

DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI
A SYK/CARD9 SZIGNALIZÁCIÓ SZEREPE A
***CANDIDA PARAPSILOSIS* IMMUNOLÓGIAI**
FELISMERÉSÉBEN

ZAJTA ERIK

TÉMAVEZETŐ:
PROF. DR. GÁCSER ATILA
EGYETEMI TANÁR

BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA



SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS INFORMATIKAI
KAR
MIKROBIOLÓGIAI TANSZÉK
SZEGED
2020

Bevezetés

Az invazív gombás fertőzések évente ~1,5 millió embernél idéznek elő életveszélyes állapotot világszerte. A kialakító kórokozók közül kiemelt fontossággal bírnak a *Candida* nemzetség opportunista humánpatogén fajai. Ezek évente ~700000 új invazív kórképet okoznak, melyek mortalitása 46–75%. Bár a csoport klinikailag legjelentősebb faja a *C. albicans*, növekvő gyakorisággal jelennek meg a non-albicans fajok okozta infekciók. A *C. parapsilosis* a kandidémiás betegekből egyik leggyakrabban izolált gombafaj. A parenterális táplálásban részesülő, vagy más orvosilag behelyezett eszközzel kezelt páciensek, illetve az újszülöttek fokozottan ki vannak téve az általa okozott fertőzéseknek.

Az invazív mikózisok főként sérült immunitású egyéneknél alakulnak ki. A gombaellenes immunválasz megismerése tehát nagy jelentőséggel bír, mivel megalapozza az antifungális immunterápiákat. Mára számos elemét azonosították a *Candida*-ellenes védelemnek. Az ismeretek többsége azonban a *C. albicans*-szal kapcsolatos és keveset tudunk az

immunrendszer és a non-albicans fajok kölcsönhatásairól. Mivel a kiváltott immunválaszok akár az azonos nemzetségbe sorolt patogén gombák esetén is eltérő lehet, szükség van faji szintű feltárásukra.

A *C. albicans* ellenes immunitás egyik központi eleme a Syk és a CARD9 fehérjék által mediált szignalizáció. Ez az útvonal egyes gomba eredetű PAMP-okat felismerő PRR-ek jelátvitelét közvetíti, amely különböző effektor funkciókat aktivál. A *C. parapsilosis* fertőzések esetén azonban alig ismert ezen komponensek jelentősége.

Munkánkban a Syk és CARD9 *C. parapsilosis* fertőzés során betöltött szerepét vizsgáltuk. Először összehasonlítottuk a *C. parapsilosis*szal koinkubált Syk^{-/-} és CARD9^{-/-} egér makrofágok válaszreakcióit a kontroll Vt(Syk) és Vt(CARD9) sejtekével. Később invazív kandidiázis modellben vizsgáltuk meg, hogy Syk^{-/-} és CARD9^{-/-} csontvelői kiméra egerek érzékenyebb fenotípust mutatnak-e *C. parapsilosis* fertőzés során, mint a kontroll kimérák. Referenciaként a legtöbb kísérletet egy *C. albicans* törzs felhasználásával is elvégeztük.

Módszerek

Gazda- és gombasejtek tenyésztése és *in vitro* koinkubáció (fertőzés): csontvelőből differenciáltatott (BMDM) és peritoneális makrofágok (PM) tenyésztése, *Candida* törzsek fenntartása, makrofágok fertőzése gombasejtekkel.

In vivo fertőzési modell: csontvelői kiméra egerek intravénás fertőzése *Candida* sejtekkel.

Mikroszkópia: fénymikroszkópia sejt kultúrák és szövettani preparátumok vizsgálatára.

Képképző áramlási citometria: az NF- κ B p65 sejtmagi transzlokációjának, valamint fluoreszcensen jelölt gombák makrofágok általi fagocitózisának és az ezt követő fagoszóma savasodás vizsgálatára.

Immunológiai módszerek citokinek vizsgálatára:

-Proteome Profiler

-ELISA

Élőcsíraszám meghatározás: makrofágokkal történő koinkubáció után, valamint fertőzött egerek különböző szöveteiből a gombák mennyiségi meghatározására.

Eredmények

Az NF- κ B p65 alegység sejtmagi transzlokációjának vizsgálata *C. parapsilosis*szal stimulált BMDM-ekben

C. parapsilosis törzsekkel stimulált BMDM-ekben vizsgáltuk az NF- κ B p65 alegységének sejtmagba történő transzlokációját, melyet immunfestést követő képkalkotó áramlási citometriával kivitelezünk. Azt tapasztaltuk, hogy a fertőzött Syk^{-/-} és a CARD9^{-/-} sejtekben kevésbé hatékonyan ment végbe a p65 nukleáris transzlokációja, mint a Vt(Syk) és Vt(CARD9) makrofágokban. A pozitív kontrollként alkalmazott LPS-sel kezelt Syk^{-/-} és a CARD9^{-/-} sejtekben azonban nem csökkent a transzlokáció mértéke a Vt(Syk) és Vt(CARD9) sejtekhez viszonyítva. Ezzel igazoltuk, hogy a *C. parapsilosis* által kiváltott NF- κ B aktiváció a Syk/CARD9 útvonal szabályozása alatt áll BMDM-ekben.

Citokintermelés vizsgálata *C. parapsilosis*szal és *C. albicans*szal stimulált egér makrofágokban

Proteome Profiler és ELISA módszerek segítségével vizsgáltuk a BMDM-ek és PM-ek *C. parapsilosis* törzsekkel történő stimulációjakor kialakuló citokintermelését. Összehasonlításképpen egy *C. albicans* törzset is bevontunk a kísérletbe. Eredményeink azt mutatták, hogy a Syk^{-/-} és a CARD9^{-/-} sejtek TNF α termelése minden alkalmazott *Candida* törzs esetén alacsonyabb volt a Vt(Syk) és a Vt(CARD9) makrofágokénál. Amíg a *C. parapsilosis*szal koinkubált Syk^{-/-} BMDM-ek kemokin (KC, MIP-1 α és MIP-2) termelése ép volt, addig a *C. albicans*szal fertőzöttéké elmaradt a Vt(Syk) sejtekétől. A CARD9^{-/-} BMDM-ek kemokin termelése azonban nemcsak a *C. albicans*szal, hanem a *C. parapsilosis*szal történő kezelés esetén is sérült volt. A PM-ek esetében mind a Syk^{-/-}, mind a CARD9^{-/-} sejtekben a *C. parapsilosis* és a *C. albicans* által indukált TNF α - és kemokintermelés defektusát figyeltük meg. Eredményeink összességében arra utalnak, hogy az egér makrofágok *C. parapsilosis* fertőzésre adott citokinválasza a Syk és a CARD9 befolyása alatt áll.

Megerősítettük továbbá ezen jelátviteli út szerepét a *C. albicans* által kiváltott citokintermelésben. Emellett fajspecifikus eltéréseket is azonosítottunk.

A *C. parapsilosis* és a *C. albicans* egér makrofágok általi bekebelezésének vizsgálata

Képalkotó áramlási citometriával vizsgáltuk az Alexa Fluor® 488-cal/GFP-vel jelölt *C. parapsilosis* és *C. albicans* sejtek makrofágok általi fagocitózist. A Syk^{-/-} BMDM-ek és PM-ek kevésbé hatékonyan fagocitálták mindkét *Candida* faj sejtjeit, mint a Vt(Syk) sejtek. A CARD9^{-/-} BMDM-ek és PM-ek azonban a Vt(CARD9) makrofágokhoz hasonló mértékben internalizálták mind a *C. parapsilosis* mind a *C. albicans*-t. A makrofágok *Candida* sejteket fagocitáló képessége tehát Syk-függőnek, de CARD9-függetlennek bizonyult.

A *C. parapsilosis* és *C. albicans*-t tartalmazó fagoszómák savasodásának vizsgálata egér makrofágokban

Alexa Fluor® 488-cal/GFP-vel, valamint egyidejűleg a pHrodo™ Red pH-szenzitív fluorofórral jelöltünk *C. parapsilosis* és *C. albicans* sejteket. A

makrofágokat ezekkel az élesztő sejtekkel koinkubáltuk, majd képalakító áramlási citométerrel vizsgáltuk a pHrodo™ Red⁺ makrofágok és az Alexa Fluor® 488⁺/GFP⁺ sejtek arányát, melyből a fagoszóma savasodás hatékonyságára következtettünk. Ez az érték a *C. parapsilosis* törzsekkel fertőzött Syk^{-/-} BMDM-ek és PM-ek esetében alacsonyabb volt a Vt(Syk) sejtekénél. A *C. albicans*szal kezelt Syk^{-/-} makrofágok hasonló eredményeket mutattak. A CARD9 hiánya azonban nem volt hatással a fagoszóma savasodás hatékonyságára. Így azt a következtetésre jutottunk, hogy a *C. parapsilosis* tartalmú fagoszómák savasodása egy Syk által szabályozott folyamat, amely nem függ a CARD9-től. Megerősítettük továbbá a *C. albicans* tartalmú fagoszómák savasodásának Syk-függését.

A *C. parapsilosis* egér makrofágok általi eliminációjának vizsgálata

Élő csíraszám meghatározás segítségével vizsgáltuk a különböző genotípusú makrofágok *C. parapsilosis*t elimináló képességét. Míg a Syk^{-/-} BMDM-ek kevésbé hatékonyan eliminálták a *C. parapsilosis*t,

mint a Vt(Syk) sejtek, addig a CARD9 jelenléte nem volt hatással erre a folyamatra. A Syk^{-/-} és a CARD9^{-/-} PM-ek esetén nem mutattunk ki defektust az eliminációs aktivitásban.

Fertőzésre való érzékenység vizsgálata *in vivo* kandidiázis modellben csontvelői kimérák segítségével

*C. parapsilosis*szal intravénásan fertőzött állatok szerveiből (lép, vese, máj és agy) és véreből a fertőzést követő 2.,5.,7., és 30. napon élőcsíraszámot határoztunk meg. Mivel a *C. albicans*szal beoltott Syk^{-/-} és CARD9^{-/-} csontvelői kimérák a későbbi időpontokat nem érték meg, ezek és Vt kontrolljaik szöveteiben csak a kezelés utáni 2. napon vizsgáltuk a gombakolonizációt. A Syk^{-/-} és CARD9^{-/-} csontvelői kimérák szerveiben legalább egy nagyságrenddel nagyobb (vese, agy) *C. albicans* általi kolonizációt észleltünk, mint Vt kimérák szerveiben. Hisztológiai vizsgálattal megerősítettük a *C. albicans* elburjánzását a Syk^{-/-} és a CARD9^{-/-} kimérák veséiben, ahol nekrotikus és gyulladásra utaló területeket is azonosítottunk. Ezen vesék makroszkopikusan is patológiás megjelenést mutattak. A *C. parapsilosis*szal

fertőzött Syk^{-/-} illetve CARD9^{-/-} kimérékből minden vizsgálati időpontban szignifikánsan nagyobb mértékű gomba általi kolonizációt mutattunk ki, mint a Vt kimérékből, azonban ezen különbség volumene csak a fertőzést követő 30. napon érte el a több (~2-3) nagyságrendet. Ezen időpontban szövettani módszerekkel is kimutatható volt a *C. parapsilosis* sejtek elszaporodása a mutáns állatok veséiben. Összességében megerősítettük a Syk és CARD9 alapvető funkcióját a *C. albicans* elleni rezisztenciában, és megállapítottuk, hogy a *C. parapsilosis* szemén mutatott ellenállóképesség komponensei is.

Összefoglalás

1. A *C. parapsilosis* által kiváltott NF- κ B aktiváció Syk- és CARD9-függő BMDM-ekben.
2. A BMDM-ek és PM-ek *C. parapsilosis* fertőzés során kialakuló citokinválasza (részben) Syk- és CARD9-függő.

3. A BMDM-ek és a PM-ek *C. parapsilosis* és *C. albicans* sejteket fagocitáló képessége Syk-függő, de CARD9-független.
4. A *C. parapsilosis* tartalmú fagoszómák savasodása egy Syk-függő, de CARD9- független folyamat BMDM-ekben és PM-ekben.
5. A BMDM-ek *C. parapsilosis*t elimináló képessége Syk-függő, de CARD9-független folyamat.
6. A szisztémás *C. parapsilosis* fertőzéssel szembeni ellenállóképesség egér modellben függ a hematopoetikus sejtészlet Syk és CARD9 expressziójától.

Publikációk listája

Az eljárás alapját képező közlemények:

Tóth A*, **Zajta E***, Csonka K, Vágvölgyi Cs, Netea MG és Gácsér A (2017): Specific pathways mediating inflammasome activation by *Candida parapsilosis*. – Scientific Reports 7: 43129.

doi: <http://doi.org/10.1038/srep43129>, IF: 4,122

*megosztott elsőszerzők

Csonka K, Vadovics M, Marton A, Vágvölgyi Cs, **Zajta E**, Tóth A, Tóth R, Vizler Cs, Tiszlavicz L, Mora-Montes HM, Gácsér A (2017): Investigation of OCH1 in the virulence of *Candida parapsilosis* using a new neonatal mouse model. – Frontiers in Microbiology 8: 1197.

doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01197>, IF: 4,019

A disszertáció témájához kapcsolódó egyéb közlemény:

Csepregi JZ, Orosz A, **Zajta E**, Kása K, Németh T, Simon E, Fodor Sz, Csonka K, Barátki BL, Kövesdi D, He Y-W, Gácsér A és Mócsai A (2018): Myeloid-specific deletion of Mcl-1 yields severely neutropenic mice that survive and breed in homozygous form. – *The Journal of Immunology* 201 (12): 3793-3803.

doi: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1701803>,

IF: 4,718

Egyéb tudományos közlemények:

Zajta E, Varga T, Kovács GM és Dima B (2019): New insights on *Hygrophorus penarioides* and *H. penarius* (Hygrophoraceae, Agaricales) from Hungary. – *Phytotaxa* 392 (2):127-139.

doi: <http://dx.doi.org/10.11646/phytotaxa.392.2.2>,

IF (2018): 1,168

Knapp DG, Kovács GM, **Zajta E**, Groenewald JZ és Crous PW (2015): Dark septate endophytic pleosporalean genera from semiarid areas. – *Persoonia* 35: 87–100. doi: <http://dx.doi.org/10.3767/003158515X687669>, *IF*: 5,725

Zajta E (2012): A *Hygrophorus* nemzetség hazai előfordulása. – *Mikológiai Közlemények, Clusiana* 51 (2): 223-240.

<https://www.researchgate.net/publication/314086246>,

IF: 0

Összesített *IF*: 19,752

MTMT azonosító: 10044914

Társszerzői nyilatkozat

Alulírott Csonka Katalin, Vadovics Máté, Marton Annamária, Tóth Renáta, Tizslavicz László, Vágvölgyi Csaba és Gácsér Attila** nyilatkozunk arról, hogy Zajta Erik szerepe meghatározó jelentőségű volt a

Tóth A*, **Zajta E***, Csonka K, Vágvölgyi Cs, Netea MG és Gácsér A (2017): Specific pathways mediating inflammasome activation by *Candida parapsilosis*. – Scientific Reports 7: 43129.

doi: <http://doi.org/10.1038/srep43129>, IF: 4,122

*megosztott elsőszerzők

Csonka K, Vadovics M, Marton A, Vágvölgyi Cs, **Zajta E**, Tóth A, Tóth R, Vizler Cs, Tizslavicz L, Mora-Montes HM, Gácsér A (2017): Investigation of OCH1 in the virulence of *Candida parapsilosis* using a new neonatal mouse model. – Frontiers in Microbiology 8: 1197.

doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01197>, IF: 4,019

közleményekben, melyek a fokozatszerzési eljárás során a Szegedi Tudományegyetem Biológia Doktori Iskolája szabályzata szerint kerültek felhasználásra. Az értekezésben közölt eredményeket tudományos fokozat (Ph.D.) megszerzésére nem használtuk fel és ezt a

jövőben sem fogjuk tenni.

**felelős szerző, aki külföldi tartózkodásuk miatt Tóth Adél, Mihai G. Netea és Hector M. Mora Montes helyett is nyilatkozik.

.....
Csonka Katalin

.....
Vadovics Máté

.....
Marton Annamária

.....
Tóth Renáta

.....
Tiszlavicz László

.....
Vágvölgyi Csaba

.....
Gácsér Attila