

***CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS* ELLEN HATÁSOS
KILLER TOXINT TERMELŐ ILLETVE NEM TERMELŐ
FILOBASIDIUM CAPSULIGENUM TÖRZSEK
ÖSSZEHASONLÍTÁSA, TOXINJUK JELLEMZÉSE**

PH.D. ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

KÉSZÍTETTE: KESZTHELYI ANDREA

TÉMAVEZETŐ: DR. KUCSERA JUDIT



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

2008

Bevezetés

A természetben a különböző életterekért, tápanyagokért folytatott kompetíció során a különböző organizmusok eltérő mechanizmusokat fejlesztettek ki sikeres terjeszkedésükhöz és fennmaradásukhoz. Ezek közé tartoznak az antagonista kölcsönhatások, melyek során az adott organizmus gátolja versenytársai növekedését. Ilyen folyamatok az élővilág minden szintjén megtalálhatók a prokariótáktól a magasabb rendű élőlényekig. Ez a növekedésgátlás lehet általános hatású, vagy specifikus, azaz csak bizonyos törzsekre ható. A specifikus gátlást okozó metabolitok közé tartoznak a gombák által kiválasztott, általában csak a termelő törzssel rokon mikroorganizmusokra ható killer toxinok vagy mikocinek. A killer toxinokat mintegy negyven évvel ezelőtt írták le *Saccharomyces cerevisiae*-nél, és azóta egyre több törzsről derül ki, hogy killer-fenotípussal rendelkezik. A killer toxinokról szerzett információk pedig egyre szélesebb körben segítik a kutatókat a különböző biológiai folyamatok megértésében. Mindemellett ezen antifungális szerek használatában számos ipari és mezőgazdasági felhasználási lehetőség rejlik, melyek közül néhány már a kísérleti szakaszt túllépve tényleges hasznot hajt. Klinikai felhasználásra olyan killer toxinokat, ill. ezek alapján kifejlesztett antifungális szereket tesztelnek, melyek patogén élesztőket (*Candida*, *Trichosporon* fajok, *Cryptococcus neoformans*-t) képesek növekedésükben gátolni.

Munkánk során mi is ilyen, elsősorban *C. neoformans* ellen hatásos toxint termelő törzseket kerestünk. A *Filobasidium capsuligenum* IFM 40078 törzse igen hatékony antikriptokokkális toxint termel. Mivel ismert, hogy a killer-fenotípus törzsre, nem pedig fajra jellemző tulajdonság, további *F. capsuligenum* izolátumokat vizsgáltunk toxintermelésükre nézve. Megvizsgáltuk, hogy a killer-fenotípusú és a nem termelő törzsek más tulajdonságaikban mennyire térnek el, ill. megpróbáltuk tisztázni filogenetikai kapcsolataikat, különböző faj ill. faj alatti kategóriák elkülönítésére alkalmas molekuláris módszerekkel. Ezek között szerepelt különböző variábilis rDNS-régiók összehasonlítása, PCR-fingerprinting, RAPD-analízis ill. mtDNS-RFLP.

Amellett, hogy egy faj nem minden törzse termel toxint, ismert az is, hogy a termelő törzsek nem mindig ugyanazt a toxint termelik ill. esetenként egy törzs többféle toxint is szekretálhat. Ezért munkánk során célunk volt a killer-fenotípussal rendelkező

törzsek toxinjainak összehasonlítása is. Ehhez hatásspektrumuk összevetése mellett célul tűztük ki genetikai hátterük, ill. különböző biokémiai tulajdonságaik összehasonlítását is. Emellett kísérletet tettünk a *F. capsuligenum* IFM 40078 törzs FC-1 toxinjának azonosítására és részleges tisztítására. Az ismert toxinok igen eltérő hatásmechanizmussal rendelkeznek, károsíthatják a membránt, megállíthatják a sejtciklus folyamatát, gátolhatják a sejtfal szintézisét, stb. Általában azonban mind rendelkeznek sejtfali- ill. membránreceptorral, melyek szükségesek a specifitás biztosításához. Patogén élesztők ellen hatékony toxinok esetében ezek pontosabb megismerése fontos információkat nyújthat különböző antifungális szerek kifejlesztéséhez. Mindezért munkánk során célunk volt az FC-1 toxin hatásmechanizmusának megismerése és sejtfali receptorának felderítése is.

Célkitűzéseink tehát a következők voltak:

- Antikriptokokkális toxint termelő törzsek felderítése
- *F. capsuligenum* törzsek killer fenotípus-eloszlásának vizsgálata, killer-szenzitív kapcsolatok tisztázása.
- *F. capsuligenum* termelő és nem termelő törzseinek összehasonlítása, filogenetikai kapcsolataik elemzése
- Termelő törzsek által szekretált toxinok összehasonlítása, hatásspektrumuk és biokémiai jellemzőinek leírása
- Az IFM 40078 törzs FC-1 toxinjának pontosabb megismerése, azonosítása tisztítása
- Az FC-1 toxin hatásmechanizmusának feltárása, sejtfali receptorának azonosítása.

Felhasznált módszerek

- Klasszikus mikrobiológiai módszerek:
 - törzsek fenntartása
 - toxin termeltetésére
 - *Cryptococcus* izolátumok azonosítására
 - Párosodási típusok meghatározása
 - UV mutagenézis
- Molekuláris módszerek
 - ITS/D1D2 szekvencia meghatározás
 - RAPD-analízis
 - PCR-fingerprinting
 - mtDNA RFLP
- Filogenetikai vizsgálatok
 - Szekvenciák illesztése CLUSTALW program
 - Fenogramok készítése
 - Phylogenetic Computer Tools Version 1.32
 - PHYLIP (Phylogeny Inference Package) 3.65
- Fehérje alapú vizsgálatok
 - SDS-gél elektroforézis
 - Affinitás kromatográfia
- Toxin hatásmechanizmusának felderítésére irányuló módszerek
 - Kompetíciós analízis
 - FITC (Fluoreszcein izotiocianát) festés
 - Lézer szkennung citometria

Eredmények

1. Termelő törzsek felderítése, killer-szenzitív kapcsolatok tisztázása

Munkánk során antikriptokokkális toxint termelő törzseket keresve számos élesztőtörzset teszteltünk, és csak egy *Filobasidium capsuligenum* IFM 40078 törzs esetében kaptunk pozitív eredményt. Ez után arra szeretnénk volna választ kapni, hogy a *F. capsuligenum* fajon belül milyen gyakori a killer-fenotípus előfordulása. Ezért különböző törzsgyűjteményekből további kilenc, eltérő földrajzi helyekről és környezeti mintákból származó *F. capsuligenum* törzset szereztünk be. Ezek vizsgálatakor kiderült, hogy a faj képviselőinek viszonylag nagy hányada (40%) rendelkezik a toxintermelés képességével, valamint a toxint nem termelő törzsek mindegyike érzékeny a termelők által termelt mikocinokra. A neutrális, tehát nem termelő és nem érzékeny törzsek hiánya azt jelzi, hogy nem alakultak ki olyan vonalak, melyek elvesztették toxin-termelő képességüket, de immunitásuk megmaradt, mely utalhat a toxin kromoszómális kódoltságára, mivel extrakromoszómális elemek könnyebben elvesznek, mint a magi genom részei.

2. Killer és non-killer fenotípusú *F. capsuligenum* törzsek jellemzése, filogenetikai kapcsolataik elemzése

A termelő és nem termelő *F. capsuligenum* törzsek közti kapcsolatok tisztázása érdekében először meghatároztuk párosodási típusukat. A nem termelő törzsek NCAIM Y-0472 kivételével mind **a**, míg a termelő törzsek kivétel nélkül **α** párosodási típussal rendelkeznek, mely utalhat arra, hogy a toxin termelése az **α** mating típushoz kötött.

Teljes nukleinsavkivonatok elválasztása során a magi DNS-en és a riboszómális RNS-eken kívül nem jelent meg egyéb sáv, mely megerősítette korábbi feltevésünket, miszerint a toxin termelése valószínűleg kromoszómálisan kódolt. Így a termelők és nem-termelők közti különbség is a magi genomban keresendő, és nem RNS vírusok ill. DNS plazmidok jelenléte okozza a fenotipikus eltérést. Mindezért a továbbiakban azt vizsgáltuk, hogy e két csoport genomja más régiókban is különbözik-e. Ennek eldöntésére az rDNS variábilis régióinak (ITS ill. D1/D2) szekvenciáit elemeztük, valamint RAPD-analízist végeztünk. ITS-szekvenciájuk alapján a termelő ill. nem termelő törzsek e két csoporton belül csak minimálisan, (0,4%-ban) tértek el egymástól, a D1/D2-régiót tekintve pedig teljesen megegyeztek. Azonban a különböző csoporthoz

tartozó törzsek közt igen nagy eltérés (1,6-2,24%) mutatkozott az rDNS-régiókban. A PCR-fingerprinting és RAPD-mintázatok alapján készített fenogram szintén alátámasztotta a termelő és nem termelő csoport különválását. A törzsek mtDNS-RFLP analízisével is hasonló eredményeket kaptunk, mely arra utal, hogy a két csoport nem csak magi genomjában, hanem extrakromoszómális szinten is eltérnek.

A termelő ill. nem termelő törzsek nagy mértékű elkülönülése felveti a *F. capsuligenum* faj két varietasra osztásának lehetőségét.

3. Termelő törzsek toxinjainak jellemzése, összehasonlítása

Munkánk következő szakaszában a különböző törzsek által termelt toxinokat hasonlítottuk össze. Mind hatásspektrumukban, mind biokémiai tulajdonságaikban megegyeztek. Mind a négy törzs hatásos volt számos *C. neoformans* törzsrre, függetlenül azok szero- és molekuláris típusától, valamint izolálásuk helyétől. Ez alól csupán egy törzs, a WM 161 jelentett kivételt, melyre egyik toxin sem volt hatással. Ennek oka lehet sejtfali ill. membránreceptorok eltérése, melyek megváltozása több toxin esetében bizonyult már felelősnek rezisztencia kialakulásáért. A négy toxin további élesztők vizsgálata során is azonos specificitással rendelkezett.

Mivel hatásspektrumuk alapján nem tudtuk őket elkülöníteni, különböző biokémiai tulajdonságaikat is összehasonlítottuk. A toxinok további tanulmányozásához azonban először biztosítani kellett a toxinok termeléséhez szükséges optimális feltételeket, mivel irodalmi adatok szerint a különböző toxinok igen kis mennyiségben temelődnék. Különböző tápoldatokban növesztve a toxinokat, azt tapasztaltuk, hogy csak komplett tápoldat volt alkalmas aktív toxin termeltetésére. Pepton vagy maláta kivonat hiányában sem élesztő kivonat, sem a 21 esszenciális aminosav hozzáadása nem volt elegendő biológiailag aktív fermentlé előállításához. Előlt, érzékeny *C. neoformans* sejtek jelenléte sem volt képes indukálni a toxin termelődését. Így nyitott kérdés maradt, hogy a komplett tápoldatok mely komponense szükséges aktív toxin termeléséhez. Eredményeink azt mutatják, hogy a toxintermelődéshez a növekvő sejteknek korai stacioner fázisba kell érniük. Tekintve, hogy a toxin a fiatal, logaritmikus fázisban lévő érzékeny sejteket pusztítja legerőteljesebben, a természetben a toxintermelés szerepe valószínűleg a már elfoglalt élőhelyek védelme az újonnan érkező, invazív törzsek ellen.

Feltehetően a tápoldat pH-jának eltolódása semleges ill. lúgos irányba, vagy az öregedő sejtek erősödő proteáztermelése miatt, a késői stacioner fázisban már nem tudtunk killer aktivitást kimutatni.

A toxinok hőmérséklet ill. pH-optimumukat tekintve szintén megegyeztek: 30 °C felett inaktiválódtak, és hatásukat csak szűk, savas pH-n fejtették ki. Ennél magasabb pH a toxinokat inaktiválja. Mivel a pH visszaállítással sem nyerik vissza hatásosságukat, ez a folyamat valószínűleg irreverzibilis. Mindez arra is utal, hogy az alacsony pH nem közvetlenül az érzékeny sejtekkel való kölcsönhatást segíti, hanem a toxin stabilitásához szükséges.

A toxinok lehetnek proteinek, glikoproteinek, de antifungális hatást kifejthetnek más vegyületek, például glikolipidek is. A *F. capsuligenum* törzsek által termelt aktív hatóanyag proteintermészetének igazolására különböző proteináz enzimekkel kezeltük fermentleveiket, majd a maradék aktivitást biotesztben mértük. Pronáz E kezelés esetén jelentős aktivitáscsökkenést tapasztaltunk, mely alátámasztotta a toxin fehérjetermészetét. A többi proteinbontó enzim hatástalanságát okozhatja felismerő helyük hiánya a toxin fehérje-szekvenciájában, de valószínűleg szerepe lehet annak is, hogy ezek az enzimek savas pH-n nem működnek maximális hatékonysággal.

Mivel több megközelítést alkalmazva sem találtunk eltérést a négy törzs által termelt toxinok közt, megállapíthatjuk, hogy ezek igen hasonló, valószínűleg azonos felépítésű mikocinek.

4. IFM 40078 törzs által termelt FC-1 toxin jellemzése

F. capsuligenum IFM40078 törzsének FC-1 toxinjának részletesebb tanulmányozása során megvizsgáltuk hatásspektrumát, kísérletet tettünk azonosítására, részleges tisztítására, valamint meghatároztuk lehetséges sejtfali receptorát és hatásmechanizmusát. A toxin hatásspektrumának pontosabb megismeréséhez további *Cryptococcus* fajokat izoláltunk környezetből ill. klinikai mintákból, valamint számos további élesztő- és néhány fonalgombán is teszteltük aktivitását. Eredményeink szerint a fent említett WM 161 törzs kivételével minden egyértelműen *C. neoformans*-nak bizonyult törzs érzékenynek mutatkozott. A *Cryptococcus* nemzetségbe tartozó, két *C. laurentii* törzs közül egy, valamint a *C. podzolicus* érzékenynek, míg a *C. albidus* törzsek rezisztensnek

mutatkoztak. Mivel a *C. neoformans* mellett a *C. albidus* is egyre gyakrabban fertőz, utóbbi rezisztenciája felhasználható lehet kriptokokkózist előidéző törzsek pontos azonosításához. Két *Schizosaccharomyces* mutáns törzs növekedését gátolta az FC-1 toxin, bár ezek érzékenysége valószínűleg az UV-mutagenézis során keletkezett mutációkból adódik. Érdekes a szintén oppurtunista humán patogén *Candida guilliermondii* egy törzsének érzékenysége, mivel sem más *Candida* fajok, sem a többi öt vizsgált *C. guilliermondii* törzs nem bizonyult szenzitívnek. Nem meglepő azonban a szintén *Filobasidiaceae* családba tartozó *Paratorulopsis pseudarina* érzékenysége.

A toxin azonosítása érdekében először különböző pórusátmérőjű membránokon átszűrve meghatároztuk méretét, mely 30-50 kDa-nak adódott. Ez az érték megfelel az irodalomban leírt toxinok átlagos méretének. A toxin kimutatásához elvégeztük különböző tápoldatokban termelt, eltérő mértékű aktivitást mutató fermentlevék SDS-gélelektroforézisét. A kapott mintázatokban azonban nem figyeltünk meg olyan fehérjesávot, mely az aktivitásbeli eltéréseknek megfelelő intenzitásbeli különbséget mutatott volna. Aktivitást nem mutató, minimál tápoldat esetén pedig több (5-6) sáv hiányzott a kontroll YM4 tápoldathoz képest. Így ezek alapján nem sikerült a toxint egyértelműen azonosítani. Ezért, nem termelő mutánsok előállítása után ezek, illetve nem termelő VKM 1513 törzs fermentlevének SDS-fehérjemintázatát hasonlítottuk össze az IFM 40078 aktív fermentlevével. A nem termelő törzsek fermentlevéből egy 40 kDa nagyságú fehérje hiányzott az aktív fermentlé mintázatához képest. Ennek szekvenálásakor azonban kiderült, hogy ez a sáv két vagy több fehérjének felel meg.

Mivel a fenti módszerekkel nem sikerült egyértelműen azonosítani az FC-1 toxint, megkíséreltük kitisztítani. Először a célsejtek sejtfali receptorhoz való kötődését próbáltuk kihasználni, azonban ez közvetlenül az élesztősejtek felhasználásával nem járt eredménnyel. A feltételezett sejtfali receptort (pusztulánt) közvetlenül felhasználva, affinitás-kromatográfiával viszont sikerült aktív frakciókat gyűjteni, majd ezek SDS gélelektroforézisével 3 fehérjesávot elkülöníteni, melyek közül egy beleillett a fentiek során becsült mérettartományba. Ennek a fehérjének *N*-terminális szekvenciája nem mutatott szignifikáns homológiát sem egyéb toxinokkal, sem más ismert fehérjével. Mivel azonban az irodalomban leírt toxinok sem homológok egymással ez nem zárja ki, hogy a killer-aktivitásért ez a fehérje lenne felelős.

A továbbiakban kísérletet tettünk az FC-1 toxin hatásmechanizmusának felderítésére. Az irodalomban leírt különböző toxinok közös tulajdonsága, hogy rendelkeznek valamilyen sejtfali receptorral, mely lehet mannán, laminarin, β -glukán vagy kitin. Az FC-1 toxin a kompetíciós tesztek alapján valószínűleg pusztulánhoz (β -1,6-glukánhoz) köt az érzékeny sejtek sejtfalán. A toxinhatás kinetikájának vizsgálata során megállapítottuk, hogy a toxin citocidikus hatású. A sejtek pusztulását FITC-festéssel követtük, mely az elhalt sejtek sejtmembránján bejutva megfestette azokat. Ez a festődés a toxin membránkárosító hatására utal. A toxin hatásmechanizmusának további vizsgálatakor meghatároztuk az érzékeny sejtek DNS-tartalmát lézer szkennning citometriával. Megállapítottuk, hogy a toxin hatása nem sejtciklus-gátláson keresztül valósul meg. Mivel az izoozmotikus környezet sem védte meg az érzékeny sejteket a pusztulástól, az is feltehető, hogy a toxin nem a sejtfalat, ill. annak szintézisét támadja. Mindezek alapján valószínűsíthető, hogy az FC-1 toxin számos más toxinhoz hasonlóan a sejtmembránt károsítja.

Összefoglalás

Munkánk során antikriptokokkális hatású killer toxint termelő törzseket kerestünk. SZMC (Szegedi Mikrobiológiai tanszék törzsgyűjteménye) élesztőit vizsgálva csupán *F. capsuligenum* IFM 40078 törzse volt képes *C. neoformans* növekedését gátolni. További kilenc *F. capsuligenum* törzs vizsgálata során kiderült, hogy a fajon belül viszonylag nagy százalékban előfordul a killer fenotípus. A nem termelők mindegyike érzékenynek bizonyult a termelők toxinjaira. Killer fenotípusú ill. nem termelő törzsek összehasonlításakor megállapítottuk, hogy ezek mind magi genomjukat, mind mitokondriális genomjukat tekintve igen nagymértékben különböznek, olyannyira, hogy eltérésük felveti a faj két varietasra bontásának lehetőségét.

A termelő törzsek toxinjainak összehasonlításakor megállapítottuk, hogy a toxinok mind hatásspektrumukat, mint biokémiai tulajdonságaikat tekintve megegyeznek egymással. Valószínűleg kromoszómálisan kódoltak, szűk, savas pH tartományban aktívak, hőérzékenyek, és feltehetően fehérjetermészetűek.

IFM 40078 törzsének FC-1 toxinjának azonosítása során méretét 30-50 kDa nagyságúnak becsültük. Különböző tápoldatokban termelődött eltérő aktivitású fermentlevek extracelluláris fehérjemintázatát összehasonlítva nem találtunk az aktivitásnak megfelelő intenzitásbeli különbséget mutató sávot. Killer fenotípust nem mutató mutánsok előállítását után ezek extracelluláris fehérjemintázatát szintén összevetettük a biológiai aktivitással rendelkező IFM 40078 törzs fermentlevével. Itt egy kb. 40-45 kDa nagyságú fehérjét azonosítottunk, mely a mutánsok fermentlevéből hiányzott. Mivel a toxint érzékeny sejtekhez való kötődését kihasználva közvetlenül a sejtek felhasználásával nem tudtuk azonosítani, tisztításához sejtfali receptorát (pusztulánt) alkalmaztuk ligandként affinitás kromatográfia során. Így három fehérjét sikerült tisztítanunk melyek közül egy megfelelt a fent említett mérettartománynak. E fehérje *N*-terminális szekvenciáit meghatároztuk, azonban az adatbázisokban hasonló fehérjéket nem találtunk.

FC-1 toxin hatásmechanizmusának vizsgálatakor megállapítottuk, hogy sejtfali receptora valószínűleg β -1,6-glükán (pusztulán). A toxin citocidikus hatású. Nem idézi

elő a sejtek sejtciklusának megállását, és feltehetően nem a sejtfal dezogradációján, ill. szintézisének gátlásán keresztül fejti ki hatását. A toxin valószínűleg az érzékeny sejtek membránját károsítja.

Munkánk során számos érdekes kérdés merült fel, melyek megválaszolására további kísérletek lennének szükségesek. A toxintermelés párosodási-típushoz való kötöttségének kivizsgálása érdekes, új eredményeket adhatna a killer toxinok kutatásához, ill. e törzsek antagonista viselkedésének pontosabb megértéséhez. Az FC-1 toxin specifikus hatását kihasználva további toxinokkal, esetleg egyéb, molekuláris módszerekkel kombinálva alkalmas lehet különböző törzsek, fajok elkülönítésére, epidemiológiai kérdések megválaszolására. A toxin nagyobb mértékű tisztítása, majd antiidiotipikus antitestek előállítása pedig elvezethet új, a patogén *C. neoformans* ellen hatásos antifungális terápia kifejlesztéséhez.

Doktori munka során megjelent publikációk

Cikkek:

Keszthelyi A, Hamari Z, Pfeiffer I, Vagvolgyi Cs, and Kucsera J

Comparison of killer toxin producing and non-producing strains of *Filobasidium capsuligenum*, proposal for two varieties, Microbiological Research, In Press

Keszthelyi A, Ohkusu M, Takeo K, Pfeiffer I, Litter J, and Kucsera J.

Characterisation of the anticryptococcal effect of the FC-1 toxin produced by *Filobasidium capsuligenum*, Mycoses. (2006) 49(3):176-83.

Összefoglalók:

Keszthelyi A

Characterisation of anticryptococcal FC-1 toxin of *Filobasidium capsuligenum*, Acta Biologica Szegediensis Volume 50(3-4):155, 2006

Poszterek:

35th Annual Conference on Yeasts, 2007, Smolenice, Slovakia,

Poster: **Andrea Keszthelyi**, Zoltan Farkas, Zsuzsanna Hamari, Ilona Pfeiffer, Csaba Vágvolgyi, Judit Kucsera

Comparison of killer toxin producing and toxin non-producing *Filobasidium capsuligenum* strains

34th Annual Conference on Yeasts, May 10-12, 2006, Smolenice, Slovakia

Poster: **Andrea Keszthelyi**, Zoltán Farkas, Zsuzsanna Hamari, Judit Kucsera, Ilona Pfeiffer

Killer toxins against pathogenic yeasts

3rd Hungarian Mycological Conference: May 26 - 27, 2005, Mátraháza, Hungary

Poster: **Andrea Keszthelyi**, Ilona Pfeiffer, Judit Kucsera

Sensitivity of *Cryptococcus neoformans* strains of clinical and environmental origin to killer toxins produced by *Filobasidium capsuligenum* (IFM 40078) and *Cystofilobasidium bisporidii* (VKM Y-2700)

Annual meeting of the Hungarian Society for Microbiology, October 07-09, 2004, Keszthely, Hungary

Poster: **Andrea Keszthelyi**, Mária Kovács, István Palatinus, Zsuzsanna Buzás, Judit Kucsera

Isolation and purification of a killer toxin produced by *Filobasidium capsuligenum* IFM 40078 strain

11th International Congress on Yeast, August 15-20, 2004, Rio de Janeiro, Brasil

Poster: Kucsera J., **Keszthelyi, A.**, Kovács, M., Palatinus, I., and Pfeiffer, I.: Molecular characterisation of the anti-cryptococcal toxin producing *Filobasidium capsuligenum*