

DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**A *CANDIDA* GOMBÁK SZÁJJÜREGI LAPHÁMSEJTES
KARCINÓMA PROGRESSZIÓJÁRA GYAKOROLT
HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA**

VADOVICS MÁTÉ

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



**BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA
SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS INFORMATIKAI KAR
MIKROBIOLÓGIAI TANSZÉK**

SZEGED

2022

Irodalmi áttekintés

A fej-nyaki daganatok komoly egészségügyi problémát jelentenek világszerte, 2018-ban a nyolcadik helyen álltak a leggyakrabban előforduló tumorok listáján. Az összes tumoros megbetegedés 2-4%-a érinti a szájüreget, ezek több mint 90%-a szájüregi laphámsejtes karcinóma. 2004 és 2009 között több mint 300.000 szájüreget, illetve szájgaratot érintő tumort regisztráltak világszerte. Ugyanebben az időszakban több mint 7.000 ember halt meg ennek a tumor típusnak a következtében.

Ahogy a legtöbb betegség esetén, a szájüregi laphámsejtes karcinóma (OSCC) kialakulásában is genetikai és környezeti tényezők játszanak szerepet. Ezek a tényezők a dohányzás, alkoholfogyasztás, táplálkozási szokások, onkogén vírusok, családi és genetikai hajlam, immunszuppresszált állapot, szájhygiéna, valamint a száj mikroflórája.

A baktériumok és vírusok karcinogenezisben betöltött szerepe egy intenzíven vizsgált terület. Ezzel szemben a gombák szerepéről még igen keveset tudunk, mivel egyedszámuk alacsonyabb a baktériumokéhoz képest, valamint nem rendelkezünk megfelelő referencia genomokkal. A rendelkezésünkre álló tudás alapján azonban elmondható, hogy a mikrobiom (mikrobióta gombák alkotta része) tagjai is hozzájárulhatnak a karcinogenezishez.

Az egészséges szájüregben a *Candida* gombák, azon belül is a *C. albicans* van jelen a legnagyobb mértékben. A *C. albicans* a hidrolitikus enzimek termelése, valamint a hifaképzés révén képes

bejutni a szöveti rétegekbe. Ezek a tulajdonságok alapvetően előnyt jelentenek a *C. albicans* számára a többi gombával szemben, azonban végső soron a gazda immunrendszere határozza meg, hogy adott esetben a gomba eltávolítása, kolonizációja vagy betegség kialakulása valósul meg. Számos tanulmány összefüggésbe hozta már a szájban létrejövő mikrobióta diszbiózist és az OSCC-t. Az OSCC-vel diagnosztizált páciensek szájüregében több, illetve többféle élesztőgomba található, mint az egészséges szájüregben. Ezenfelül több élesztőgomba található a tumor felszínén, mint a szájüreg egészséges felszínein. Ezek, illetve más tanulmányok arra engednek következtetni, hogy feltehetően a *Candida* fajoknak direkt szerepe lehet az OSCC kialakulásában. Tanulmányok igazolták, hogy az epitélium *Candida* általi inváziója esetén az epitélsejtek egy része rendellenes fejlődésen mehet keresztül, ami később rosszindulatú elváltozásokat eredményezhet.

A már jelenlévő OSCC esetén a leggyakrabban alkalmazott terápia a kemoradio-terápia, amelynek hatására nő a kolonizáló élesztőgombák száma, így nagyobb az esély az orális candidiasis kialakulására. Több tanulmány is beszámolt a tumorterápiát követő megemelkedett *Candida* gomba kolonizációról. A megemelkedett *Candida* kolonizáció hátterében a tumorterápia következtében megváltozott immunológiai környezet áll, amely lehetőséget nyújt az orális candidiasis kialakulására.

Célkitűzések

A szakirodalomban fellelhető adatok egyértelműen bizonyítják az OSCC és az orális candidiasis kapcsolatát. A már kialakult OSCC esetén a tumorterápia következtében gyakran orális candidiasis alakul ki. Feltételezhető, hogy a *Candida* gombák befolyásolhatják az OSCC progresszióját, azonban ezt a jelenséget még senki sem vizsgálta. Munkánk során ezért a következő célokat tűztük ki:

1. Hőinaktivált *Candida* gombák, valamint a zimozán (gombasejtfal komponens, általános gomba stimulus) OSCC sejtek inváziós és proliferációs aktivitására gyakorolt hatásának vizsgálata *in vitro*.
2. Élő *Candida* gombák OSCC sejtek inváziós és proliferációs aktivitására gyakorolt hatásának vizsgálata *in vitro*.
3. A *Candida* gombák hatásának molekuláris szintű vizsgálata transzkriptomikai vizsgálatok segítségével.
4. *In vivo* xenograft modell kidolgozása a *Candida* gombák OSCC sejtek progressziójára gyakorolt hatásának vizsgálatához.
5. *Candida* gombák OSCC sejtek progressziójára gyakorolt hatásának vizsgálata *in vivo* xenograft modellben.

Alkalmazott módszerek

***In vitro* vizsgálati módszerek:** HSC-2 és HO-1-N-1 sejtvonalak; sebzési (Wound healing) esszé; BrdU ELISA (enzim kapcsolt immunszorbens vizsgálat); OSCC sejtek *Candida* sejtekkel és zimozánnal történő kezelése és feltárása metabolomikai vizsgálatokhoz; metabolitok nagyhatékonyságú folyadékkromatográffal kapcsolt nagyfelbontású tömegspektrometriás (HPLC-HRMS) vizsgálata; élő sejtkövetési technika (time-lapse videó); metalloproteináz esszé; totál RNS izolálás az OSCC sejtek *in vitro* mintáiból; RNS szekvenálás; transzkriptóm analízis; génkapcsolatok vizsgálata az Ingenuity Pathway Analysis (IPA) szoftver segítségével; cDNS szintézis és qPCR a szekvenálási adatok validálásához; MMP10 és MMP1 fehérjék Western blot analízise.

Egér xenograft modell kidolgozása az orális candidiasis OSCC progressziójára gyakorolt hatásának vizsgálatához: vad típusú egerek immunszuppresszállása; egerek érzéstelenítése; HSC-2 szájüregi laphámsejtes karcinóma sejtek egér nyelvbe történő injektálása; orális candidiasis előidézése egérben; orális candidiasis előidézés sikerességének ellenőrzése nyelv homogenizátum szélesztéssel; RNS kivonása a xenograft tumor mintákból; tumormetszetek hisztopatológiai festése (H&E, PAS, vimentin, E-cadherin, p63); RNS szekvenálás; transzkriptóm analízis.

Eredmények

1. A hőinaktivált és élő *Candida* gombák OSCC sejtekre gyakorolt hatásának vizsgálata *in vitro*

Munkánk során vizsgáltuk, hogy a szájüregben túlzottan elszaporodó *Candida* gombák befolyásolják-e a szájüregi laphámsejtes karcinóma progresszióját. Elsőként *in vitro* vizsgáltuk a hőinaktivált, valamint az élő *Candida* gombák és a zimozán hatását. Kísérleti eredményeinkből megállapítható, hogy az OSCC sejtek proliferációs aktivitása sem a HI-*Candida* sejtek és zimozán jelenlétében, sem az élő *Candida* sejtek jelenlétében nem változott. Azonban a tumorsejtek migrációs aktivitása szignifikánsan megemelkedett HI-*Candida* sejtek és zimozán jelenlétében. Az élő sejt követési technika (time-lapse videó) alapján elmondható, hogy a HSC-2 sejtek élő *C. albicans* sejtek jelenlétében a konfluens réteg sebzésének szélén, a gombatelepek közelében, egymástól elszakadva, magányosan vándoroltak az üres terület irányába. Ezt a jelenséget nem, vagy csak kis mértékben figyeltük meg az élő *C. albicans* sejteket nem tartalmazó kontroll minták esetében.

A hőinaktivált gombasejtekkel és a zimozánnal történő kezelést követően enyhe szekretált MMP aktivitást figyeltünk meg. Az élő *C. albicans* sejtekkel történő kezelés mindkét sejtvonal MMP aktivitását szignifikánsan növelte. Ugyanakkor *C. parapsilosis* esetén nem figyeltünk meg változást.

A metabolomikai vizsgálatok eredményeiből kiderül, hogy a HI-*Candida* sejtek, illetve a zimozán jelenlétében néhány metabolit mennyisége változott, azonban csekély mértékben, valamint a változások között nem látható összefüggés. Élő *C. albicans* jelenlétében szignifikánsan megnőtt a tumorsejtekben a szukcinát és az aszpartát mennyisége.

2. *In vitro* transzkriptomikai analízis

Az *in vitro* transzkriptomikai analízis molekuláris szinten is megerősítette azt az eredményt, miszerint az élő *C. albicans* sejtek jelenléte növelte az OSCC sejtek, elsősorban a HSC-2 sejtvonalt, progresszióval összefüggő folyamatait. Az eredmények összecsengenek a migrációs, MMP aktivitási és metabolomikai vizsgálatokkal, miszerint a HI-*Candida*, a zimozán és az élő *C. parapsilosis* sejtek nem vagy enyhe változást eredményeztek az OSCC sejtek progresszióját tekintve. Az élő *C. albicans* sejtek jelenlétében megfigyelt fenotipikus változásokat alátámasztották a transzkriptomikai vizsgálatok, mivel megemelkedett a szukcinát és az aszpartát onkometabolitok metabolizmusában szerepet játszó gének expressziós szintje.

Továbbá szignifikáns növekedést figyeltünk meg négy MMP gén expressziós szintjében (MMP1, MMP10, MMP9, MMP3), amely szintén összecseng a szekretált MMP aktivitás vizsgálatok eredményeivel. A szakirodalmi adatokat elemezve azonosítottunk olyan OSCC markergéneket, amelyek expressziója szignifikánsan

változik *C. albicans* jelenlétében. Tizennégy olyan OSCC progressziós markergént találtunk (ATF3, F3, FOS, FOXC2, HBEGF, IL6, INHBA, JUN, LIF, PHLDA1, PLAUR, PTHLH, SEMA7A, VEGFA), amelyek HSC-2 és HO-1-N-1 sejtekben is upregulálódtak élő *C. albicans* sejtek hatására. A HSC-2 sejt vonal esetén azonosítottunk számos génextpressziós változást, amely lehetőséget biztosított további analízisek elvégzésére. A változó géneket vizsgálva olyan jelátviteli utak aktivációját is azonosítottuk, amelyeknek szerepe van az OSCC proliferációjában, inváziójában, tumornövekedésében, angiogenezisében és metasztázis képzésében. A HSC-2 sejtekben megváltozott expressziót mutató gének alapján végzett kauzális génkapcsolat vizsgálat a tumor progressziójával kapcsolatos folyamatokat prediktált, amelyek bekövetkezhetnek élő *C. albicans* sejtek hatására. Ilyen folyamatok például a tumorsejtek proliferációja, túlélése, metasztázisa, angiogenezise, inváziója, viabilitása vagy a citotoxikus T-sejtek gátlása.

3. Az orális candidiasis OSCC progressziójára gyakorolt hatásának vizsgálata *in vivo*

Annak érdekében, hogy megvizsgálhassuk az orális candidiasis hatását az OSCC progressziójára, sikeresen létrehoztunk egy *in vivo* xenograft egérmodellt, amelyben immunszuppresszált egerek nyelvében OSCC-t, majd orális candidiasist idéztünk elő. Ezután összehasonlítottuk az orális candidiasist elszenvedő és el nem szenvedő állatcsoportokat. A hisztopatológiai vizsgálatok alapján

megállapítottuk, hogy *C. albicans* hatására erős gyulladás alakult ki. A gyulladás elősegítheti a tumorprogressziót és a metasztázist azáltal, hogy tumorprogressziót elősegítő citokinek termelődnek. A hisztopatológiai vizsgálatok során orális candidiasis hatására kialakuló epiteliális-mezenchimális tranzíciót és trombózt is megfigyeltünk. Az EMT kulcsszerepet játszik a tumorinvázió és a metasztázis folyamataiban. A trombózis is bizonyítottan elősegíti a tumor progresszióját, azonban a pontos mechanizmusok részleteiben még nem ismertek.

Annak érdekében, hogy megbizonyosodjunk az orális candidiasis tumorprogressziót elősegítő szerepéről, a p63, E-cadherin és vimentin immunhisztokémiai festését végeztük el. A p63 fehérjét a TP63 gén kódolja, amely a TP53 gén (p53 fehérje) homológja. A p63 túltermelődése jól alkalmazható prognosztikai markerként laphámsejtes karcinóma esetén. Az *in vivo* minták esetén elmondható, hogy orális candidiasis hatására magasabb szinten expresszálódott, valamint lokalizálódott a sejtmagban a p63 fehérje. Laphámsejtes karcinóma esetén a vimentin expressziója metasztázissal és rosszabb prognózissal hozható összefüggésbe. A hisztopatológiai minták esetében orális candidiasis hatására több vimentin-pozitív sejtet detektáltunk, mint a kontroll minták esetében.

Egy korábbi tanulmány kimutatta, hogy a csökkent E-cadherin mennyiség egy jól használható marker a tumor növekedett inváziós kapacitásának kimutatására. Az orális candidiasis hatására E-cadherin csökkenést figyeltünk meg az *in vivo* tumormintákban. A *C. albicans* általi emelkedett p63, vimentin és csökkent E-cadherin

expresszió arra enged következtetni, hogy a túlszaporodott *C. albicans* sejtek növelik az EMT folyamatát, amely rosszabb végkimenetelre utal a betegek túlélését tekintve.

A hisztopatológiai eredményeket megerősítették az *in vivo* transzkriptomikai eredmények. Öt olyan gént azonosítottunk, amelyek szerepet játszanak az OSCC progressziójában, és orális candidiasis esetében nő génextpressziós szintjük (MMP1, MMP10, COL5A2, SERPINB4, CRABP2). Fontos kiemelni az MMP1-et és az MMP10-et, mivel az *in vitro* vizsgálatok is kimutatták, hogy a *C. albicans* növeli az összes szekretált MMP aktivitást.

Összegzésként a következő eredmények eléréséről számolhatunk be:

1. A hőinaktivált *Candidák*, valamint a zimozán hatással vannak az OSCC sejtek metasztázissal összefüggésbe hozható tulajdonságaira.
2. Az élő *Candida* gombák hatással vannak az OSCC sejtek metasztázissal összefüggésbe hozható tulajdonságaira.
3. Az élő *C. albicans* stimulus aktiválja az OSCC invazív folyamataiban szerepet játszó géneket és jelátviteli utakat *in vitro*.

4. Sikeresen kidolgoztunk egy új xenograft egérmodellt a *C. albicans* OSCC progressziójára gyakorolt hatásának vizsgálatához.
5. Az orális candidiasis elősegíti az OSCC progresszióját *in vivo*.
6. Az orális candidiasis növeli az OSCC progresszióját különböző gének expressziójának befolyásolásával *in vivo*.

Referált folyóiratban megjelent közlemények:

Máté Vadovics, Jemima Ho, Nóra Igaz, Róbert Alföldi, Dávid Rakk, Eva Veres, Balázs Szücs, Márton Horváth, Renáta Tóth, Attila Szücs, Andrea Csibi, Péter Horváth, László Tiszlavicz, Csaba Vágvölgyi, Joshua D. Nosanchuk, András Szekeres, Mónika Kiricsi, Rhonda Henley-Smith, David L. Moyes, Selvam Thavaraj, Rhys Brown, László G. Puskás, Julian R. Naglik, Attila Gácser. *Candida albicans Enhances the Progression of Oral Squamous Cell Carcinoma In Vitro and In Vivo*. mBio. 13(1): e03144-21. IF: **7,867**

Katalin Csonka, **Máté Vadovics**, Annamária Marton, Csaba Vágvölgyi, Erik Zajta, Adél Tóth, Renáta Tóth, Csaba Vizler, László Tiszlavicz, Héctor M. Mora-Montes, Attila Gácser. *Investigation of OCHI in the Virulence of Candida parapsilosis Using a New Neonatal Mouse Model*. Frontiers in Microbiology. 2017; 8:1197. IF: **4,019**

Összesített impakt faktor: 11,886

MTMT azonosító: 0081293

A kutatást az LP2018-15/2018 projekt támogatta.