of these infections, referred to as *candidiasis*. Generally, *Candida* species are capable colonizing the host in an opportunistic manner, and in severe cases, they can thrive and cause invasive infections. Instead of the extensively studied *Candida albicans*, infections caused by less recognized *Candida* species are on the rise nowadays. Currently, there are only three classes of antifungal drugs available for the treatment of invasive *candidiasis*. Among these, the first introduced antifungal was amphotericin B, which belongs to the polyene type drugs. These compounds are capable of disturbing cellular homeostasis by binding to ergosterol and promoting membrane channel formation. Ergosterol is an ideal target for antifungal therapy since it is specific to fungal cells. However, due to the significant structural similarity between ergosterol and the mammalian cell membrane specific cholesterol, drugs targeting this sterol product often also harm the host organism. Triazoles also act in an ergosterol dependent manner by inhibiting the biosynthesis of this sterol product. As these drugs do not actively kill the fungal cells but inhibit their cell cycle (fungistatic), antifungal resistance can easily develop against them. In contrast, the most recent antifungals, echinocandins, inhibit the biosynthesis of the essential component of the fungal cell wall, β -D-glucan, causing a fungicidal effect.

One of the most recently isolated members of the emerging *Candida* species is called *Candida auris*. This pathogen was first isolated in Japan in 2009 from an ear discharge of a hospital patient. Following the first characterization, *C. auris* strains were classified into five clades based on their geographical origin and later, on their genetic backgrounds. Within each clade, isolates show remarkable genetic similarity; however, isolates from different clades can differ by up to several hundred thousand nucleotides. Epidemiological data indicates that generally isolates from clades I, III, and IV are capable of causing systemic fungal infections. Additionally, isolates from these clades are also frequently associated with antifungal resistance, which is one of the main characteristic features of *C. auris*, with several resistance mechanisms already identified in this species.

The majority of azole resistant *C. auris* strains isolated from clinical settings carry mutations in their *ERG11* gene, which encodes the target enzyme of the antifungals. Another frequently identified antifungal resistance mechanism is associated with the increased expression of the ABC type efflux pump, Cdr1. Several independent studies have attributed this phenomenon to amino acid substitutions in the encoding region of the transcription factor Tac1b. Approximately one-third of *C. auris* isolates are resistant to amphotericin B, which is usually caused by mutations in genes involved in ergosterol biosynthesis. Similarly, to other *Candida* species echinocandin resistance in *C. auris* is usually caused by modifications in the glucan synthase encoding *FKS1* gene.

In this work, we utilized the widely used *in vitro* microevolution method to generate antifungal resistant *C. auris* strains. For this, as a starting point, we used two antifungal susceptible clinical isolates. The 0381 (clade II) strain originated from the first identified isolate, found in an ear discharge, while the 0387 (clade I) originated from a hemoculture. These strains were treated long-term with increasing concentrations of the polyene type amphotericin B, triazole type fluconazole, posaconazole, voriconazole, and the echinocandin type drug, micafungin respectively. Antifungal susceptibility testing indicated that *C. auris* is unable to develop stable resistance against amphotericin B in this experimental setting. The remaining strains consistently showed resistance to the respective drug used during the experiment. Additionally, we also observed cross-resistance between the individual drugs or even drug groups. This cross resistance was primarily occurred in resistant strains originating from the 0387 clinical isolate. It is important to note that based on antifungal testing, 0387 MICA^{evo} only responded to amphotericin B treatment, but as MIC values of this drug also significantly increased, this strain was on the verge of becoming PDR (pan-drug resistant).

Several generated strains showed alterations in their abiotic stress tolerance. 0381 MICA^{evo} showed general sensitivity against cell wall disturbing agents, despite no significant differences in the cell wall composition were found in this strain. The 0381 POS^{evo}, 0387 POS^{evo} and 0387 VOR^{evo} strains were sensitive to membrane disturbance, which positively correlated with the decrease in ergosterol quantity observed during sterol composition analysis. Despite several strains showing sensitivity to cell wall disturbance in the *in vitro* setting, virulence associated experiments failed to show a fitness-loss associated decrease in the pathogenic potential. Furthermore, our results indicate that even the significant decrease of the membrane stabilizing ergosterol (0381 POS^{evo}) did not necessarily have a negative effect on the colonizing capacity of this species. During the *in vivo* infection studies, solely 0387 originated triazole evolved strains showed decreased pathogenic potential. Further characterization of these strains indicates that changes in the cell wall composition were induced to compensate for the negative effects of the resistance development. This probably promoted the surface exposure of α -mannan, chitin, and chitin oligomers, rendering the fungal cells easily recognizable to immune effector cells. In line with the literature, we also identified amino acid substitutions in the *TAC1b* gene of 0381 FLU^{evo} and VOR^{evo} that led to the increased expression of *CDR1* in both strains. The 0387 originated triazole evolved strains showed extensively high *MDR1* expression. Although the genetic determinants of this phenomenon remain unknown, based on the functional experiments and cross resistance profile, we can hypothesize that this process plays a significant role in the antifungal resistance of these strains.

The general resistance against triazoles in the 0381 POS^{evo} strain is probably linked to the loss of function mutation in *ERG3*. In the absence of the reaction catalyzed by Erg3, the toxic byproduct

associated with azole treatment does not accumulate. The sterol composition of the generated strain confirmed this observation.

Interestingly, all three 0387 originated strains carried a uniform amino acid substitution in the *BCY1* gene. This gene encodes the regulatory subunit of the Protein Kinase A (PKA) signaling pathway. In the case of function loss, Bcy1 is unable to bind to the catalytic heterodimeric subunit (Tpk1/Tpk2), and the lack of inhibition constitutively activates the pathway. According to our hypothesis, the atypical growth pattern of the 0387 originated strains can be linked with this mutation, as the constitutive activation of the PKA pathway results in cells that are unable to adapt to the environmental nutrient supply. Functional loss of the *BCY1* was also found in the 0387 MICA^{evo}, however this strain also carried a point mutation in *TPK2*, which is the gene that encodes the catalytic subunit of the signaling pathway. Characterization of this strain suggests the absence of the constitutive activation of the PKA pathway. For example, in 0387 MICA^{evo} we could not observe caffeine resistance, while all three triazole evolved strains were both caffeine and rapamycin resistant. It is also important to highlight, that while the plausible role of PKA in the antifungal resistance of *C. auris* has already been suggested by several studies in the past, the exact functions of the components of this pathway are still unknown.

Our *in vivo* experiments suggest that, in contrast to other *Candida* species, the development of antifungal resistance does not cause fitness-loss associated virulence decrease in *C. auris*. This can explain how resistant *C. auris* strains can efficiently spread in hospital settings.

Taken together, our aim was to further understand the development and the effect of antifungal resistance in *C. auris*. Besides the frequently studied mechanisms of resistance, we underlined the importance of recognizing alternative resistance associated processes, such as the role of the protein kinase A pathway. Through several experiments, we also confirmed that the development of antifungal resistance is highly isolate dependent in *C. auris*, suggesting that this species is capable of utilizing a wide range of strategies to survive antifungal treatment. Furthermore, in addition to this remarkable ability, the fact that the development of antifungal resistance rarely causes fitness loss associated virulence attenuation makes this species a highly prominent emerging fungal pathogen.

10. Köszönetnyilvánítás

Először is szeretném megköszönni Prof. Dr. Vágvölgyi Csabának, a Szegedi Tudományegyetem, Természettudományi és Informatikai Kar, Mikrobiológiai Tanszék vezetőjének, amiért lehetőséget biztosított, hogy mind a korábban elkészült szakdolgozataimhoz, mind a jelenlegi doktori disszertációmhoz szükséges kutatási munkát a tanszéken végezhettem el.

Emellett nagyon hálás vagyok Prof. Dr. Gácsér Attilának, aki már alapszakos diákként esélyt adott, hogy csatlakozzak a csoportjához, majd az évek során bármikor választási út elé kerültünk, újra és újra bizalmat szavazott nekem, ezzel biztosítva, hogy folytathassam munkám a vezetése alatt. Az ez idő alatt megszerzett szakmai tapasztalat elengedhetetlen ahhoz, hogy kutatási munkámat nemzetközi szintén is eredményesen tudjam elvégezni.

Külön szeretnék köszönetet mondani Dr. Tóth Renátának, aki végtelen türelemmel és odafigyeléssel segítette, hogy kezdő hallgatóként megalapozzam tudásomat a laboratóriumi kutatás területén. Illetve, hálás vagyok, hogy az alapismeretek mellett a tudományos életben való boldogulással kapcsolatosan számos témakörben igyekezett átadni tudását az évek során.

Ezenkívül szeretném hálámat kifejezni Szenzenstein Juditnak, aki szakmai jótanácsai mellett számos alkalommal kedvességével és derűlátásával segítette munkámat. Emellett köszönettel tartozom neki, hogy idejét és szellemi épségét nem sajnálva, bevezetett a vegyszer-, illetve eszközbeszerzés varázslatos világába is.

Szeretném megköszönni, Dr. Németh Tibornak, illetve Dr. Papp Csabának, mind a végtelen mennyiségű szakmai segítséget, mind azt, hogy megtanítottak arra, hogy legtöbb esetben a humor jelenti a családottság és a kimerültség legjobb ellenszerét.

A labor egykori tagjai közül szeretnék köszönetet mondani Dr. Csonka Katalinnak és Dr. Zajta Eriknek, akikre kezdő PhD hallgatóként mind szakmai értelemben, mind emberileg követendő példaként nézhettem fel.

Munkatársaim közül szintén kiemelten szeretnék köszönetet mondani Takács Tamásnak, akivel a korai arcmemóriára visszavezethető problémákat leküzdve, az együtt töltött évek során kölcsönösen támogattuk egymást a PhD rögzös útján, ami amellett, hogy esszenciális volt ezen dolgozat elkészüléséhez remélem, hogy hosszú távon is végig fogja kísérni az életemet. Hasonlóan szeretném külön megköszönni Veres Évinek és Szilovics Zórának a végig nevetett napokat, a nagy beszélgetéseket és a rengeteg segítséget.

Emellett nagyon hálás vagyok az egykori 302-es laborból lett 301. labor minden korábbi és jelenlegi tagjának: Dr. Tóth Adél, Dr. Tanmoy Chakraborty, Dr. Dharendra N. Singh, Dr. Pál Sára, Dr. Vadovics Máté, Csikós Máté, Horváth Márton, Novák Ádám, Kocsis Katica, Drabbant Gergő, Florabelle

Cabarrubias. Természetesen az ő érdemük is, hogy mindig egy rendkívül jó hangulatú, összetartó és inspiráló környezetben dolgozhattam.

Külön szeretnék mindent megköszönni Dr. Hamari Zsuzsának és az általa vezetett labor tagjainak: Dr. Bokor Eszternek, Dr. Ámon Juditnak, hogy bármikor fordulhattam hozzájuk, mikor segítségre volt szükségem.

Szeretném megköszönni a segítséget Dr. Szereres Andrásnak és Dr. Varga Mónikának a törzsek lipidomikai és metabolomikai vizsgálatában nyújtott segítségükért. Hálás vagyok továbbá a Mikrobiológiai Tanszék minden korábbi és jelenlegi munkatársának, akiknek szakmai segítségére számos alkalommal számíthattam.

Hatalmas köszönet illeti barátaimat, akik az évek alatt kitartottak mellettem, tartották bennem a lelket és elviseltek a nehezebb napokon is. Szóval Lengyel-Tamás Virág, Papp Nikolett, Kiss-Csaplár Gabriella, Szombati Renáta, bár kicsit szétszórt minket a világ és az élet, de a kalandnak ami ezen dolgozat elkészítésével járt ti is esszenciális szereplői voltatok.

Természetesen a legnagyobb köszönet édesanyámat, Jámbor Katalint illeti. Az ő rendíthetetlen támogatása és segítése elengedhetetlen volt, ahhoz, hogy néhány kisebb megingást leszámítva sose veszítsem el a saját magamba vetett hitemet. Emellett elmondhatatlanul hálás vagyok, hogy már nagyon fiatalon megtanította nekem a tudás hatalmát és az önfejlesztés fontosságát. Hálás vagyok még családom további tagjainak a bátorításukért.

A kutatást a GINOP-2.3.2.-15-2016-00035 pályázat támogatta.

11. Irodalomjegyzék

1. Friedman DZP, Schwartz IS. Emerging fungal infections: New patients, new patterns, and new pathogens. *Journal of Fungi*. 2019;5(3). doi:10.3390/jof5030067
2. Brown GD, Denning DW, Gow NAR, Levitz SM, Netea MG, White TC. Hidden Killers: Human Fungal Infections. *Science Translational Medicine*. 2012;4(165):165rv13-165rv13. doi:10.1126/scitranslmed.3004404
3. Bongomin F, Gago S, Oladele RO, Denning DW. Global and multi-national prevalence of fungal diseases—estimate precision. *Journal of Fungi*. 2017;3(4). doi:10.3390/jof3040057
4. Richardson M, Lass-Flörl C. Changing epidemiology of systemic fungal infections. *Clinical Microbiology and Infection*. 2008;14:5-24. doi:10.1111/j.1469-0691.2008.01978.x
5. Satoh K, Makimura K, Hasumi Y, Nishiyama Y, Uchida K, Yamaguchi H. *Candida auris* sp. nov., a novel ascomycetous yeast isolated from the external ear canal of an inpatient in a Japanese hospital. *Microbiology and Immunology*. 2009;53(1):41-44. doi:10.1111/j.1348-0421.2008.00083.x
6. Lockhart SR, Etienne KA, Vallabhaneni S, és mtsi. Simultaneous emergence of multidrug-resistant *Candida auris* on 3 continents confirmed by whole-genome sequencing and epidemiological analyses. *Clinical Infectious Diseases*. 2017;64(2):134-140. doi:10.1093/cid/ciw691
7. Chow NA, Muñoz JF, Gade L, és mtsi. Tracing the evolutionary history and global expansion of *Candida auris* using population genomic analyses. *bioRxiv*. Published online 2020:2020.01.06.896548. doi:10.1101/2020.01.06.896548
8. Spruijtenburg B, Badali H, Abastabar M, és mtsi. Confirmation of fifth *Candida auris* clade by whole genome sequencing. *Emerging Microbes & Infections*. 2022;11(1):2405-2411. doi:10.1080/22221751.2022.2125349
9. Chakrabarti A, Sood P. On the emergence, spread and resistance of *Candida auris*: Host, pathogen and environmental tipping points. *Journal of Medical Microbiology*. 2021;70(3). doi:10.1099/jmm.0.001318
10. Garcia-Bustos V, Cabanero-Navalon MD, Ruiz-Saurí A, és mtsi. What Do We Know about *Candida auris*? State of the Art, Knowledge Gaps, and Future Directions. *Microorganisms*. 2021;9(10):2177. doi:10.3390/microorganisms9102177
11. Havlickova B, Czaika VA, Friedrich M. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. *Mycoses*. 2008;51(s4):2-15. doi:10.1111/j.1439-0507.2008.01606.x
12. Sobel JD. Vulvovaginal candidosis. *Lancet*. 2007;369(9577):1961-1971. doi:10.1016/S0140-6736(07)60917-9
13. World Health Organization. Global tuberculosis report 2022.
14. World Health Organization C, ed. World malaria report 2022. Published online 2022.
15. Naik B, Ahmed SMQ, Laha S, Das SP. Genetic Susceptibility to Fungal Infections and Links to Human Ancestry. *Frontiers in Genetics*. 2021;12. Accessed August 29, 2022. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fgene.2021.709315>
16. Cheng MF, Yang YL, Yao TJ, és mtsi. Risk factors for fatal candidemia caused by *Candida albicans* and non-*albicans* *Candida* species. *BMC Infectious Diseases*. 2005;5(1):22. doi:10.1186/1471-2334-5-22
17. Yapar N. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. *Therapeutics and Clinical Risk Management*. 2014;10(1):95-105. doi:10.2147/TCRM.S40160
18. Lockhart SR, Guarner J. Emerging and reemerging fungal infections. *Seminars in Diagnostic Pathology*. 2019;36(3):177-181. doi:10.1053/j.semmp.2019.04.010
19. Benedict K, Jackson BR, Chiller T, Beer KD. Estimation of Direct Healthcare Costs of Fungal Diseases in the United States. *Clin Infect Dis*. 2019;68(11):1791-1797. doi:10.1093/cid/ciy776
20. Salmanton-García J, Hoenigl M, Gangneux JP, és mtsi. The current state of laboratory mycology and access to antifungal treatment in Europe: a European Confederation of Medical Mycology survey. *The Lancet Microbe*. 2023;4(1):e47-e56. doi:10.1016/S2666-5247(22)00261-0
21. de Cássia Orlandi Sardi J, Silva DR, Soares Mendes-Giannini MJ, Rosalen PL. *Candida auris*: Epidemiology, risk factors, virulence, resistance, and therapeutic options. *Microb Pathog*. 2018;125:116-121. doi:10.1016/j.micpath.2018.09.014
22. Lamoth F, Lockhart SR, Berkow EL, Calandra T. Changes in the epidemiological landscape of invasive candidiasis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2018;73:i4-i13. doi:10.1093/jac/dkx444
23. Guinea J. Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia. *Clinical Microbiology and Infection*. 2014;20(6):5-10. doi:10.1111/1469-0691.12539
24. Allert S, Schulz D, Kämmer P, és mtsi. From environmental adaptation to host survival: Attributes that mediate pathogenicity of *Candida auris*. *Virulence*. 2022;13(1):191-214. doi:10.1080/21505594.2022.2026037
25. Silva LN, Oliveira SSC, Magalhães LB, és mtsi. Unmasking the Amphotericin B Resistance Mechanisms in *Candida haemulonii* Species Complex. *ACS Infect Dis*. 2020;6(5):1273-1282. doi:10.1021/acsinfecdis.0c00117

26. Ben-Ami R, Berman J, Novikov A, és mtsi. Multidrug-resistant *Candida haemulonii* and *C. auris*, tel aviv, Israel. *Emerging Infectious Diseases*. 2017;23(2):195-203. doi:10.3201/eid2302.161486
27. Muñoz JF, Gade L, Chow NA, és mtsi. Genomic insights into multidrug-resistance, mating and virulence in *Candida auris* and related emerging species. *Nature Communications*. 2018;9(1):5346. doi:10.1038/s41467-018-07779-6
28. Rokas A. Evolution of the human pathogenic lifestyle in fungi. *Nat Microbiol*. 2022;7(5):607-619. doi:10.1038/s41564-022-01112-0
29. Casadevall A. Climate change brings the specter of new infectious diseases. *Journal of Clinical Investigation*. 2020;130(2):553-555. doi:10.1172/JCI135003
30. Casadevall A, Kontoyiannis DP, Robert V. On the Emergence of *Candida auris*: Climate Change, Azoles, Swamps, and Birds. *mBio*. 2019;10(4):e01397-19. doi:10.1128/mBio.01397-19
31. McLean MA, Angilletta MJ, Williams KS. If you can't stand the heat, stay out of the city: Thermal reaction norms of chitinolytic fungi in an urban heat island. *Journal of Thermal Biology*. 2005;30(5):384-391. doi:10.1016/j.jtherbio.2005.03.002
32. Horton MV, Johnson CJ, Kernien JF, és mtsi. *Candida auris* Forms High-Burden Biofilms in Skin Niche Conditions and on Porcine Skin. *mSphere*. 2020;5(1):e00910-19. doi:10.1128/mSphere.00910-19
33. Huang X, Hurabielle C, Drummond RA, és mtsi. Murine model of colonization with fungal pathogen *Candida auris* to explore skin tropism, host risk factors and therapeutic strategies. *Cell Host Microbe*. 2021;29(2):210-221.e6. doi:10.1016/j.chom.2020.12.002
34. Nguyen UT, Kalan LR. Forgotten fungi: the importance of the skin mycobiome. *Current Opinion in Microbiology*. 2022;70:102235. doi:10.1016/j.mib.2022.102235
35. Arora P, Singh P, Wang Y, és mtsi. Environmental Isolation of *Candida auris* from the Coastal Wetlands of Andaman Islands, India. *mBio*. 2021;12(2):e03181-20. doi:10.1128/mBio.03181-20
36. Lübbert C, Baars C, Dayakar A, és mtsi. Environmental pollution with antimicrobial agents from bulk drug manufacturing industries in Hyderabad, South India, is associated with dissemination of extended-spectrum beta-lactamase and carbapenemase-producing pathogens. *Infection*. 2017;45(4):479-491. doi:10.1007/s15010-017-1007-2
37. Yadav A, Jain K, Wang Y, és mtsi. *Candida auris* on Apples: Diversity and Clinical Significance. *mBio*. 2022;13(2):e00518-22. doi:10.1128/mbio.00518-22
38. Brilhante RSN, Alencar LP de, Bandeira SP, és mtsi. Exposure of *Candida parapsilosis* complex to agricultural azoles: An overview of the role of environmental determinants for the development of resistance. *Sci Total Environ*. 2019;650(Pt 1):1231-1238. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.09.096
39. Rocha MFG, Alencar LP, Paiva M a. N, és mtsi. Cross-resistance to fluconazole induced by exposure to the agricultural azole tetraconazole: an environmental resistance school? *Mycoses*. 2016;59(5):281-290. doi:10.1111/myc.12457
40. Sekizuka T, Iguchi S, Umeyama T, és mtsi. Clade II *Candida auris* possess genomic structural variations related to an ancestral strain. *PLoS ONE*. 2019;14(10):1-22. doi:10.1371/journal.pone.0223433
41. Welsh RM, Sexton DJ, Forsberg K, Vallabhaneni S, Litvintseva A. Insights into the Unique Nature of the East Asian Clade of the Emerging Pathogenic Yeast *Candida auris*. Land GA, ed. *Journal of clinical microbiology*. 2019;57(4):1-5. doi:10.1128/JCM.00007-19
42. Keighley C, Garnham K, Harch SAJ, és mtsi. *Candida auris*: Diagnostic Challenges and Emerging Opportunities for the Clinical Microbiology Laboratory. *Curr Fungal Infect Rep*. 2021;15(3):116-126. doi:10.1007/s12281-021-00420-y
43. Du H, Bing J, Hu T, Ennis CL, Nobile CJ, Huang G. *Candida auris*: Epidemiology, biology, antifungal resistance, and virulence. *PLoS Pathogens*. 2020;16(10):1-18. doi:10.1371/journal.ppat.1008921
44. Chowdhary A, Sharma C, Meis JF. *Candida auris*: A rapidly emerging cause of hospital-acquired multidrug-resistant fungal infections globally. Hogan DA, ed. *PLoS Pathogens*. 2017;13(5):e1006290. doi:10.1371/journal.ppat.1006290
45. Geremia N, Brugnaro P, Solinas M, Scarparo C, Panese S. *Candida auris* as an Emergent Public Health Problem: A Current Update on European Outbreaks and Cases. *Healthcare*. 2023;11(3):425. doi:10.3390/healthcare11030425
46. Ahmad S, Alfouzan W. *Candida auris*: Epidemiology, diagnosis, pathogenesis, antifungal susceptibility, and infection control measures to combat the spread of infections in healthcare facilities. *Microorganisms*. 2021;9(4). doi:10.3390/microorganisms9040807
47. Kwon YJ, Shin JH, Byun SA, és mtsi. *Candida auris* Clinical Isolates from South Korea: Identification, Antifungal Susceptibility, and Genotyping. Land GA, ed. *Journal of Clinical Microbiology*. 2019;57(4):1-11. doi:10.1128/JCM.01624-18
48. Oh BJ, Shin JH, Kim MN, és mtsi. Biofilm formation and genotyping of *Candida haemulonii*, *Candida pseudohaemulonii*, and a proposed new species (*Candida auris*) isolates from Korea. *Med Mycol*. 2011;49(1):98-102. doi:10.3109/13693786.2010.493563

49. Pfaller MA, Diekema DJ, Turnidge JD, Castanheira M, Jones RN. Twenty years of the SENTRY Antifungal Surveillance Program: Results for *Candida* species from 1997-2016. *Open Forum Infectious Diseases*. 2019;6(Supplement_1):S79-S94. doi:10.1093/ofid/ofy358
50. Sherry L, Ramage G, Kean R, és mtsi. Biofilm-Forming Capability of Highly Virulent, Multidrug-Resistant *Candida auris*. *Emerg Infect Dis*. 2017;23(2):328-331. doi:10.3201/eid2302.161320
51. Wang X, Bing J, Zheng Q, és mtsi. The first isolate of *Candida auris* in China: Clinical and biological aspects article. *Emerging Microbes and Infections*. 2018;7(1):0-8. doi:10.1038/s41426-018-0095-0
52. Borman AM, Szekely A, Johnson EM. Comparative Pathogenicity of United Kingdom Isolates of the Emerging Pathogen *Candida auris* and Other Key Pathogenic *Candida* Species. Mitchell AP, ed. *mSphere*. 2016;1(4):4-6. doi:10.1128/mSphere.00189-16
53. Yue H, Bing J, Zheng Q, és mtsi. Filamentation in *Candida auris*, an emerging fungal pathogen of humans: passage through the mammalian body induces a heritable phenotypic switch. *Emerging Microbes and Infections*. 2018;7(1):188. doi:10.1038/s41426-018-0187-x
54. Chow NA, De Groot T, Badali H, Abastabar M, Chiller TM, Meis JF. Potential fifth clade of *Candida auris*, Iran, 2018. *Emerging Infectious Diseases*. 2019;25(9):1780-1781. doi:10.3201/eid2509.190686
55. Muñoz JF, Welsh RM, Shea T, és mtsi. Clade-specific chromosomal rearrangements and loss of subtelomeric adhesins in *Candida auris*. *Genetics*. 2021;218(1):iyab029. doi:10.1093/genetics/iyab029
56. Forgács L, Borman AM, Prépost E, és mtsi. Comparison of in vivo pathogenicity of four *Candida auris* clades in a neutropenic bloodstream infection murine model. *Emerging microbes & infections*. 2020;9(1):1160-1169. doi:10.1080/22221751.2020.1771218
57. Wang Y, Xu J. Population genomic analyses reveal evidence for limited recombination in the superbug *Candida auris* in nature. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 2022;20:3030-3040. doi:10.1016/j.csbj.2022.06.030
58. Ross ZK, Lorenz A. Is *Candida auris* sexual? *PLOS Pathogens*. 2020;16(12):e1009094. doi:10.1371/journal.ppat.1009094
59. Kean R, Brown J, Gulmez D, Ware A, Ramage G. *Candida auris*: A Decade of Understanding of an Enigmatic Pathogenic Yeast. *Journal of Fungi*. 2020;6(1):30. doi:10.3390/jof6010030
60. Eyre DW, Sheppard AE, Madder H, és mtsi. A *Candida auris* Outbreak and Its Control in an Intensive Care Setting. *New England Journal of Medicine*. 2018;379(14):1322-1331. doi:10.1056/nejmoa1714373
61. Arendrup MC, Prakash A, Meletiadiis J, Sharma C, Chowdhary A. Comparison of EUCAST and CLSI reference microdilution mics of eight antifungal compounds for *Candida auris* and associated tentative epidemiological cutoff values. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2017;61(6). doi:10.1128/AAC.00485-17
62. Worth LJ, Harrison SJ, Dickinson M, és mtsi. *Candida auris* in an Australian health care facility: importance of screening high risk patients. *Med J Aust*. 2020;212(11):510-511.e1. doi:10.5694/mja2.50612
63. Van Schalkwyk E, Mpembe RS, Thomas J, és mtsi. Epidemiologic shift in Candidemia driven by *Candida auris*, South Africa, 2016-2017. *Emerging Infectious Diseases*. 2019;25(9):1698-1707. doi:10.3201/eid2509.190040
64. Chakrabarti A, Sood P, Rudramurthy SM, és mtsi. Incidence, characteristics and outcome of ICU-acquired candidemia in India. *Intensive Care Med*. 2015;41(2):285-295. doi:10.1007/s00134-014-3603-2
65. Schelenz S, Hagen F, Rhodes JL, és mtsi. First hospital outbreak of the globally emerging *Candida auris* in a European hospital. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*. 2016;5(1):1-7. doi:10.1186/s13756-016-0132-5
66. Ruiz-Gaitán A, Moret AM, Tasiás-Pitarch M, és mtsi. An outbreak due to *Candida auris* with prolonged colonisation and candidaemia in a tertiary care European hospital. *Mycoses*. 2018;61(7):498-505. doi:10.1111/myc.12781
67. Adams E, Quinn M, Tsay S, és mtsi. *Candida auris* in Healthcare Facilities, New York, USA, 2013–2017. *Emerg Infect Dis*. 2018;24(10):1816-1824. doi:10.3201/eid2410.180649
68. Piedrahita CT, Cadnum JL, Jencson AL, Shaikh AA, Ghannoum MA, Donskey CJ. Environmental Surfaces in Healthcare Facilities are a Potential Source for Transmission of *Candida auris* and Other *Candida* Species. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2017;38(9):1107-1109. doi:10.1017/ice.2017.127
69. Welsh RM, Bentz ML, Shams A, és mtsi. Survival, Persistence, and Isolation of the Emerging Multidrug-Resistant Pathogenic Yeast *Candida auris* on a Plastic Health Care Surface. *J Clin Microbiol*. 2017;55(10):2996-3005. doi:10.1128/JCM.00921-17
70. Osei Sekyere J. *Candida auris*: A systematic review and meta-analysis of current updates on an emerging multidrug-resistant pathogen. *MicrobiologyOpen*. 2018;7(4):1-29. doi:10.1002/mbo3.578
71. Forsberg K, Woodworth K, Walters M, és mtsi. *Candida auris*: The recent emergence of a multidrug-resistant fungal pathogen. *Medical Mycology*. 2019;57(1):1-12. doi:10.1093/mmy/myy054
72. Chowdhary A, Anil Kumar V, Sharma C, és mtsi. Multidrug-resistant endemic clonal strain of *Candida auris* in India. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2014;33(6):919-926. doi:10.1007/s10096-013-2027-1

73. Chowdhary A, Sharma C, Duggal S, és mtsi. New clonal strain of *Candida auris*, Delhi, India. *Emerging Infectious Diseases*. 2013;19(10):1670-1673. doi:10.3201/eid1910.130393
74. Borman AM, Szekely A, Johnson EM. Isolates of the emerging pathogen *Candida auris* present in the UK have several geographic origins. *Med Mycol*. 2017;55(5):563-567. doi:10.1093/mmy/myw147
75. Ruiz Gaitán AC, Moret A, López Hontangas JL, és mtsi. Nosocomial fungemia by *Candida auris*: First four reported cases in continental Europe. *Rev Iberoam Micol*. 2017;34(1):23-27. doi:10.1016/j.riam.2016.11.002
76. Ruiz-Gaitán A, Moret AM, Tasiás-Pitarch M, és mtsi. An outbreak due to *Candida auris* with prolonged colonisation and candidaemia in a tertiary care European hospital. *Mycoses*. 2018;61(7):498-505. doi:10.1111/myc.12781
77. Kohlenberg A, Monnet DL, Plachouras D, *Candida auris* survey collaborative group, *Candida auris* survey collaborative group includes the following national experts. Increasing number of cases and outbreaks caused by *Candida auris* in the EU/EEA, 2020 to 2021. *Euro Surveill*. 2022;27(46):2200846. doi:10.2807/1560-7917.ES.2022.27.46.2200846
78. World Health Organization. *WHO Fungal Priority Pathogens List to Guide Research, Development and Public Health Action*. World Health Organization; 2022. Accessed November 11, 2022. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/363682>
79. Al Maani A, Paul H, Al-Rashdi A, és mtsi. Ongoing Challenges with Healthcare-Associated *Candida auris* Outbreaks in Oman. *J Fungi (Basel)*. 2019;5(4):101. doi:10.3390/jof5040101
80. Lee WG, Shin JH, Uh Y, és mtsi. First three reported cases of nosocomial fungemia caused by *Candida auris*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2011;49(9):3139-3142. doi:10.1128/JCM.00319-11
81. Fisher MC, Alastruey-Izquierdo A, Berman J, és mtsi. Tackling the emerging threat of antifungal resistance to human health. *Nat Rev Microbiol*. Published online March 29, 2022. doi:10.1038/s41579-022-00720-1
82. Kilburn S, Innes G, Quinn M, és mtsi. Antifungal Resistance Trends of *Candida auris* Clinical Isolates in New York and New Jersey from 2016 to 2020. *Antimicrob Agents Chemother*. 2022;66(3):e0224221. doi:10.1128/aac.02242-21
83. El H, R B. Fungicidin, an antibiotic produced by a soil actinomycete. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine (New York, NY)*. 1951;76(1). doi:10.3181/00379727-76-18397
84. Dutcher JD. The discovery and development of amphotericin B. *Dis Chest*. 1968;54:Suppl 1:296-298. doi:10.1378/chest.54.supplement_1.296
85. Sb Z. Polyene macrolide antibiotics and their applications in human therapy. *Current medicinal chemistry*. 2003;10(3). doi:10.2174/0929867033368448
86. Ostrosky-Zeichner L, Casadevall A, Galgiani JN, Odds FC, Rex JH. An insight into the antifungal pipeline: Selected new molecules and beyond. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2010;9(9):719-727. doi:10.1038/nrd3074
87. Anderson TM, Clay MC, Cioffi AG, és mtsi. Amphotericin forms an extramembranous and fungicidal sterol sponge. *Nat Chem Biol*. 2014;10(5):400-406. doi:10.1038/nchembio.1496
88. Mesa-Arango AC, Scorzoni L, Zaragoza O. It only takes one to do many jobs: Amphotericin B as antifungal and immunomodulatory drug. *Front Microbiol*. 2012;3:286. doi:10.3389/fmicb.2012.00286
89. Hamill RJ. Amphotericin B formulations: a comparative review of efficacy and toxicity. *Drugs*. 2013;73(9):919-934. doi:10.1007/s40265-013-0069-4
90. Readio JD, Bittman R. Equilibrium binding of amphotericin B and its methyl ester and borate complex to sterols. *Biochim Biophys Acta*. 1982;685(2):219-224. doi:10.1016/0005-2736(82)90103-1
91. Fanos V, Cataldi L. Amphotericin B-induced nephrotoxicity: a review. *J Chemother*. 2000;12(6):463-470. doi:10.1179/joc.2000.12.6.463
92. Chandrasekar P. Management of invasive fungal infections: a role for polyenes. *J Antimicrob Chemother*. 2011;66(3):457-465. doi:10.1093/jac/dkq479
93. Robbins N, Wright GD, Cowen LE. Antifungal Drugs: The Current Armamentarium and Development of New Agents. *Microbiology spectrum*. 2016;4(5). doi:10.1128/microbiolspec.FUNK-0002-2016
94. Vincent BM, Lancaster AK, Scherz-Shouval R, Whitesell L, Lindquist S. Fitness Trade-offs Restrict the Evolution of Resistance to Amphotericin B. *PLOS Biology*. 2013;11(10):e1001692. doi:10.1371/journal.pbio.1001692
95. Carolus H, Pierson S, Lagrou K, Van Dijck P. Amphotericin b and other polyenes—discovery, clinical use, mode of action and drug resistance. *Journal of Fungi*. 2020;6(4):1-20. doi:10.3390/jof6040321
96. Geber A, Hitchcock CA, Swartz JE, és mtsi. Deletion of the *Candida glabrata* *ERG3* and *ERG11* genes: effect on cell viability, cell growth, sterol composition, and antifungal susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995;39(12):2708-2717. doi:10.1128/AAC.39.12.2708
97. Sanglard D, Ischer F, Parkinson T, Falconer D, Bille J. *Candida albicans* mutations in the ergosterol biosynthetic pathway and resistance to several antifungal agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2003;47(8):2404-2412. doi:10.1128/AAC.47.8.2404-2412.2003

98. Martel CM, Parker JE, Bader O, és mtsi. A clinical isolate of *Candida albicans* with mutations in *ERG11* (encoding sterol 14 α -demethylase) and *ERG5* (encoding C22 desaturase) is cross resistant to azoles and amphotericin B. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2010;54(9):3578-3583. doi:10.1128/AAC.00303-10
99. Hull CM, Parker JE, Bader O, és mtsi. Facultative sterol uptake in an ergosterol-deficient clinical isolate of *Candida glabrata* harboring a missense mutation in *ERG11* and exhibiting cross-resistance to azoles and amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(8):4223-4232. doi:10.1128/AAC.06253-11
100. Vandeputte P, Tronchin G, Larcher G, és mtsi. A nonsense mutation in the *ERG6* gene leads to reduced susceptibility to polyenes in a clinical isolate of *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52(10):3701-3709. doi:10.1128/AAC.00423-08
101. Cowen LE, Lindquist S. Cell biology: Hsp90 potentiates the rapid evolution of new traits: Drug resistance in diverse fungi. *Science*. 2005;309(5744):2185-2189. doi:10.1126/science.1118370
102. Regulatory Circuitry Governing Fungal Development, Drug Resistance, and Disease | Microbiology and Molecular Biology Reviews. Accessed February 23, 2023. <https://journals.asm.org/doi/10.1128/MMBR.00045-10>
103. Seo K, Akiyoshi H, Ohnishi Y. Alteration of cell wall composition leads to amphotericin B resistance in *Aspergillus flavus*. *Microbiol Immunol*. 1999;43(11):1017-1025. doi:10.1111/j.1348-0421.1999.tb01231.x
104. Mesa-Arango AC, Rueda C, Román E, és mtsi. Cell Wall Changes in Amphotericin B-Resistant Strains from *Candida tropicalis* and Relationship with the Immune Responses Elicited by the Host. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60(4):2326-2335. doi:10.1128/AAC.02681-15
105. Rybak JM, Barker KS, Muñoz JF, és mtsi. In vivo emergence of high-level resistance during treatment reveals the first identified mechanism of amphotericin B resistance in *Candida auris*. *Clinical Microbiology and Infection*. 2022;28(6):838-843. doi:10.1016/j.cmi.2021.11.024
106. Carolus H, Pierson S, Muñoz JF, és mtsi. Genome-wide analysis of experimentally evolved *Candida auris* reveals multiple novel mechanisms of multidrug resistance. *mBio*. 2021;12(2):1-19. doi:10.1128/mBio.03333-20
107. Maertens JA. History of the development of azole derivatives. *Clinical Microbiology and Infection*. 2004;10(s1):1-10. doi:10.1111/j.1470-9465.2004.00841.x
108. Roemer T, Krysan DJ. Antifungal Drug Development: Challenges, Unmet Clinical Needs, and New Approaches. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2014;4(5):a019703. doi:10.1101/cshperspect.a019703
109. Ghannoum MA, Rice LB. Antifungal Agents: Mode of Action, Mechanisms of Resistance, and Correlation of These Mechanisms with Bacterial Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*. 1999;12(4):501. doi:10.1128/cmr.12.4.501
110. Sanati H, Belanger P, Fratti R, Ghannoum M. A new triazole, voriconazole (UK-109,496), blocks sterol biosynthesis in *Candida albicans* and *Candida krusei*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1997;41(11):2492-2496. doi:10.1128/aac.41.11.2492
111. Lupetti A, Danesi R, Campa M, Tacca MD, Kelly S. Molecular basis of resistance to azole antifungals. *Trends in Molecular Medicine*. 2002;8(2):76-81. doi:10.1016/S1471-4914(02)00280-3
112. Miceli MH, Kauffman CA. Isavuconazole: A New Broad-Spectrum Triazole Antifungal Agent. *Clin Infect Dis*. 2015;61(10):1558-1565. doi:10.1093/cid/civ571
113. Robbins N, Caplan T, Cowen LE. Molecular Evolution of Antifungal Drug Resistance. *Annual review of microbiology*. 2017;71:753-775. doi:10.1146/annurev-micro-030117-020345
114. Richardson K. The Discovery and Profile of Fluconazole. *Journal of Chemotherapy*. 1990;2(1):51-54. doi:10.1080/1120009X.1990.11738981
115. Richardson K, Brammer KW, Marriott MS, Troke PF. Activity of UK-49,858, a bis-triazole derivative, against experimental infections with *Candida albicans* and *Trichophyton mentagrophytes*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1985;27(5):832-835. doi:10.1128/AAC.27.5.832
116. Charlier C, Hart E, Lefort A, és mtsi. Fluconazole for the management of invasive candidiasis: where do we stand after 15 years? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2006;57(3):384-410. doi:10.1093/jac/dki473
117. Thaler F, Bernard B, Tod M, és mtsi. Fluconazole penetration in cerebral parenchyma in humans at steady state. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995;39(5):1154-1156. doi:10.1128/AAC.39.5.1154
118. Debruyne D, Ryckelynck JP, Moulin M, Hurault de Ligny B, Levaltier B, Bigot MC. Pharmacokinetics of fluconazole in patients undergoing continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Clin Pharmacokinet*. 1990;18(6):491-498. doi:10.2165/00003088-199018060-00006
119. Marco F, Pfaller MA, Messer S, Jones RN. In Vitro Activities of Voriconazole (UK-109,496) and Four Other Antifungal Agents against 394 Clinical Isolates of *Candida* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1998;42(1):161-163. doi:10.1128/AAC.42.1.161
120. Nguyen MH, Yu CY. Voriconazole against fluconazole-susceptible and resistant *candida* isolates: In-vitro efficacy compared with that of itraconazole and ketoconazole. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1998;42(2):253-256. doi:10.1093/jac/42.2.253

121. Katragkou A, Tsikopoulou F, Roilides E, Zaoutis TE. Posaconazole: when and how? The clinician's view. *Mycoses*. 2012;55(2):110-122. doi:10.1111/j.1439-0507.2011.02061.x
122. Page AV, Liles WC. Posaconazole: A new agent for the prevention and management of severe, refractory or invasive fungal infections. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*. 2008;19(4):297-305. doi:10.1155/2008/825901
123. Torres HA, Hachem RY, Chemaly RF, Kontoyiannis DP, Raad II. Posaconazole: a broad-spectrum triazole antifungal. *Lancet Infect Dis*. 2005;5(12):775-785. doi:10.1016/S1473-3099(05)70297-8
124. Xiao L, Madison V, Chau AS, Loebenberg D, Palermo RE, McNicholas PM. Three-dimensional models of wild-type and mutated forms of cytochrome P450 14 α -sterol demethylases from *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans* provide insights into posaconazole binding. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(2):568-574. doi:10.1128/AAC.48.2.568-574.2004
125. Moore JN, Healy JR, Kraft WK. Pharmacologic and clinical evaluation of posaconazole. *Expert Review of Clinical Pharmacology*. 2015;8(3):321-334. doi:10.1586/17512433.2015.1034689
126. Lyseng-Williamson KA. Posaconazole: a pharmacoeconomic review of its use in the prophylaxis of invasive fungal disease in immunocompromised hosts. *Pharmacoeconomics*. 2011;29(3):251-268. doi:10.2165/11206800-000000000-00000
127. Lee Y, Puumala E, Robbins N, Cowen LE. Antifungal Drug Resistance: Molecular Mechanisms in *Candida albicans* and beyond. *Chemical Reviews*. 2021;121(6):3390-3411. doi:10.1021/acs.chemrev.0c00199
128. Revie NM, Iyer KR, Robbins N, Cowen LE. Antifungal drug resistance: evolution, mechanisms and impact. *Curr Opin Microbiol*. 2018;45:70-76. doi:10.1016/j.mib.2018.02.005
129. Cowen LE, Sanglard D, Howard SJ, Rogers PD, Perlin DS. Mechanisms of Antifungal Drug Resistance. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2015;5(7):a019752. doi:10.1101/cshperspect.a019752
130. Morio F, Loge C, Besse B, Hennequin C, Le Pape P. Screening for amino acid substitutions in the *Candida albicans* Erg11 protein of azole-susceptible and azole-resistant clinical isolates: new substitutions and a review of the literature. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2010;66(4):373-384. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2009.11.006
131. Wu Y, Gao N, Li C, Gao J, Ying C. A newly identified amino acid substitution T123I in the 14 α -demethylase (Erg11p) of *Candida albicans* confers azole resistance. *FEMS Yeast Research*. 2017;17(3):fox012. doi:10.1093/femsyr/fox012
132. Xiang MJ, Liu JY, Ni PH, és mtsi. Erg11 mutations associated with azole resistance in clinical isolates of *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res*. 2013;13(4):386-393. doi:10.1111/1567-1364.12042
133. Marichal P, Koymans L, Willemsens S, és mtsi. Contribution of mutations in the cytochrome P450 14 α -demethylase (Erg11p, Cyp51p) to azole resistance in *Candida albicans*. *Microbiology (Reading)*. 1999;145 (Pt 10):2701-2713. doi:10.1099/00221287-145-10-2701
134. Casalnuovo IA, Di Francesco P, Garaci E. Fluconazole resistance in *Candida albicans*: a review of mechanisms. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2004;8(2):69-77.
135. Spettel K, Barousch W, Makristathis A, és mtsi. Analysis of antifungal resistance genes in *Candida albicans* and *Candida glabrata* using next generation sequencing. *PLoS One*. 2019;14(1):e0210397. doi:10.1371/journal.pone.0210397
136. Morio F, Pagniez F, Lacroix C, Miegerville M, Le Pape P. Amino acid substitutions in the *Candida albicans* sterol 5,6-desaturase (Erg3p) confer azole resistance: characterization of two novel mutants with impaired virulence. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2012;67(9):2131-2138. doi:10.1093/jac/dks186
137. Revie NM, Iyer KR, Robbins N, Cowen LE. Antifungal drug resistance: evolution, mechanisms and impact. *Curr Opin Microbiol*. 2018;45:70-76. doi:10.1016/j.mib.2018.02.005
138. Franz R, Kelly SL, Lamb DC, Kelly DE, Ruhnke M, Morschhäuser J. Multiple molecular mechanisms contribute to a stepwise development of fluconazole resistance in clinical *Candida albicans* strains. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998;42(12):3065-3072. doi:10.1128/AAC.42.12.3065
139. Akins RA. An update on antifungal targets and mechanisms of resistance in *Candida albicans*. *Med Mycol*. 2005;43(4):285-318. doi:10.1080/13693780500138971
140. Hoot SJ, Smith AR, Brown RP, White TC. An A643V amino acid substitution in Upc2p contributes to azole resistance in well-characterized clinical isolates of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(2):940-942. doi:10.1128/AAC.00995-10
141. Flowers SA, Barker KS, Berkow EL, és mtsi. Gain-of-function mutations in *UPC2* are a frequent cause of *ERG11* upregulation in azole-resistant clinical isolates of *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*. 2012;11(10):1289-1299. doi:10.1128/EC.00215-12
142. Vasicek EM, Berkow EL, Flowers SA, Barker KS, Rogers PD. *UPC2* Is Universally Essential for Azole Antifungal Resistance in *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell*. 2014;13(7):933-946. doi:10.1128/EC.00221-13
143. Whaley SG, Caudle KE, Vermitsky JP, és mtsi. *UPC2A* Is Required for High-Level Azole Antifungal Resistance in *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(8):4543-4554. doi:10.1128/AAC.02217-13

144. Coleman JJ, Mylonakis E. Efflux in Fungi: La Pièce de Résistance. *PLOS Pathogens*. 2009;5(6):e1000486. doi:10.1371/journal.ppat.1000486
145. Sanglard D, Coste A, Ferrari S. Antifungal drug resistance mechanisms in fungal pathogens from the perspective of transcriptional gene regulation. *FEMS Yeast Res*. 2009;9(7):1029-1050. doi:10.1111/j.1567-1364.2009.00578.x
146. Tsao S, Rahkhoodaee F, Raymond M. Relative contributions of the *Candida albicans* ABC transporters Cdr1p and Cdr2p to clinical azole resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(4):1344-1352. doi:10.1128/AAC.00926-08
147. Coste AT, Karababa M, Ischer F, Bille J, Sanglard D. *TAC1*, transcriptional activator of *CDR* genes, is a new transcription factor involved in the regulation of *Candida albicans* ABC transporters *CDR1* and *CDR2*. *Eukaryot Cell*. 2004;3(6):1639-1652. doi:10.1128/EC.3.6.1639-1652.2004
148. Coste A, Turner V, Ischer F, és mtsi. A mutation in Tac1p, a transcription factor regulating *CDR1* and *CDR2*, is coupled with loss of heterozygosity at chromosome 5 to mediate antifungal resistance in *Candida albicans*. *Genetics*. 2006;172(4):2139-2156. doi:10.1534/genetics.105.054767
149. Vermitsky JP, Earhart KD, Smith WL, Homayouni R, Edlind TD, Rogers PD. Pdr1 regulates multidrug resistance in *Candida glabrata*: gene disruption and genome-wide expression studies. *Molecular Microbiology*. 2006;61(3):704-722. doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05235.x
150. Wirsching S, Michel S, Morschhäuser J. Targeted gene disruption in *Candida albicans* wild-type strains: the role of the *MDR1* gene in fluconazole resistance of clinical *Candida albicans* isolates. *Mol Microbiol*. 2000;36(4):856-865. doi:10.1046/j.1365-2958.2000.01899.x
151. Lamping E, Monk BC, Niimi K, és mtsi. Characterization of three classes of membrane proteins involved in fungal azole resistance by functional hyperexpression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell*. 2007;6(7):1150-1165. doi:10.1128/EC.00091-07
152. Dunkel N, Blass J, Rogers PD, Morschhäuser J. Mutations in the multi-drug resistance regulator *MRR1*, followed by loss of heterozygosity, are the main cause of *MDR1* overexpression in fluconazole-resistant *Candida albicans* strains. *Mol Microbiol*. 2008;69(4):827-840. doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06309.x
153. Morschhäuser J, Barker KS, Liu TT, Blaß-Warmuth J, Homayouni R, Rogers PD. The transcription factor Mrr1p controls expression of the *MDR1* efflux pump and mediates multidrug resistance in *Candida albicans*. *PLoS Pathogens*. 2007;3(11):1603-1616. doi:10.1371/journal.ppat.0030164
154. Harrison BD, Hashemi J, Bibi M, és mtsi. A Tetraploid Intermediate Precedes Aneuploid Formation in Yeasts Exposed to Fluconazole. *PLOS Biology*. 2014;12(3):e1001815. doi:10.1371/journal.pbio.1001815
155. Selmecki A, Forche A, Berman J. Aneuploidy and isochromosome formation in drug-resistant *Candida albicans*. *Science*. 2006;313(5785):367-370. doi:10.1126/science.1128242
156. Coste A, Selmecki A, Forche A, és mtsi. Genotypic evolution of azole resistance mechanisms in sequential *Candida albicans* isolates. *Eukaryot Cell*. 2007;6(10):1889-1904. doi:10.1128/EC.00151-07
157. Selmecki A, Forche A, Berman J. Genomic plasticity of the human fungal pathogen *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*. 2010;9(7):991-1008. doi:10.1128/EC.00060-10
158. Lafayette SL, Collins C, Zaas AK, és mtsi. PKC signaling regulates drug resistance of the fungal pathogen *Candida albicans* via circuitry comprised of mkc1, calcineurin, and hsp90. *PLoS Pathogens*. 2010;6(8):79-80. doi:10.1371/journal.ppat.1001069
159. Cowen LE. Hsp90 Orchestrates Stress Response Signaling Governing Fungal Drug Resistance. *PLOS Pathogens*. 2009;5(8):e1000471. doi:10.1371/journal.ppat.1000471
160. Robbins N, Collins C, Morhayim J, Cowen LE. Metabolic control of antifungal drug resistance. *Fungal Genet Biol*. 2010;47(2):81-93. doi:10.1016/j.fgb.2009.07.004
161. Ramage G, Bachmann S, Patterson TF, Wickes BL, López-Ribot JL. Investigation of multidrug efflux pumps in relation to fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2002;49(6):973-980. doi:10.1093/jac/dkf049
162. Mukherjee PK, Chandra J, Kuhn DM, Ghannoum MA. Mechanism of Fluconazole Resistance in *Candida albicans* Biofilms: Phase-Specific Role of Efflux Pumps and Membrane Sterols. *Infect Immun*. 2003;71(8):4333-4340. doi:10.1128/IAI.71.8.4333-4340.2003
163. Chowdhary A, Prakash A, Sharma C, és mtsi. A multicentre study of antifungal susceptibility patterns among 350 *Candida auris* isolates (2009-17) in India: Role of the *ERG11* and *FKS1* genes in azole and echinocandin resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2018;73(4):891-899. doi:10.1093/jac/dkx480
164. Rybak JM, Muñoz JF, Barker KS, és mtsi. Mutations in *TAC1B*: A novel genetic determinant of clinical fluconazole resistance in *Candida auris*. *mBio*. 2020;11(3):1-16. doi:10.1128/mBio.00365-20
165. Rybak JM, Sharma C, Doorley LA, Barker KS, Palmer GE, Rogers PD. Delineation of the Direct Contribution of *Candida auris* *ERG11* Mutations to Clinical Triazole Resistance. *Microbiol Spectr*. 2021;9(3):e0158521. doi:10.1128/Spectrum.01585-21

166. Chow NA, Muñoz JF, Gade L, és mtsi. Tracing the Evolutionary History and Global Expansion of *Candida auris* Using Population Genomic Analyses. *mBio*. 2020;11(2):e03364-19. doi:10.1128/mBio.03364-19
167. Rybak JM, Doorley LA, Nishimoto AT, Barker KS, Palmer GE, Rogers PD. Abrogation of Triazole Resistance upon Deletion of *CDR1* in a Clinical Isolate of *Candida auris*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2019;63(4). doi:10.1128/aac.00057-19
168. Mayr EM, Ramirez-Zavala B, Krüger I, Morschhäuser J. A Zinc Cluster Transcription Factor Contributes to the Intrinsic Fluconazole Resistance of *Candida auris*. *mSphere*. 2020;5(2):e00279-20. doi:10.1128/mSphere.00279-20
169. Iyer KR, Camara K, Daniel-Ivad M, és mtsi. An oxindole efflux inhibitor potentiates azoles and impairs virulence in the fungal pathogen *Candida auris*. *Nat Commun*. 2020;11:6429. doi:10.1038/s41467-020-20183-3
170. Rybak JM, Cuomo CA, David Rogers P. The molecular and genetic basis of antifungal resistance in the emerging fungal pathogen *Candida auris*. *Current Opinion in Microbiology*. 2022;70:102208. doi:10.1016/j.mib.2022.102208
171. Kean R, Delaney C, Sherry L, és mtsi. Transcriptome Assembly and Profiling of *Candida auris* Reveals Novel Insights into Biofilm-Mediated Resistance. Mitchell AP, ed. *mSphere*. 2018;3(4):1-14. doi:10.1128/msphere.00334-18
172. Shapiro RS, Robbins N, Cowen LE. Regulatory Circuitry Governing Fungal Development, Drug Resistance, and Disease. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2011;75(2):213-267. doi:10.1128/mmbr.00045-10
173. Allana J Sucher, Elias B Chahine, and Holly E Balcer. Echinocandins: The Newest Class of Antifungals. *The Annals of Pharmacotherapy*. 2009;Volume 43. doi:10.1345/aph.1M237
174. Denning DW. Echinocandin antifungal drugs. *Lancet*. 2003;362(9390):1142-1151. doi:10.1016/S0140-6736(03)14472-8
175. Nivoix Y, Ledoux MP, Herbrecht R. Antifungal Therapy: New and Evolving Therapies. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*. 2020;41(1):158-174. doi:10.1055/s-0039-3400291
176. Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR, és mtsi. Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2016;62(4):e1-50. doi:10.1093/cid/civ933
177. Grau S, Pozo JC, Romá E, és mtsi. Cost-effectiveness of three echinocandins and fluconazole in the treatment of candidemia and/or invasive candidiasis in nonneutropenic adult patients. *ClinicoEconomics and Outcomes Research: CEOR*. 2015;7:527. doi:10.2147/CEOR.S91587
178. Mikamo H, Sato Y, Tamaya T. In vitro antifungal activity of FK463, a new water-soluble echinocandin-like lipopeptide. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2000;46(3):485-487. doi:10.1093/jac/46.3.485
179. Nishiyama Y, Uchida K, Yamaguchi H. Morphological changes of *Candida albicans* induced by micafungin (FK463), a water-soluble echinocandin-like lipopeptide. *J Electron Microsc (Tokyo)*. 2002;51(4):247-255. doi:10.1093/jmicro/51.4.247
180. Berrio I, Maldonado N, De Bedout C, és mtsi. Comparative study of *Candida* spp. isolates: Identification and echinocandin susceptibility in isolates obtained from blood cultures in 15 hospitals in Medellín, Colombia. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 2018;13:254-260. doi:10.1016/j.jgar.2017.11.010
181. Pristov KE, Ghannoum MA. Resistance of *Candida* to azoles and echinocandins worldwide. *Clinical Microbiology and Infection*. 2019;25(7):792-798. doi:10.1016/j.cmi.2019.03.028
182. Perlin DS. Resistance to echinocandin-class antifungal drugs. *Drug Resist Updat*. 2007;10(3):121-130. doi:10.1016/j.drug.2007.04.002
183. Garcia-Effron G, Katiyar SK, Park S, Edlind TD, Perlin DS. A naturally occurring proline-to-alanine amino acid change in Fks1p in *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* accounts for reduced echinocandin susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52(7):2305-2312. doi:10.1128/AAC.00262-08
184. Johnson ME, Katiyar SK, Edlind TD. New Fks Hot Spot for Acquired Echinocandin Resistance in *Saccharomyces cerevisiae* and Its Contribution to Intrinsic Resistance of *Scedosporium* Species ♀. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(8):3774-3781. doi:10.1128/AAC.01811-10
185. Suwannakorn S, Wakabayashi H, Kordalewska M, Perlin DS, Rustchenko E. *FKS2* and *FKS3* Genes of Opportunistic Human Pathogen *Candida albicans* Influence Echinocandin Susceptibility. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2018;62(4):e02299-17. doi:10.1128/AAC.02299-17
186. Katiyar S, Pfaller M, Edlind T. *Candida albicans* and *Candida glabrata* clinical isolates exhibiting reduced echinocandin susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50(8):2892-2894. doi:10.1128/AAC.00349-06
187. Tavanti A, Davidson AD, Gow NAR, Maiden MCJ, Odds FC. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. *J Clin Microbiol*. 2005;43(1):284-292. doi:10.1128/JCM.43.1.284-292.2005
188. Lortholary O, Desnos-Ollivier M, Sitbon K, és mtsi. Recent exposure to caspofungin or fluconazole influences the epidemiology of candidemia: A prospective multicenter study involving 2,441 patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2011;55(2):532-538. doi:10.1128/AAC.01128-10

189. Garcia-Effron G, Lee S, Park S, Cleary JD, Perlin DS. Effect of *Candida glabrata* *FKS1* and *FKS2* mutations on echinocandin sensitivity and kinetics of 1,3-beta-D-glucan synthase: implication for the existing susceptibility breakpoint. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(9):3690-3699. doi:10.1128/AAC.00443-09
190. Ben-Ami R, Garcia-Effron G, Lewis RE, és mtsi. Fitness and Virulence Costs of *Candida albicans* *FKS1* Hot Spot Mutations Associated With Echinocandin Resistance. *The Journal of Infectious Diseases.* 2011;204(4):626-635. doi:10.1093/infdis/jir351
191. Katiyar SK, Alastruey-Izquierdo A, Healey KR, Johnson ME, Perlin DS, Edlind TD. Fks1 and Fks2 Are Functionally Redundant but Differentially Regulated in *Candida glabrata*: Implications for Echinocandin Resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(12):6304-6309. doi:10.1128/AAC.00813-12
192. Ben-Ami R, Kontoyiannis DP. Resistance to echinocandins comes at a cost. *Virulence.* 2012;3(1):95-97. doi:10.4161/viru.3.1.18886
193. Walker LA, Gow NAR, Munro CA. Elevated chitin content reduces the susceptibility of *Candida* species to caspofungin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(1):146-154. doi:10.1128/AAC.01486-12
194. Munro CA, Selvaggini S, de Bruijn I, és mtsi. The PKC, HOG and Ca²⁺ signalling pathways co-ordinately regulate chitin synthesis in *Candida albicans*. *Mol Microbiol.* 2007;63(5):1399-1413. doi:10.1111/j.1365-2958.2007.05588.x
195. Singh SD, Robbins N, Zaas AK, Schell WA, Perfect JR, Cowen LE. Hsp90 Governs Echinocandin Resistance in the Pathogenic Yeast *Candida albicans* via Calcineurin. *PLOS Pathogens.* 2009;5(7):e1000532. doi:10.1371/journal.ppat.1000532
196. Healey KR, Katiyar SK, Castanheira M, Pfaller MA, Edlind TD. *Candida glabrata* mutants demonstrating paradoxical reduced caspofungin susceptibility but increased micafungin susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(8):3947-3949. doi:10.1128/AAC.00044-11
197. Healey KR, Katiyar SK, Raj S, Edlind TD. CRS-MIS in *Candida glabrata*: sphingolipids modulate echinocandin-Fks interaction. *Mol Microbiol.* 2012;86(2):303-313. doi:10.1111/j.1365-2958.2012.08194.x
198. Sharma D, Paul RA, Rudramurthy SM, és mtsi. Impact of *FKS1* Genotype on Echinocandin *In Vitro* Susceptibility in *Candida auris* and *In Vivo* Response in a Murine Model of Infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2022;66(1):e01652-21. doi:10.1128/AAC.01652-21
199. Heaney H, Laing J, Paterson L, és mtsi. The environmental stress sensitivities of pathogenic candida species, including *Candida auris*, and implications for their spread in the hospital setting. *Medical Mycology.* 2020;58(6):744-755. doi:10.1093/MMY/MYZ127
200. Day AM, McNiff MM, da Silva Dantas A, Gow NAR, Quinn J. Hog1 Regulates Stress Tolerance and Virulence in the Emerging Fungal Pathogen *Candida auris*. Mitchell AP, ed. *mSphere.* 2018;3(5):1-13. doi:10.1128/msphere.00506-18
201. Nett JE. *Candida auris*: An emerging pathogen “incognito”? Hogan DA, ed. *PLoS Pathogens.* 2019;15(4):e1007638. doi:10.1371/journal.ppat.1007638
202. Vallabhaneni S, Kallen A, Tsay S, és mtsi. Investigation of the First Seven Reported Cases of *Candida auris*, a Globally Emerging Invasive, Multidrug-Resistant Fungus—United States, May 2013–August 2016. *American Journal of Transplantation.* 2017;17(1):296-299. doi:10.1111/ajt.14121
203. Sabino R, Sampaio P, Rosado L, Videira Z, Grenouillet F, Pais C. Analysis of clinical and environmental *Candida parapsilosis* isolates by microsatellite genotyping—a tool for hospital infection surveillance. *Clinical Microbiology and Infection.* 2015;21(10):954.e1-954.e8. doi:10.1016/j.cmi.2015.06.001
204. Jackson BR, Chow N, Forsberg K, és mtsi. On the origins of a species: What might explain the rise of *Candida auris*? *Journal of Fungi.* 2019;5(3):58. doi:10.3390/jof5030058
205. Sharma C, Kumar N, Pandey R, Meis JF, Chowdhary A. Whole genome sequencing of emerging multidrug resistant *Candida auris* isolates in India demonstrates low genetic variation. *New Microbes and New Infections.* 2016;13:77-82. doi:10.1016/j.nmni.2016.07.003
206. Chatterjee S, Alampalli SV, Nageshan RK, Chettiar ST, Joshi S, Tatu US. Draft genome of a commonly misdiagnosed multidrug resistant pathogen *Candida auris*. *BMC Genomics.* 2015;16(1):1-16. doi:10.1186/s12864-015-1863-z
207. Hayes BME, Anderson MA, Traven A, Van Der Weerden NL, Bleackley MR. Activation of stress signalling pathways enhances tolerance of fungi to chemical fungicides and antifungal proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 2014;71(14):2651-2666. doi:10.1007/s00018-014-1573-8
208. Bennett RJ, Forche A, Berman J. Rapid mechanisms for generating genome diversity: whole ploidy shifts, aneuploidy, and loss of heterozygosity. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2014;4(10):a019604. doi:10.1101/cshperspect.a019604
209. Gerstein AC, Lim H, Berman J, Hickman MA. Ploidy tug-of-war: Evolutionary and genetic environments influence the rate of ploidy drive in a human fungal pathogen. *Evolution.* 2017;71(4):1025-1038. doi:10.1111/evo.13205
210. Selmecki AM, Dulmage K, Cowen LE, Anderson JB, Berman J. Acquisition of aneuploidy provides increased fitness during the evolution of antifungal drug resistance. *PLoS Genetics.* 2009;5(10):1-16. doi:10.1371/journal.pgen.1000705

211. Bravo Ruiz G, Ross ZK, Holmes E, Schelenz S, Gow NAR, Lorenz A. Rapid and extensive karyotype diversification in haploid clinical *Candida auris* isolates. *Current Genetics*. 2019;65(5):1217-1228. doi:10.1007/s00294-019-00976-w
212. Gow NAR, Latge JP, Munro CA. The Fungal Cell Wall: Structure, Biosynthesis, and Function. *Microbiol Spectr*. 2017;5(3). doi:10.1128/microbiolspec.FUNK-0035-2016
213. Lesage G, Bussey H. Cell Wall Assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2006;70(2):317-343. doi:10.1128/MMBR.00038-05
214. de Groot PW, Ruiz C, Vázquez de Aldana CR, és mtsi. A genomic approach for the identification and classification of genes involved in cell wall formation and its regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Comp Funct Genomics*. 2001;2(3):124-142. doi:10.1002/cfg.85
215. Gordon S. Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell*. 2002;111(7):927-930. doi:10.1016/s0092-8674(02)01201-1
216. Netea MG, Brown GD, Kullberg BJ, Gow NAR. An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. *Nature Reviews Microbiology*. 2008;6(1):67-78. doi:10.1038/nrmicro1815
217. MF N, F I, S J, LA W, NA G, T L. Quantitative Analysis of *Candida* Cell Wall Components by Flow Cytometry with Triple-Fluorescence Staining. *Journal of Microbiology and Modern Techniques*. 2017;2(1):1-9. doi:10.15744/2575-5498.2.101
218. Coronado JE, Mneimneh S, Epstein SL, Qiu WG, Lipke PN. Conserved processes and lineage-specific proteins in fungal cell wall evolution. *Eukaryot Cell*. 2007;6(12):2269-2277. doi:10.1128/EC.00044-07
219. Bruno M, Kersten S, Bain JM, és mtsi. Transcriptional and functional insights into the host immune response against the emerging fungal pathogen *Candida auris*. *Nature Microbiology*. 2020;5(12):1516-1531. doi:10.1038/s41564-020-0780-3
220. Smith DFQ, Casadevall A. The Role of Melanin in Fungal Pathogenesis for Animal Hosts. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2019;422:1-30. doi:10.1007/82_2019_173
221. Smith DFQ, Mudrak NJ, Zamith-Miranda D, és mtsi. Melanization of *Candida auris* Is Associated with Alteration of Extracellular pH. *JoF*. 2022;8(10):1068. doi:10.3390/jof8101068
222. Jacobson ES, Tinnell SB. Antioxidant function of fungal melanin. *J Bacteriol*. 1993;175(21):7102-7104. doi:10.1128/jb.175.21.7102-7104.1993
223. Horton MV, Johnson CJ, Zarnowski R, és mtsi. *Candida auris* Cell Wall Mannosylation Contributes to Neutrophil Evasion through Pathways Divergent from *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *mSphere*. 2021;6(3). doi:bn
224. Dupont S, Lemetais G, Ferreira T, Cayot P, Gervais P, Beney L. Ergosterol Biosynthesis: A Fungal Pathway for Life on Land? *Evolution*. 2012;66(9):2961-2968. doi:10.1111/j.1558-5646.2012.01667.x
225. Malinsky J, Opekarová M, Grossmann G, Tanner W. Membrane Microdomains, Rafts, and Detergent-Resistant Membranes in Plants and Fungi. *Annu Rev Plant Biol*. 2013;64(1):501-529. doi:10.1146/annurev-arplant-050312-120103
226. Martin SW, Konopka JB. Lipid raft polarization contributes to hyphal growth in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*. 2004;3(3):675-684. doi:10.1128/EC.3.3.675-684.2004
227. Espenshade PJ, Hughes AL. Regulation of sterol synthesis in eukaryotes. *Annu Rev Genet*. 2007;41:401-427. doi:10.1146/annurev.genet.41.110306.130315
228. Lv Q zhen, Yan L, Jiang Y ying. The synthesis, regulation, and functions of sterols in *Candida albicans*: Well-known but still lots to learn. *Virulence*. 2016;7(6):649-659. doi:10.1080/21505594.2016.1188236
229. Hu Z, He B, Ma L, Sun Y, Niu Y, Zeng B. Recent Advances in Ergosterol Biosynthesis and Regulation Mechanisms in *Saccharomyces cerevisiae*. *Indian J Microbiol*. 2017;57(3):270-277. doi:10.1007/s12088-017-0657-1
230. Liu JF, Xia JJ, Nie KL, Wang F, Deng L. Outline of the biosynthesis and regulation of ergosterol in yeast. *World J Microbiol Biotechnol*. 2019;35(7):98.
231. Daum G, Lees ND, Bard M, Dickson R. Biochemistry, cell biology and molecular biology of lipids of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 1998;14(16):1471-1510. doi:10.1002/(SICI)1097-0061(199812)14:16<1471::AID-YEA353>3.0.CO;2-Y
232. Klug L, Daum G. Yeast lipid metabolism at a glance. *FEMS Yeast Res*. 2014;14(3):369-388. doi:10.1111/1567-1364.12141
233. Martel CM, Parker JE, Bader O, és mtsi. Identification and Characterization of Four Azole-Resistant *erg3* Mutants of *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2010;54(11):4527-4533. doi:10.1128/AAC.00348-10
234. Mukhopadhyay K, Prasad T, Saini P, Pucadyil TJ, Chattopadhyay A, Prasad R. Membrane Sphingolipid-Ergosterol Interactions Are Important Determinants of Multidrug Resistance in *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2004;48(5):1778-1787. doi:10.1128/AAC.48.5.1778-1787.2004

235. Mishra P, Bolard J, Prasad R. Emerging role of lipids of *Candida albicans*, a pathogenic dimorphic yeast. *Biochim Biophys Acta*. 1992;1127(1):1-14. doi:10.1016/0005-2760(92)90194-z
236. Prasad R, Singh A. Lipids of *Candida albicans* and their role in multidrug resistance. *Curr Genet*. 2013;59(4):243-250. doi:10.1007/s00294-013-0402-1
237. Krishnamurthy SS, Prasad R. Membrane fluidity affects functions of Cdr1p, a multidrug ABC transporter of *Candida albicans*. *FEMS Microbiology Letters*. 1999;173(2):475-481. doi:10.1111/j.1574-6968.1999.tb13541.x
238. Li-Blatter X, Beck A, Seelig A. P-Glycoprotein-ATPase Modulation: The Molecular Mechanisms. *Biophys J*. 2012;102(6):1383-1393. doi:10.1016/j.bpj.2012.02.018
239. Decottignies A, Grant AM, Nichols JW, de Wet H, McIntosh DB, Goffeau A. ATPase and multidrug transport activities of the overexpressed yeast ABC protein Yor1p. *J Biol Chem*. 1998;273(20):12612-12622. doi:10.1074/jbc.273.20.12612
240. Dogra S, Krishnamurthy S, Gupta V, és mtsi. Asymmetric distribution of phosphatidylethanolamine in *C. albicans*: possible mediation by *CDR1*, a multidrug transporter belonging to ATP binding cassette (ABC) superfamily. *Yeast*. 1999;15(2):111-121. doi:10.1002/(SICI)1097-0061(19990130)15:2<111::AID-YEA350>3.0.CO;2-E
241. Zamith-Miranda D, Heyman HM, Cleare LG, és mtsi. Multi-omics Signature of *Candida auris*, an Emerging and Multidrug-Resistant Pathogen. Elias J, ed. *mSystems*. 2019;4(4):1-14. doi:10.1128/mSystems.00257-19
242. Kumar M, Singh A, Kumari S, és mtsi. Sphingolipidomics of drug resistant *Candida auris* clinical isolates reveal distinct sphingolipid species signatures. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2021;1866(1):158815. doi:10.1016/j.bbalip.2020.158815
243. Kwon YJ, Shin JH, Byun SA, és mtsi. *Candida auris* Clinical Isolates from South Korea: Identification, Antifungal Susceptibility, and Genotyping. *Journal of Clinical Microbiology*. 2019;57(4):e01624-18. doi:10.1128/JCM.01624-18
244. Yuen KWY, Warren CD, Chen O, Kwok T, Hieter P, Spencer FA. Systematic genome instability screens in yeast and their potential relevance to cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(10):3925-3930. doi:10.1073/pnas.0610642104
245. Kim SH, Iyer KR, Pardeshi L, és mtsi. Genetic analysis of candida auris implicates Hsp90 in morphogenesis and azole tolerance and Cdr1 in azole resistance. Kronstad JW, ed. *mBio*. 2019;10(1):e02529-18. doi:10.1128/mBio.02529-18
246. Chybowska AD, Childers DS, Farrer RA. Nine Things Genomics Can Tell Us About *Candida auris*. *Frontiers in Genetics*. 2020;11(April):1-18. doi:10.3389/fgene.2020.00351
247. Katragkou A, Alexander EL, Eoh H, Raheem SK, Roilides E, Walsh TJ. Effects of fluconazole on the metabolomic profile of *Candida albicans*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2016;71(3):635-640. doi:10.1093/jac/dkv381
248. Lorenz MC, Fink GR. The glyoxylate cycle is required for fungal virulence. *Nature*. 2001;412(6842):83-86. doi:10.1038/35083594
249. Han TL, Cannon RD, Villas-Bôas SG. The metabolic basis of *Candida albicans* morphogenesis and quorum sensing. *Fungal Genet Biol*. 2011;48(8):747-763. doi:10.1016/j.fgb.2011.04.002
250. Doedt T, Krishnamurthy S, Bockmühl DP, és mtsi. APSES proteins regulate morphogenesis and metabolism in *Candida albicans*. *Mol Biol Cell*. 2004;15(7):3167-3180. doi:10.1091/mbc.e03-11-0782
251. Genetic variation in the cysteine biosynthesis pathway causes sensitivity to pharmacological compounds | PNAS. Accessed February 23, 2023. <https://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.0708194104>
252. Baek YU, Kim YR, Yim HS, Kang SO. Disruption of gamma-glutamylcysteine synthetase results in absolute glutathione auxotrophy and apoptosis in *Candida albicans*. *FEBS Lett*. 2004;556(1-3):47-52. doi:10.1016/s0014-5793(03)01363-2
253. Zhu J, Krom BP, Sanglard D, és mtsi. Farnesol-induced apoptosis in *Candida albicans* is mediated by Cdr1-p extrusion and depletion of intracellular glutathione. *PLoS One*. 2011;6(12):e28830. doi:10.1371/journal.pone.0028830
254. Katragkou A, Alexander EL, Eoh H, Raheem SK, Roilides E, Walsh TJ. Effects of fluconazole on the metabolomic profile of *Candida albicans*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2016;71(3):635-640. doi:10.1093/jac/dkv381
255. Janeway CA. A primitive immune system. *Nature*. 1989;341(6238):108-108. doi:10.1038/341108a0
256. Erwig LP, Gow NAR. Interactions of fungal pathogens with phagocytes. *Nat Rev Microbiol*. 2016;14(3):163-176. doi:10.1038/nrmicro.2015.21
257. Netea MG, Joosten LAB, Van Der Meer JWM, Kullberg BJ, Van De Veerdonk FL. Immune defence against *Candida* fungal infections. *Nature Reviews Immunology*. 2015;15(10):630-642. doi:10.1038/nri3897
258. Gantner BN, Simmons RM, Underhill DM. Dectin-1 mediates macrophage recognition of *Candida albicans* yeast but not filaments. *EMBO J*. 2005;24(6):1277-1286. doi:10.1038/sj.emboj.7600594
259. Rogers NC, Slack EC, Edwards AD, és mtsi. Syk-dependent cytokine induction by Dectin-1 reveals a novel pattern recognition pathway for C type lectins. *Immunity*. 2005;22(4):507-517. doi:10.1016/j.immuni.2005.03.004
260. Gow NAR, Netea MG, Munro CA, és mtsi. Immune Recognition of *Candida albicans* β -glucan by Dectin-1. *J Infect Dis*. 2007;196(10):1565-1571. doi:10.1086/523110
261. Mora-Montes HM, Netea MG, Ferwerda G, és mtsi. Recognition and blocking of innate immunity cells by *Candida albicans* chitin. *Infection and Immunity*. 2011;79(5):1961-1970. doi:10.1128/IAI.01282-10

262. Wagener J, Malireddi RKS, Lenardon MD, és mtsi. Fungal Chitin Dampens Inflammation through IL-10 Induction Mediated by NOD2 and TLR9 Activation. *PLOS Pathogens*. 2014;10(4):e1004050. doi:10.1371/journal.ppat.1004050
263. Vendele I, Willment JA, Silva LM, és mtsi. Mannan detecting C-type lectin receptor probes recognise immune epitopes with diverse chemical, spatial and phylogenetic heterogeneity in fungal cell walls. *PLoS Pathog*. 2020;16(1):e1007927. doi:10.1371/journal.ppat.1007927
264. Hall RA, Bates S, Lenardon MD, és mtsi. The Mnn2 mannosyltransferase family modulates mannoprotein fibril length, immune recognition and virulence of *Candida albicans*. *PLoS Pathog*. 2013;9(4):e1003276. doi:10.1371/journal.ppat.1003276
265. Wileman TE, Lennartz MR, Stahl PD. Identification of the macrophage mannose receptor as a 175-kDa membrane protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;83(8):2501-2505. doi:10.1073/pnas.83.8.2501
266. Netea MG, Gow NAR, Munro CA, és mtsi. Immune sensing of *Candida albicans* requires cooperative recognition of mannans and glucans by lectin and Toll-like receptors. *J Clin Invest*. 2006;116(6):1642-1650. doi:10.1172/JCI27114
267. Kéry V, Krepinský JJ, Warren CD, Capek P, Stahl PD. Ligand recognition by purified human mannose receptor. *Arch Biochem Biophys*. 1992;298(1):49-55. doi:10.1016/0003-9861(92)90092-b
268. Ariizumi K, Shen GL, Shikano S, és mtsi. Cloning of a second dendritic cell-associated C-type lectin (dectin-2) and its alternatively spliced isoforms. *J Biol Chem*. 2000;275(16):11957-11963. doi:10.1074/jbc.275.16.11957
269. Torres SR, Pichowicz A, Torres-Velez F, és mtsi. Impact of *Candida auris* infection in a neutropenic murine model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2020;64(3):1-7. doi:10.1128/AAC.01625-19
270. Mohammadi F, Ghasemi Z, Familsatari B, és mtsi. Relationship between antifungal susceptibility profile and virulence factors in *Candida albicans* isolated from nail specimens. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2020;53(December 2019):1-7. doi:10.1590/0037-8682-0214-2019
271. Figueiredo-Carvalho MHG, Ramos L de S, Barbedo LS, és mtsi. Relationship between the Antifungal Susceptibility Profile and the Production of Virulence-Related Hydrolytic Enzymes in Brazilian Clinical Strains of *Candida glabrata*. *Mediators of Inflammation*. 2017;2017:1-10. doi:10.1155/2017/8952878
272. Vale-Silva LA, Sanglard D. Tipping the balance both ways: drug resistance and virulence in *Candida glabrata*. *FEMS Yeast Research*. 2015;15(4):25. doi:10.1093/femsyr/fov025
273. Lewis RE, Viale P, Kontoyiannis DP. The potential impact of antifungal drug resistance mechanisms on the host immune response to *Candida*. *Virulence*. 2012;3(4):368-376. doi:10.4161/viru.20746
274. Fan S, Zhan P, Bing J, és mtsi. A biological and genomic comparison of a drug-resistant and a drug-susceptible strain of *Candida auris* isolated from Beijing, China. *Virulence*. 2021;12(1):1388-1399. doi:10.1080/21505594.2021.1928410
275. Luna-Tapia A, Willems HME, Parker JE, és mtsi. Loss of Upc2p-Inducible *ERG3* Transcription Is Sufficient To Confer Niche-Specific Azole Resistance without Compromising *Candida albicans* Pathogenicity. *mBio*. 2018;9(3). doi:10.1128/mBio.00225-18
276. Papp C, Bohner F, Kocsis K, és mtsi. Triazole Evolution of *Candida parapsilosis* Results in Cross-Resistance to Other Antifungal Drugs, Influences Stress Responses, and Alters Virulence in an Antifungal Drug-Dependent Manner. Mitchell AP, ed. *mSphere*. 2020;5(5):1-15. doi:10.1128/mSphere.00821-20
277. Vale-Silva LA, Coste AT, Ischer F, és mtsi. Azole Resistance by Loss of Function of the Sterol $\Delta 5,6$ -Desaturase Gene (*ERG3*) in *Candida albicans* Does Not Necessarily Decrease Virulence. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2012;56(4):1960-1968. doi:10.1128/AAC.05720-11
278. Ferrari S, Ischer F, Calabrese D, és mtsi. Gain of Function Mutations in CgPDR1 of *Candida glabrata* Not Only Mediate Antifungal Resistance but Also Enhance Virulence. Filler SG, ed. *PLoS Pathogens*. 2009;5(1):e1000268. doi:10.1371/journal.ppat.1000268
279. Wiederhold NP, Najvar LK, Bocanegra RA, Kirkpatrick WR, Patterson TF. Caspofungin Dose Escalation for Invasive Candidiasis Due to Resistant *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2011;55(7):3254-3260. doi:10.1128/AAC.01750-10
280. Papp C, Kocsis K, Tóth R, és mtsi. Echinocandin-Induced Microevolution of *Candida parapsilosis* Influences Virulence and Abiotic Stress Tolerance. Butler G, ed. *mSphere*. 2018;3(6):1-16. doi:10.1128/msphere.00547-18
281. Lee KK, MacCallum DM, Jacobsen MD, és mtsi. Elevated cell wall chitin in *Candida albicans* confers echinocandin resistance in vivo. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(1):208-217. doi:10.1128/AAC.00683-11
282. Ksiezopolska E, Gabaldón T. Evolutionary emergence of drug resistance in *candida* opportunistic pathogens. *Genes*. 2018;9(9):461. doi:10.3390/genes9090461
283. Ford CB, Funt JM, Abbey D, és mtsi. The evolution of drug resistance in clinical isolates of *Candida albicans*. *eLife*. 4:e00662. doi:10.7554/eLife.00662
284. Pais P, Galocha M, Viana R, Cavalheiro M, Pereira D, Teixeira MC. Microevolution of the pathogenic yeasts *Candida albicans* and *Candida glabrata* during antifungal therapy and host infection. *Microbial Cell*. 2019;6(3):142-159. doi:10.15698/mic2019.03.670

285. Schubert S, Popp C, Rogers PD, Morschhäuser J. Functional dissection of a *Candida albicans* zinc cluster transcription factor, the multidrug resistance regulator Mrr1. *Eukaryot Cell*. 2011;10(8):1110-1121. doi:10.1128/EC.05100-11
286. Selmecki A, Gerami-Nejad M, Paulson C, Forche A, Berman J. An isochromosome confers drug resistance in vivo by amplification of two genes, *ERG11* and *TAC1*. *Molecular Microbiology*. 2008;68(3):624-641. doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06176.x
287. Vale-Silva L, Beaudoin E, Tran VDT, Sanglard D. Comparative Genomics of Two Sequential *Candida glabrata* Clinical Isolates. *G3 (Bethesda)*. 2017;7(8):2413-2426. doi:10.1534/g3.117.042887
288. Singh-Babak SD, Babak T, Diezmann S, és mtsi. Global analysis of the evolution and mechanism of echinocandin resistance in *Candida glabrata*. *PLoS Pathogens*. 2012;8(5). doi:10.1371/journal.ppat.1002718
289. Elena SF, Lenski RE. Evolution experiments with microorganisms: The dynamics and genetic bases of adaptation. *Nature Reviews Genetics*. 2003;4(6):457-469. doi:10.1038/nrg1088
290. Cowen LE, Sanglard D, Calabrese D, Sirjusingh C, Anderson JB, Kohn LM. Evolution of drug resistance in experimental populations of *Candida albicans*. *J Bacteriol*. 2000;182(6):1515-1522. doi:10.1128/JB.182.6.1515-1522.2000
291. Huang M, McClellan M, Berman J, Kao KC. Evolutionary Dynamics of *Candida albicans* during *In Vitro* Evolution. *Eukaryot Cell*. 2011;10(11):1413-1421. doi:10.1128/EC.05168-11
292. Skrzypek MS, Binkley J, Binkley G, Miyasato SR, Simison M and SG. “*Candida* Genome Database” <http://www.candidagenome.org/>.
293. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-408. doi:10.1006/meth.2001.1262
294. Rabaan AA, Eljaaly K, Alfouzan WA, és mtsi. Psychogenetic, genetic and epigenetic mechanisms in *Candida auris*: Role in drug resistance. *Journal of Infection and Public Health*. 2023;16(2):257-263. doi:10.1016/j.jiph.2022.12.012
295. Vincent BM, Lancaster AK, Scherz-Shouval R, Whitesell L, Lindquist S. Fitness Trade-offs Restrict the Evolution of Resistance to Amphotericin B. Mitchell AP, ed. *PLoS Biology*. 2013;11(10):e1001692. doi:10.1371/journal.pbio.1001692
296. Ahmad S, Khan Z, Al-Sweih N, Alfouzan W, Joseph L. *Candida auris* in various hospitals across Kuwait and their susceptibility and molecular basis of resistance to antifungal drugs. *Mycoses*. 2020;63(1):104-112. doi:10.1111/myc.13022
297. You L, Qian W, Yang Q, és mtsi. *ERG11* gene mutations and *MDR1* upregulation confer pan-azole resistance in *Candida tropicalis* causing disseminated candidiasis in an acute lymphoblastic leukemia patient on posaconazole prophylaxis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2017;61(7):S54. doi:10.1128/AAC.02496-16
298. Ruckwardt T, Scott A, Scott J, Mikulecky P, Hartsel SC. Lipid and stress dependence of amphotericin B ion selective channels in sterol-free membranes. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. 1998;1372(2):283-288. doi:10.1016/S0005-2736(98)00073-X
299. Tsujimoto Y, Shimizu Y, Otake K, és mtsi. Multidrug resistance transporters Snq2p and Pdr5p mediate caffeine efflux in *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 2015;79(7):1103-1110. doi:10.1080/09168451.2015.1010476
300. Martel CM, Parker JE, Bader O, és mtsi. A clinical isolate of *Candida albicans* with mutations in *ERG11* (encoding sterol 14alpha-demethylase) and *ERG5* (encoding C22 desaturase) is cross resistant to azoles and amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(9):3578-3583. doi:10.1128/AAC.00303-10
301. Kelly SL, Lamb DC, Kelly DE, és mtsi. Resistance to fluconazole and cross-resistance to amphotericin B in *Candida albicans* from AIDS patients caused by defective sterol $\Delta 5,6$ -desaturation. *FEBS Letters*. 1997;400(1):80-82. doi:10.1016/S0014-5793(96)01360-9
302. Nolte FS, Parkinson T, Falconer DJ, és mtsi. Isolation and characterization of fluconazole- and amphotericin B-resistant *Candida albicans* from blood of two patients with leukemia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1997;41(1):196-199. doi:10.1128/AAC.41.1.196
303. Oliver JC, Laghi L, Parolin C, és mtsi. Metabolic profiling of *Candida* clinical isolates of different species and infection sources. *Sci Rep*. 2020;10(1):16716. doi:10.1038/s41598-020-73889-1
304. Saeed FA. Production of pyruvate by *Candida albicans*: proposed role in virulence. *FEMS Microbiology Letters*. 2000;190(1):35-38. doi:10.1111/j.1574-6968.2000.tb09258.x
305. Sunyer-Figueres M, Mas A, Beltran G, Torija MJ. Protective Effects of Melatonin on *Saccharomyces cerevisiae* under Ethanol Stress. *Antioxidants (Basel)*. 2021;10(11):1735. doi:10.3390/antiox10111735
306. Tan DX, Hardeland R, Back K, Manchester LC, Alatorre-Jimenez MA, Reiter RJ. On the significance of an alternate pathway of melatonin synthesis via 5-methoxytryptamine: comparisons across species. *Journal of Pineal Research*. 2016;61(1):27-40. doi:10.1111/jpi.12336
307. Lin CJ, Chen YL. Conserved and divergent functions of the CAMP/PKA signaling pathway in *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. *Journal of Fungi*. 2018;4(2). doi:10.3390/jof4020068

308. Soulard A, Cremonesi A, Moes S, Schütz F, Jenö P, Hall MN. The rapamycin-sensitive phosphoproteome reveals that TOR controls protein kinase A toward some but not all substrates. *Molecular Biology of the Cell*. 2010;21(19):3475-3486. doi:10.1091/mbc.E10-03-0182
309. Kunkel J, Luo X, Capaldi AP. Integrated TORC1 and PKA signaling control the temporal activation of glucose-induced gene expression in yeast. *Nature Communications*. 2019;10(1):1-11. doi:10.1038/s41467-019-11540-y
310. Kuranda K, Leberre V, Sokol S, Palamarczyk G, François J. Investigating the caffeine effects in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* brings new insights into the connection between TOR, PKC and Ras/cAMP signalling pathways. *Molecular Microbiology*. 2006;61(5):1147-1166. doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05300.x
311. Johnston EJ, Moses T, Rosser SJ. The wide-ranging phenotypes of ergosterol biosynthesis mutants, and implications for microbial cell factories. *Yeast*. 2020;37(1):27-44. doi:10.1002/yea.3452
312. Estrada AF, Muruganandam G, Prescianotto-Baschong C, Spang A. The ArfGAP2/3 Glo3 and ergosterol collaborate in transport of a subset of cargoes. *Biology Open*. 2015;4(7):792-802. doi:10.1242/bio.011528
313. Souza CM, Schwabe TME, Pichler H, és mtsi. A stable yeast strain efficiently producing cholesterol instead of ergosterol is functional for tryptophan uptake, but not weak organic acid resistance. *Metabolic Engineering*. 2011;13(5):555-569. doi:10.1016/j.ymben.2011.06.006
314. Schmelzle T, Beck T, Martin DE, Hall MN. Activation of the RAS/Cyclic AMP Pathway Suppresses a TOR Deficiency in Yeast. *Molecular and Cellular Biology*. 2004;24(1):338-351. doi:10.1128/mcb.24.1.338-351.2004
315. Hogan DA, Sundstrom P. The Ras/cAMP/PKA signaling pathway and virulence in *Candida albicans*. *Future Microbiology*. 2009;4(10):1263-1270. doi:10.2217/fmb.09.106
316. Misas E, Escandón P, McEwen JG, Clay OK. The LUFs domain, its transcriptional regulator proteins, and drug resistance in the fungal pathogen *Candida auris*. *Protein Science*. 2019;28(11):2024-2029. doi:10.1002/pro.3727
317. Kim JS, Lee KT, Lee MH, Cheong E, Bahn YS. Adenylyl Cyclase and Protein Kinase A Play Redundant and Distinct Roles in Growth, Differentiation, Antifungal Drug Resistance, and Pathogenicity of *Candida auris*. *mBio*. 2021;12(5). doi:10.1128/mBio.02729-21
318. Navarro-Arias MJ, Hernández-Chávez MJ, García-Carnero LC, és mtsi. Differential recognition of *Candida tropicalis*, *Candida guilliermondii*, *Candida krusei*, and *Candida auris* by human innate immune cells. *Infection and Drug Resistance*. 2019;12:783-794. doi:10.2147/IDR.S197531
319. Wang Y, Zou Y, Chen X, és mtsi. Innate immune responses against the fungal pathogen *Candida auris*. *Nat Commun*. 2022;13(1):3553. doi:10.1038/s41467-022-31201-x
320. Sun JN, Solis NV, Phan QT, és mtsi. Host Cell Invasion and Virulence Mediated by *Candida albicans* Ssa1. *PLOS Pathogens*. 2010;6(11):e1001181. doi:10.1371/journal.ppat.1001181
321. Khillan V, Rathore N, Kathuria S, Chowdhary A. A rare case of breakthrough fungal pericarditis due to fluconazole-resistant *Candida auris* in a patient with chronic liver disease. *JMM Case Reports*. 2014;1(3):e003707. doi:10.1099/jmmcr.0.T00018