

**DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI**

**A BIOAKTÍV LIPIDEK ÉS A ZSÍRSAV-BIOSZINTÉZIS SZEREPE  
A *CANDIDA PARAPSILOSIS* VIRULENCIÁJÁBAN**

**GRÓZER ZSUZSANNA BARBARA**

**TÉMAVEZETŐK:**

**DR. GÁCSEK ATTILA**  
Tudományos Főmunkatárs

**DR. HAMARI ZSUZSANNA**  
Docens

**BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA**



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

**SZEGED  
2014**

## Irodalmi Áttekintés

Az utóbbi évtizedekben szembesülhettünk a különböző *Candida* fajok által okozott opportunista fertőzések megnövekedett számával, főként az immunszuppresszált betegek számának világszerte történő növekedése miatt. A nemzetség tagjai közül a fertőzések során leggyakrabban izolált fajok a *Candida albicans*, a *Candida glabrata* és a *Candida parapsilosis*. Ezen mikrobák egyéb mikroorganizmusokkal együtt az emlősök természetes mikrobiota közösségének részét képezik. A *C. parapsilosis* nem obligát humán patogén, elsősorban nem humán forrásokból izolálták, azonban mint humán kommenzalista, egyike azon gombáknak, amelyet az ember bőrfelszínéről izolálnak. Bizonyos hajlamosító tényezők megléte esetén súlyos kórfolyamatokat válthat ki, elsősorban nem megfelelően működő immunrendszerrel rendelkező betegek esetében. A klinikumban ezen fertőzések leggyakoribb jellemzői a láz, a septicus sokk és a veseelégtelenség, továbbá tumorosodás és diabetes mellitus is kialakulhat. A leginkább érintett célcsoportok az újszülöttek, a transzplantáción átesettek és az idősek köréből kerülnek ki. Mivel a candidiázisok legfőbb okozója a *C. albicans*, az elmúlt 30 évben erről a fajról halmozódott fel a legtöbb molekuláris és genetikai ismeretanyag a nemzetség tagjai közül. A közelmúltban azonban néhány nem-*albicans Candida* faj genom szekvenciája is meghatározásra került, így lehetőség nyílt genetikai hátterük és ezáltal biológiai működésük részletesebb megismerésére. Ezen opportunistá patogén fajokról gyűjtött információk hozzásegítenek az antifungális terápiák, irányított immun-beavatkozások, illetve a gombafertőzések diagnosztizálásának fejlődéséhez. A *Candida* fertőzések patomechanizmusát számos virulenciafaktor határozza meg, ezek közül a legjelentősebbek a gazdasejteken történő megtapadás, a pszeudohifa- és

biofilmképzés, valamint a hidrolitikus enzimek szekréciója. Annak ellenére, hogy intenzív kutatás folyik a gombák virulenciafaktorainak meghatározásának érdekében, igen keveset tudunk a virulencia tényezőkről a *C. parapsilosis* esetében, jóllehet ezek a kutatások alapul szolgálhatnak a diagnózis, a kezelés és a lehetséges megelőzés hatékonyságának növeléséhez. Ezen ismeretek bővítése céljából megkezdtük a *C. parapsilosis* egy lehetséges virulencia faktorának, a proszttaglandin-bioszintézisnek, illetve a gomba *de novo* zsírsav-bioszintézisének vizsgálatát. Munkánk eredményei a *CpOLE2* gén szerepének mélyebb megismerésével, továbbá a *C. parapsilosis* proszttaglandin-bioszintézisében feltételezhetően szerepet játszó gének azonosításával gazdagítják a szakirodalmi adatokat.

## **Alkalmazott módszerek**

A kísérletekben használt sejtek tenyésztése, fenntartása, transzformálása és növekedésének vizsgálata: primer sejtek izolálása és fenntartása, élesztő és *E. coli* sejtek fenntartása és felszaporítása, élesztő és *E. coli* sejtek transzformálása, élesztő sejtek növekedési vizsgálata, fagociták in vitro fertőzése, fagociták ölési hatékonyságának vizsgálata, fagociták pusztulásának vizsgálata

Molekuláris technikák: PCR, gélelektroforézis, DNS izolálás élesztőből, plazmid izolálás *E. coli*-ból, molekuláris klónozás, irányított géniűtés élesztőből, Southern hibridizáció, RNS kivonás élesztőből, cDNS szintézis, qRT-PCR, microarray vizsgálat, áramlási citometria

Mikroszkópos technikák: akridinarnancs/kristályibolya festés és fluoreszcens mikroszkópia

Fehérjemunkák: enzim-kötött immunoszorbens módszer (ELISA)

In vivo virulencia vizsgálatok: viaszmosoly (*Galleria mellonella*)  
lárvák fertőzése

Analitikai mérések (kollaborációban): zsírsavak gázkromatográfiás vizsgálata, prosztaglandin-profil és prosztaglandin E<sub>2</sub> meghatározás fermentléből HPLC-MS módszerrel, prosztaglandin-profil és prosztaglandin E<sub>2</sub> meghatározás fermentléből HPLC-FLD módszerrel

## Elért eredmények

A *C. parapsilosis* prosztaglandin termelésének vizsgálata: Arachidonsavas (AA) indukciót követő HPLC-MS analízis segítségével igazoltuk, hogy a *C. parapsilosis* sejtek képesek a *C. albicans*-hoz hasonló mennyiségű gomba prosztaglandinok előállítására.

A *CpOLE2* gén *de novo* zsírsav-, illetve prosztaglandin-bioszintézisben betöltött szerepének vizsgálata: A *C. parapsilosis*-ban azonosított feltételezett zsírsav deszaturáz (*CpOle2*) prosztaglandin-bioszintézisben játszott szerepének vizsgálata érdekében létrehoztuk a homozigóta *OLE2* deléciós törzset, egy a *Candida* fajokra optimalizált helyspecifikus rekombinázt alkalmazó géniütési rendszer ismételt alkalmazásával. Megállapítottuk, hogy a mutáns törzs növekedési és stressztűrő képessége nem különbözik a vad típusú törzstől, azonban a deléció csökkent virulenciát okozott. Ezt követően HPLC-MS analízis segítségével megvizsgáltuk a PGE<sub>2</sub>-höz hasonló gomba prosztaglandin termelést a vad típusú és a *CpOLE2* homozigóta deléciós törzsben AA-as indukciót követően. Az eredmények alapján a deléciós törzs prosztaglandin-termelése nem különbözik a vad típusú törzshöz képest, tehát elmondható, hogy a *CpOLE2* gén nem szükséges a *C. parapsilosis* prosztaglandin-bioszintézisében. Annak érdekében, hogy a *CpOLE2* deléciós törzs *de novo* zsírsav-bioszintézisben betöltött szerepét felfedjük, gázkromatográfiás (GC) analízis segítségével megvizsgáltuk a mutáns törzs zsírsav-profilját és azt összehasonlítottuk a GA1 vad típusú törzs zsírsav-profiljával. Köszönhetően a zsírsav-profilban feldúsuló egyszerűen telítetlen zsírsavaknak, a *CpOLE2* gén termékének  $\Delta 12$  deszaturáz aktivitását feltételezhetjük. Ezen eredmények egybevágóak a *C. albicans*-nál tapasztaltakkal, miszerint a

*CaOLE2* gén terméke nem volt képes komplementálni a *S. cerevisiae*  $\Delta 9$  deszaturáz gén hiányát, azonban bizonyították a deszaturáz aktivitását.

További, a prosztoglandin-bioszintézisben szerepet játszó gének azonosítása és jellemzése: Mivel a *CpOLE2* génről bebizonyosodott, hogy nem játszik szerepet a gomba prosztoglandin termelésében, célul tűztük ki a *C. parapsilosis* prosztoglandin-szerű molekulák bioszintetikus útvonalának felderítését. Ehhez AA-val indukált és nem indukált vad típusú törzs expressziós mintázatát hasonlítottuk össze microarray analízissel. Összesen öt gén esetében tapasztaltunk megváltozott expressziót. Azonosítottuk a *CpUGA3* gént, melynek ortológjai „cink ujj” DNS-kötő domént tartalmazó transzkripciós faktorok; a *CpSOU2* gént, melynek ortológjai sztereo-specifikus karbonil-reduktázok; a *CpOLE1* zsírsav deszaturáz gént (*de novo* zsírsav-bioszintézis esszenciális enzime) és további 2, ismeretlen funkciójú gént. A CPAR2\_703920 gén ortológjai citokróm-c aktivitással rendelkeznek, míg a CPAR2\_108490 gén ortológjai gomba típusú vakuólum elhelyezkedést mutatnak. Az azonosított, feltételezhetően a prosztoglandin-bioszintézisben szerepet játszó gének funkcionális vizsgálata érdekében deléciós mutánsokat hoztunk létre, egy a *C. parapsilosis*-ra optimalizált fúziós PCR technika alkalmazásával. Miután megállapítottuk, hogy a mutáns törzsek növekedési és stressztűrő képességüket tekintve nem különböznek a vad típusú törzstől, elvégeztük a mutáns törzsek virulencia vizsgálatait. A virulencia kísérletek során a CPAR2\_703920 és a CPAR2\_108490 deléciós törzsek nem mutattak jelentős virulencia változást. Figyelemre méltó azonban, hogy a *CpUGA3* és *CpSOU2* mutáns törzsek az *in vitro* ölési kísérletek, valamint az *in vivo* *Galleria mellonella* fertőzési kísérletek során hipervirulens fenotípust mutattak. A jelenség magyarázata további vizsgálatokat igényel, amelyek jelenleg is folynak

laborunkban. Mivel a *CpUGA3* egy transzkripció faktorot kódol, ezért különösen érdekes volt számunkra az, hogy a deléciós törzsben milyen prosztaglandin termelődést tapasztalunk. A *CpUGA3* deléciós törzs prosztaglandin-termelési képességének a CLIB214 vad típusú törzssel történő összehasonlítása során bizonyítottuk a *CpUGA3* deléciós mutáns prosztaglandin-termelésének jelentős - egy nagyságrenddel történő - csökkenését, amely egyértelműen arra utal, hogy a *CpUGa3* fehérje a prosztaglandin-bioszintézis út egyik regulátora lehet.

## Összefoglalás

- A *C. parapsilosis* sejtek képesek exogén AA-ból gomba prosztaglandin előállítására
- A *C. parapsilosis*-ban létrehoztuk a homozigóta *OLE2* deléciós törzset
- A mutáns törzs fiziológiáját tekintve nem mutat eltérést a vad típusú törzshöz képest, viszont a deléció csökkent virulencia képességet okozott
- A deléciós törzs prosztaglandin termelése nem különbözik a vad típusú törzshöz képest → a *CpOLE2* gén nem játszik szerepet a *C. parapsilosis* prosztaglandin-bioszintézisében
- A *CpOLE2* mutáns törzs esetében  $\Delta 12$ -deszaturáz aktivitást feltételezünk a megváltozott zsírsav profil alapján
- Microarray analízis segítségével további 5 gént azonosítottunk, amelyeknek feltételezhetően szerepük van a gombaproztaglandin bioszintézisében, ötből négy gén esetében homozigóta deléciós mutáns törzseket hoztunk létre
- A *CpUGA3* transzkripciós faktor deléciós törzs prosztaglandin termelés vizsgálata alapján feltételezzük a *CpUGA3* gén prosztaglandin-bioszintézisben betöltött szerepét
- A mutáns törzsek pro- és anti-inflammatorikus citokin termelés indukálásában nem tapasztaltunk különbséget a vad típusúhoz képest → a *CpUGA3* mutáns csökkent prosztaglandin termelésének virulenciában betöltött szerepét további *in vivo* kísérletekkel kell alátámasztani



## Publikáció referált folyóiratokban

- M., Czibula Á., **Grózer Z.**, Szécsényi A., Péter Z.Á., Raskó I., Illés T. (2011) Association Study of BMP4, IL6, Leptin, MMP3, MTNR1B Gene Promoter Polymorphisms and Adolescent Idiopathic Scoliosis. *Spine*
- Tibor Németh; Adél Tóth; Judit Szenzenstein; Péter Horváth; Joshua Daniel Nosanchuk; **Zsuzsanna Grózer**; Renáta Tóth; Csaba Papp; Csaba Vágvolgyi; Zsuzsanna Hamari; Attila Gacser (2013) Characterization of Virulence Properties in the *C. parapsilosis Sensu Lato* Species. *PLoS ONE* 8(7): e68704. doi:10.1371/journal.pone.0068704
- Szenzenstein J, Gácser A, **Grózer Z**, Farkas Z, Nagy K, Vágvolgyi C, Márki-Zay J, Pfeiffer I. (2013) Differential sensitivity of the species of *Candida parapsilosis sensu lato* complex against statins. *Mycopathologia*. 2013 Oct;176(3-4):211-7. doi: 10.1007/s11046-013-9689-1.
- Connolly LA1, Riccombeni A, **Grózer Z**, Holland LM, Lynch DB, Andes DR, Gácser A, Butler G. (2013) The APSES transcription factor Efg1 is a global regulator that controls morphogenesis and biofilm formation in *Candida parapsilosis*. *Mol Microbiol*. 2013 Oct;90(1):36-53. doi: 10.1111/mmi.12345.
- Linda M. Holland, Markus S. Schröder, Siobhán A. Turner, Heather Taff, David Andes, **Zsuzsanna Grózer**, Attila Gácser, Lauren Ames, Ken Haynes, Desmond G. Higgins, Geraldine Butler (2014)

Comparative Phenotypic Analysis of the Major Fungal Pathogens *Candida parapsilosis* and *Candida albicans*. PLoS Pathog. 2014 Sep 18;10(9):e1004365. doi: 10.1371/journal.ppat.1004365. eCollection 2014.

- **Zsuzsanna Grózer**, Adél Tóth, Renáta Tóth, Anita Kecskeméti, Csaba Vágvölgyi, Joshua D. Nosanchuk, András Szekeres, Attila Gácsér *Candida parapsilosis* produces prostaglandins from exogenous arachidonic acid and *OLE2* is not required for their synthesis - megjelenés alatt

Összesített Impakt Faktor: 23,559