

## STRESZCZENIE

**Wstęp:** Pochodne azoli są najczęściej stosowaną grupą leków w terapii zakażeń drożdżakami. Od kilku lat obserwuje się zjawisko narastania oporności *Candida spp.* na tę grupę leków. Jeden z mechanizmów braku wrażliwości na azole związany jest z genami: *CDR1*, *CDR2*, *MRD1* (produktami tych genów są aktywne pompy transportowe warunkujące wyrzut leków z komórki patogenu) oraz genu *ERG11* (kodującego 14 $\alpha$ -demetylazę lanosterolu).

**Cel pracy:** Celem pracy była analiza zespołu wybranych molekularnych mechanizmów oporności szczepów *Candida albicans* na leki azolowe poprzez badanie ekspresji genów *CDR1*, *CDR2*, *MDR1* i *ERG11* u szczepów *Candida albicans* wrażliwych i opornych na leki azolowe, wpływu wybranych mutacji genu *ERG11* na jego ekspresję oraz określenie stopnia metylacji DNA genomu *Candida albicans*.

**Materiały i metody:** Materiałem badanym było 120 szczepów *Candida albicans* (60 wrażliwych i 60 opornych na leki azolowe) uzyskanych z próbek klinicznych (plwociny, ropa, mocz, krew, aspiraty z oskrzeli) pochodzących od chorych hospitalizowanych w Samodzielnym Publicznym Szpitalu im. Jana Pawła II w Nowym Targu, gdzie dokonano oceny wrażliwości szczepów na leki azolowe. W kolejnym etapie badania dokonano izolacji RNA, syntezy komplementarnego cDNA oraz oceny ekspresji genów *CDR1*, *CDR2*, *MDR1* i *ERG11* metodą Q-PCR. Jako kontrolę endogenną zastosowano  $\beta$ -aktynę. Jako kalibrator wykorzystano szczep wzorcowy *Candida albicans* nie traktowany żadnymi lekami. Wykonano również sekwencjonowanie genu *ERG11* i analizę wpływu mutacji na ekspresję tego genu. W ostatnim etapie doświadczenia dokonano izolacji DNA i oceny stopnia metylacji genomu szczepów *Candida albicans*.

**Wyniki:** Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono wzrost ekspresji genów *CDR2*, *MDR1* i *ERG11* u szczepów *Candida albicans* opornych na azole w porównaniu ze szczepami wrażliwymi na tę grupę leków. Ponadto w badanych szczepach wykryto 19 zmian w sekwencji genu *ERG11*. Cztery z odkrytych mutacji: T495A, A530C, G622A i A945C prowadziło do substytucji aminokwasowych: odpowiednio - D116E, K128T, V159I i E266D. Wykazano również, że statystycznie na zmianę ekspresję genu *ERG11* wpływało pięć

mutacji: T462C, G1309A, C216T, C1257T oraz A945C, przy czym obecność dwóch pierwszy zwiększała, a pozostałych zmniejszała względną ekspresję genu *ERG11*. Dzięki doświadczeniu wykazano ponadto, że szczepy *Candida albicans* wrażliwe jak i odporne nie różniły się stopniem metylacji genomu.

**Wnioski:** Oporność na azole szczepów *Candida albicans* ma charakter wieloczynnikowy. Związana jest zarówno z genami wpływającymi na funkcjonowanie aktywnych pomp transportujących, uczestniczących w wyrzuceniu leku z komórki jak i z genem kodującym 14- $\alpha$ -demetylazę lanosterolu - enzymem będący celem działania leków azolowych. Na podstawie analizy statystycznej wyników można przyjąć, iż główny molekularny mechanizm oporności na azole w przypadku przebadanych szczepów *Candida albicans* związany jest z nadekspresją genu *CDR2*, *MDR1* i *ERG11*. Na ekspresję genu *ERG11* wpływ mają zmiany w jego sekwencji (głównie mutacja G1309A). Zastosowana metoda oceny stopnia metylacji genomu *Candida albicans* nie wykazała roli tego zjawiska w kształtowaniu się oporności na azole.

**Słowa kluczowe:** *Candida albicans*, oporność, azole

## Abstract

**Background:** Azoles are the most common class of drugs for yeast infections. The possible molecular mechanism of azoles resistance is associated with *CDR1*, *CDR2*, *MRD1* genes (genes encoding active transporters of drugs), and *ERG11* gene (the gene encoding lanosterol 14 $\alpha$ -demethylase).

**Aim:** The aim of the study was the assessment of the expression of *CDR1*, *CDR2*, *MDR1*, and *ERG11* genes in *Candida albicans* strains sensitive and resistant to azole drugs.

**Aim:** The aim of this study was to analyze selected molecular mechanisms of resistance to azoles in *Candida albicans* strains by studying the expression of *CDR1*, *CDR2*, *MDR1* and *ERG11*; analyze nucleotide substitutions in the *Candida albicans* *ERG11* gene and DNA methylation of the genome of *Candida albicans*.

**Materials and methods:** The *Candida albicans* isolates represented a collection of 120 strains isolated from different biological materials specimens (sputum, pus, urine, blood, bronchial aspirates). RNA isolates were used to cDNA synthesis by reverse transcription reaction. Received cDNA was used to determine genes expression level by real-time quantitative PCR assay (Q-PCR). Were also *ERG11* gene sequencing and analysis of the effect of the mutation on the expression of the gene and DNA methylation of the genome of *Candida albicans*.

**Results:** The obtained results showed an increase in expression of genes *CDR2*, *MDR1* and *ERG11* strains of *Candida albicans* azole-resistant strains compared with sensitive to this group of drugs. Furthermore, 19 strains analyzed were detected changes in *ERG11* gene sequence. Four of the discovered mutations: T495A, A530C, G622A and A945C led to amino acid substitutions: respectively - D116, K128T, V159I and E266D. It was also shown that substitution statistically *ERG11* gene expression influenced five mutations T462C, G1309A, C216T, C1257T and A945C, wherein the presence of two first increased and decreased relative remaining *ERG11* gene expression. Through experience has also been demonstrated that strains of *Candida albicans* sensitive and resistant do not differ in the degree of methylation of the genome.

**Conclusions:** Resistance to azoles *Candida albicans* is a multidirectional. Is associated both with genes that affect the functioning of the active transport pumps, participating in the cast of the drug from the cell and from the gene encoding 14- $\alpha$ -demethylase of lanosterol - an enzyme which azole drug targets. The statistical analysis of results it can be assumed that the main molecular mechanism of resistance to the azole in the case of *Candida albicans* strains tested is associated with overexpression of the *CDR2*, *MDR1* and *ERG11* gene. *ERG11* gene expression are affected by changes in its sequence. The applied method of assessing the degree of methylation of the genome of *Candida albicans* has not demonstrated the role of this phenomenon in the evolution of resistance to azoles.

**Keywords:** *Candida albicans*, resistance, azoles