

DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**OVEREXPRESSZIÓS MUTÁNS TÖRZSEK LÉTREHOZÁSA
ÉS SZÉLESKÖRŰ VIZSGÁLATA AZ OPPORTUNISTA
HUMÁN PATOGÉN *CANDIDA PARAPSILOSIS*
GOMBAFAJBAN**

PÁL SÁRA ESZTER

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



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

SZEGED

2022

Irodalmi áttekintés

A gombás megbetegedések száma világszerte növekvő tendenciát mutat, a fertőzések háttérében leggyakrabban azonosított patogén fajok a *Candida*, *Aspergillus* *Pneumocystis* vagy *Cryptococcus* nemzetség tagjai, melyek megközelítőleg az esetek 90%-ért felelősek. Habár, a *C. albicans* a szisztémás gombás fertőzésekkel leggyakrabban összefüggésbe hozható *Candida* faj, az invazív candidiázisok epidemiológiája az utóbbi évtizedekben jelentős változáson ment keresztül. A candidaemiás megbetegedésekkel összefüggésben megfigyelhető a nem-*albicans* *Candida* fajok (NAC), gyakori előfordulása és térhódítása. A jelenségért feltehetően a megnövekedett antibiotikum és antifungicid használat miatt kialakult multidrog rezisztens fajok, és a megváltozott klinikai gyakorlat tehető felelőssé, úgy, mint a sugárterápiás vagy egyéb immunszuppresszív kezelések gyakori alkalmazása.

A *C. parapsilosis* egy kommenzalista gombafaj a normál humán mikrobióta tagja, azonban egyes esetekben képes fertőzések kialakítására ezért opportunistá patogén fajként tartjuk számon.

A *C. parapsilosis* gombafaj által okozott candidaemiás esetek leggyakrabban a koraszülött osztályokon fordulnak elő, elsősorban alacsony születési súllyal világra jött csecsemőket fertőz, de az immunszuppresszált egyének, illetve az intravénás katéterrel és egyéb orvosi implantátummal, protézissel ellátott betegek is érintettek. A gombafaj számos fertőzést elősegítő tulajdonsággal rendelkezik úgy mint: horizontális terjedőképesség, a magasabb

tolerancia az echinokandin típusú gombaellenes szerekkel szemben, a biofilm képző képessége orvosi eszközök felületén.

Ezen, specifikus virulencia faktorainak köszönhetően a faj képes járványszerű terjedésre és fertőzések kialakítására kórházi környezetben.

A virulencia faktorok azonosítására és génfunkció vizsgálatára alkalmazott hagyományos módszer a reverz genetikai megközelítés, azaz a gének deléciója a genomból. Napjainkban már számos organizmus esetében elérhetőek a deléciós (knock out – KO) mutáns törzsekből álló gyűjtemények és az elemzésük során kapott eredmények, köztük *C. parapsilosis* fajban is. Ezzel ellentétes megközelítés a fehérje túltermelő vagy overexpressziós (OE) módszer, ami számos előnnyel bír a KO technikával szemben.

A KO és az OE könyvtárak analizéséből származó adatok integrálása plusz információkkal szolgálhat. A fenotípusok összehasonlítása komplexebb képet adhat az adott gén funkciójáról.

A faj specifikus genotípus és fenotípus jellegzetességei rávilágítanak arra, hogy a *C. albicans* faj virulenciájával kapcsolatban szerzett eddigi ismereteink a legtöbb esetben nem vonatkoztathatók közvetlenül a *C. parapsilosis* gombafajra, és a két faj patomechanizmus tekintetében is eltérő jellegeket mutat. Szükségszerű tehát a *C. parapsilosis* fertőzésében szerepet játszó faktorainak azonosítása és patomechanizmusának feltárása ahhoz, hogy hatékonyan célzott prevenciót és terápiát tudjunk alkalmazni a jövőben a *C. parapsilosis* fertőzések megakadályozására és kezelésére.

Alkalmazott módszerek

A kísérletekben használt sejtek tenyésztése: *C. parapsilosis* törzsek és *E. coli* sejtek fenntartása, tenyésztése, kompetens sejtek előállítása és transzformálása, J774.2 egér monocita sejt vonal fenntartása.

Molekuláris technikák: DNS és RNS izolálás élesztőből, cDNS szintézis, PCR, RT-qPCR, molekuláris klónozás Gateway rendszerrel, bakteriális plazmid izolálás, Southern blot analízis, gélelektroforézis, áramlási citometria.

Az overexpressziós mutánsok jellemzése során alkalmazott *in vitro* módszerek: Életképesség komplex és minimál táptalajokon és tápoldatban, oxidatív, sejtfallal és sejtmembrán stresszorok elleni válasz vizsgálata, morfológiaváltás képességének vizsgálata (mikroszkópos vizsgálat, áramlási citometria), biofilm képzés (MTT metabolikus aktivitás mérés), antifungális szerekkel szembeni érzékenység tesztelése (mikrodilúciós módszer), sejtfallal festés fluoreszcens festékekkel (fluoreszcens mikroszkópia), scanning elektronmikroszkópia, fagocitózis vizsgálat (áramlási citometria).

Az overexpressziós mutánsok jellemzése során alkalmazott *in vivo* módszerek: virulencia vizsgálatok rovar lárva (*Galleria mellonella*) és kis emlős (*Mus musculus*) modell rendszerekben.

Eredmények

A gének kiválasztása

A gének kiválasztását egy *in vitro* ko-inkubációs kísérlet előzte meg. THP-1 humán monocita sejt vonal és *C. parapsilosis* interakciója során kerültek meghatározásra a megváltozott gén expressziós mintázatot mutató gomba gének. Utóbbiak közül azon 18 gént választottuk ki, amelyek deléciós mutáns párja már elérhető, illetve korábbi tanulmányokban jellemzésre került *C. parapsilosis* gombafajban. További 19 olyan génnel egészítettük ki a kollekciónkat, amelyek ortológjai a szakirodalmi adatok alapján *C. albicans*, illetve *S. cerevisiae* fajokban virulenciával összefüggésbe hozható folyamatokban játszanak szerepet (sejtfal komponens szintézis, biofilm képzés, morfológia váltás).

Az OE mutáns törzsek létrehozása és validálása

A 37 különböző gén termékét túltermelő törzseket a Gateway cloning technikával hoztuk létre, majd ellenőriztük a konstrukció megfelelő beépülését és működését az egyes mutánsokban. Kolónia PCR segítségével vizsgáltuk az integráció helyességét, Southern blot analízis során az esetleges ektopikus integrációt zártuk ki. Valós idejű PCR technika segítségével igazoltuk, hogy valamennyi törzsből szignifikánsan nagyobb mennyiségben keletkezett mRNS átírat a kontroll törzshöz viszonyítva. Az overexpresszió mértéke 2,6 és 676-szoros értékek között változott a túltermeltetett géntől függően.

Az OE mutáns törzsek karakterizálása

A mutánsok életképességét komplett, valamint minimál tápoldatban és táptalajon vizsgáltuk 24 és 48 órás intervallumban. Egyetlen esetben sem találtunk eltérő fitnesszel rendelkező mutáns törzset a kontroll adatokhoz viszonyítva.

A mutánsok fitnessét szilárd YNB minimál, valamint magzati marha szérummal (FBS) kiegészített táptalajon is monitoroztuk. Előbbivel a csökkent tápanyag tartalmú közeghez való alkalmazkodás, míg utóbbival a gazdában is jelenlévő komponensek bontási/hasznosítási képességét vizsgáltuk.

A különböző fizikai és kémiai stressz körülmények modellezése céljából hőmérséklet stresszvizsgálatot végeztünk YPD táptalajon 20, 25, 30, 37 és 40 °C-on, továbbá számos kémiai stresszor vegyülettel (pl. sejtfal stresszorok – kongó vörös, kalkofluor fehér, koffein; sejtmembrán detergens – SDS; ozmotikus stressz – NaCl, glicerín) szemben mutatott érzékenységet vizsgáltunk 30, illetve 37 °C-on.

Sem a különböző hőmérsékleti viszonyok között, sem pedig a minimál vagy szérummal kiegészített tápközeg alkalmazása során sem tapasztaltunk eltérő növekedési képességet a kontroll törzshöz képest.

Kémiai stresszorok jelenlétében a vizsgált 37 mutáns vizsgálata során 3 esetben (CPAR2_200040^{OE}, CPAR2_302400^{OE}, CPAR2_109520^{OE}) jegyeztünk fel eltérő fenotípust. Csökkent életképességet detektáltunk kalkofluor fehér és kongóvörös stresszorok jelenlétében a CPAR2_200040^{OE} és CPAR2_302400^{OE}

mutánsok esetében. SDS érzékenységet a CPAR2_109520^{OE} és CPAR2_302400^{OE} mutánsok tesztelése során, míg csökkent növekedést koffein jelenlétében egyedül az utóbbi esetében tapasztaltunk. Az eredmények alapján feltételezhető, hogy az említett stresszorokra érzékenyebb mutánsok a releváns sejtfa komponensekben valamilyen defektussal rendelkeznek.

Az egyes törzsek adhéziós és biofilm képző képességét MTT módszer segítségével vizsgáltuk. A 37 mutánsból 1, a CPAR2_302400^{OE} szignifikánsan alacsonyabb metabolikus aktivitást mutatott az általunk alkalmazott modell rendszerben, így feltételezzük, hogy a génnek szerepe lehet a faj adhéziójának és biofilm képzésének szabályozásában.

Az általunk alkalmazott *in vitro* gazda-patogén interakció vizsgálat során a fagocitózis folyamatának felismerés és felvétel fázisaiban történő kölcsönhatást monitoroztuk az egyes mutáns törzsek és a J774.2 eger monocita sejtvonallal között. A kísérlet során összesen 5 mutáns törzs esetében tapasztaltunk szignifikáns eltérést a kontrollhoz viszonyítva. Három törzs esetében (CPAR2_108840^{OE}, CPAR2_109520^{OE}, CPAR2_200040^{OE}) növekedett, míg kettő esetében (CPAR2_406400^{OE}, CPAR2_500180^{OE}) csökkent fagocitózis százalékot tapasztaltunk. A nagyobb fagocitózis % esetén, a makrofágok nagyobb hatékonysággal tudták bekebelezni az adott mutáns törzset, mint a kontroll típust. Eredményeink tükrében feltételezhetjük, hogy a megfigyelt fagocitózis hatékonyságot érintő változások az egyes mutánsok sejtfa elemeinek megváltozása miatt történhetnek.

Az *in vivo* *G. mellonella* gazda-patogén interakció vizsgálat során a CPAR2_302400^{OE} mutáns esetében nem tapasztaltunk melanizációt (lárva immunválasza), továbbá a lárvák elhullása is alacsony volt. A többi vizsgált OE törzs esetében rapid melanizációt figyeltünk meg, és három mutánssal (CPAR2_107240^{OE}, CPAR2_109520^{OE}, CPAR2_602820^{OE}) fertőzött lárva populációnál gyorsabb és a 10. nap végére szignifikánsan nagyobb mértékű elhullást tapasztaltunk, mint a referencia törzsnél. Az *in vivo* eredmények tükrében feltételezzük, hogy a CPAR2_302400 gén túltermelése olyan folyamatokat indukálhat a gombában, aminek következtében a lárva számára veszélytelenné válhatnak.

A további *in vivo* virulencia vizsgálatokhoz egér modellben, a *G. mellonella* kísérlet eredményei alapján választottuk ki a CPAR2_109520^{OE} és CPAR2_302400^{OE} törzseket. A CPAR2_109520^{OE} mutáns egyedül az egér agyszövetében halmozódott fel nagyobb mértékben, míg a lépben erre kevésbé volt képes a kontroll törzshöz viszonyítva. A CPAR2_302400^{OE} gomba mind az agy-, mind pedig a veseszövetben, nagyobb számban, míg a lép- és a májszövetben alacsonyabb mennyiségben volt jelen a kontroll típushoz képest.

A bemutatott kísérletek során vizsgált virulenciában szerepet játszó tulajdonságok mindegyikére hatással lehet, a gomba egyes sejtfal alkotóelemeinek minőségi és mennyiségi megváltozása. Vizsgáltuk a vad típusú törzshöz képest eltérő fenotípust mutató mutánsok bizonyos sejtfal komponenseit. Nem találtunk eltérést a kontroll törzshöz viszonyítva.

A vizsgált 37 különböző gént overexpresszáló mutáns közül 8 esetben találtunk fenotípusbeli eltérést a vad típushoz képest, ebből következően 29 mutáns esetében nem volt tapasztalható változás. Morfológiaváltás, sejtfal komponens analízis és aantifungális szer érzékenység vizsgálatok során nem detektáltunk változást.

Összességében a 8 fenotípusbeli eltérést mutató mutáns közül 6 esetben érhető el az adott génre nézve deléciós mutáns. 3 esetben tudtunk releváns összehasonlítást végezni, mivel ugyanazon vagy hasonló tulajdonságban volt fenotípus eltérés a KO könyvtár analízis során. A CPAR2_109520^{OE} mutáns és géndeléciós párja egyaránt csökkent stressztűrőképességet mutatott membrán stresszor jelenlétében. A CPAR2_200040^{OE} törzs esetében csökkent életképességet figyeltünk meg sejtfal stresszorok jelenlétében, míg deléciós párja korábbi vizsgálatok során ellentétes fenotípust mutatott. A CPAR2_302400^{OE} mutáns kevésbé volt képes megtapadni és biofilmet képezni az általunk alkalmazott biofilm képző modell rendszerben, hasonlóan génkiütött párjához.

Összefoglalás

- Munkánk során létrehoztunk egy 37 különböző gén termékét túltermelő mutáns könyvtárat. Az egyes mutánsokat jellemeztük fókuszálva virulenciában szerepet játszó tulajdonságaikra.
- A következő öt gén – CPAR2_107240^{OE}; CPAR2_108840^{OE}; CPAR2_302400^{OE}; CPAR2_406400^{OE}; CPAR2_602820^{OE} – esetében sikerült első alkalommal bizonyítani azok jelentőségét a *C. parapsilosis* faj virulenciájában, feltehetően biofilm képzés és gazda-patogén interakció szabályzásában lehet szerepük.
- További három gén – CPAR2_109520^{OE}; CPAR2_200040^{OE}; CPAR2_500180^{OE} – esetében pedig megerősítettük azok jelentőségét stressztolerancia és gazda-patogén interakció szabályzásában.
- Munkánk során először kerültek azonosításra a gén overexpressziós konstrukciót alkalmazva, a *C. parapsilosis* virulenciájában szerepet játszó gének funkciói. Eredményeink rávilágítottak, hogy a gén overexpressziós megközelítés egy hatékony módszer lehet az egyes gének funkciójának vizsgálatára.

Summary

- In our work, we created a mutant library that overexpresses the products of 37 different genes. Each mutant was characterized by focusing on its properties involved in virulence.
- In the case of the following five genes – CPAR2_107240^{OE}; CPAR2_108840^{OE}; CPAR2_302400^{OE}; CPAR2_406400^{OE}; CPAR2_602820^{OE} – have been shown for the first time to be important in the virulence of *C. parapsilosis*, presumably their role in the regulation of biofilm formation and host-pathogen interaction.
- In the case of the following three genes – CPAR2_109520^{OE}; CPAR2_200040^{OE}; CPAR2_500180^{OE} – we confirmed their importance in the regulation of stress tolerance and host-pathogen interaction.
- For the first time in our work, the functions of genes involved in the virulence of *C. parapsilosis* were identified applying the gene overexpression method. Our results highlighted that a gene overexpression approach may be an effective method to study the function of individual genes.

Publikáció referált folyóiratokban

Pál, S.E., Tóth, R., Nosanchuk, J.D., Vágvölgyi, C., Németh, T., Gácsér, A. (2021): A *Candida parapsilosis* overexpression collection reveals genes required for pathogenesis. *J. Fungi*, 7, 97. <https://doi.org/10.3390/jof7020097>. **IF: 5.266**

Geröcs, A., Nemes-Barnás, K., **Pál, S.**, Szőke, B., Májér, J., Farkas, T., & Olasz, F. (2020): Isolation and characterization of yeast strains from Badacsony, Hungary. *Indian J. of Exp. Biol.*: 58, 7. **IF: 0.818**

Enyedi, N.T., Anda, D., Borsodi, A.K., Szabó, A., **Pál, S.E.**, Óvári, M., Márialigeti, K., Kovács-Bodor, P., Mádl-Szőnyi, J., Makk, J. (2019): Radioactive environment adapted bacterial communities constituting the biofilms of hydrothermal spring caves (Budapest, Hungary), *Journal of Environmental Radioactivity*, 203. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2019.02.010>. **IF: 2.21**

Makk, J., Tóth, E.M., Anda, D., **Pál, S.**, Schumann, P., Kovács, A.L., Mádl-Szőnyi, J., Márialigeti, K., Borsodi, A.K. (2016): *Deinococcus budaensis* sp. nov., a mesophilic species isolated from a biofilm sample of a hydrothermal spring cave. *IJSEM*, 66, 12. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001519>. **IF: 2.439**

Összesített impakt faktor: 10.733

MTMT azonosító: 10068589

A kutatást a 20391-3/2018/FEKUSTRAT, az NKFIH K 123952, és a GINOP-2.3.2.-15-2016-00035 azonosító számú projektek támogatták.

Témavezetői nyilatkozat

Alulírott, Prof. Dr. Gácsér Attila, Pál Sára Eszter témavezetőjeként kijelentem, hogy a jelölt tézisei az általa végzett munka eredményeit tükrözi és a disszertációhoz felhasznált közlemény létrehozásához a jelölt jelentős mértékben hozzájárult.

.....

Prof. Dr. Gácsér Attila

Társszerzői nyilatkozat

Alulírott, Tóth Renáta, Vágvölgyi Csaba, Németh Tibor, és Gácser Attila* nyilatkozunk arról, hogy Pál Sára Eszter szerepe meghatározó jelentőségű volt a

Pál, S.E., Tóth, R., Nosanchuk, J.D., Vágvölgyi, C., Németh, T., Gácser, A. (2021): A *Candida parapsilosis* Overexpression Collection Reveals Genes Required for Pathogenesis. *J. Fungi*, 7, 97. <https://doi.org/10.3390/jof7020097>.

közleményben, 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 Joshua D. Nosanchuk helyett is nyilatkozik.

.....
Tóth Renáta

.....
Vágvölgyi Csaba

.....
Németh Tibor

.....
Gácser Attila