

DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**A *CANDIDA PARAPSILOSIS* CINK HOMEOSZTÁZISÁBAN
SZEREPET JÁTSZÓ GÉNEK VIZSGÁLATA ÉS FUNKCIONÁLIS
JELLEMZÉSE GAZDA-PATOGÉN INTERAKCIÓ SORÁN**

TAKÁCS TAMÁS

TÉMAVEZETŐK:

PROF. DR. GÁCSER ATTILA

DR. NÉMETH TIBOR

BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA



SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS INFORMATIKAI KAR

MIKROBIOLÓGIAI TANSZÉK

SZEGED

2024

Bevezetés

Az invazív *Candida* fertőzések napjainkban jelentős egészségügyi problémát jelentenek, különösen a legyengült immunrendszerű egyének számára, ahol a kezeletlen, súlyos tünetekkel járó esetek végzetes kimenetelűek lehetnek. Míg a *C. albicans* okozza a szisztémás fertőzések többségét, az elmúlt évtizedekben rohamos növekedés figyelhető meg a nem-*albicans Candida* fajok elterjedésének esetében. E fajok közül kiemelkedik a *C. parapsilosis*, amely számos nozokomiális fertőzés kialakulásáért felelős, leggyakrabban a koraszülötteket és az alacsony születési súlyú újszülötteket érintő fertőzésekkel hozható összefüggésbe, amelyekhez magas halálozási arány párosul. Széleskörű kutatás folyik az opportunista gomba patogén fertőzésekhez vezető fő folyamatok feltérképezésére, amelyek leggyakrabban a *C. albicans* patogenitásának meghatározó tényezőire összpontosítanak. Ezzel szemben egyes rizikócsoportok és földrajzi területek esetében kiemelkedően gyakran és súlyos tüneteket okozó *C. parapsilosis*-ról, virulencia faktorairól és annak az immunrendszerrel való

kölcsönhatásáról kevés információ található a szakirodalomban.

A nehéz- és könnyűfém-ionok döntő szerepet játszanak a sejtnövekedésben, számos metalloprotein kofaktoraként szolgálnak, amelyek nélkülözhetetlenek a komplex metabolikus folyamatokban és a homeosztázis fenntartásában. Emiatt ezen elemek megfelelő egyensúlyának fenntartása esszenciális a sejtek megfelelő működéséhez és számos élettani folyamat zavartalan működéséhez. Az ilyen fémionok közül kiemelt jelentőségű a cink, amely számos enzim fő alkotóeleme, létfontosságú szerepet játszik a veleszületett és adaptív immunrendszerben, jelenléte pedig különböző enzimek és fehérjék működéséhez szükséges. A sejtek cink transzportereket alkalmaznak, hogy a cink ionokat felvegyék környezetükből, vagy éppen eltávolítsák a sejtekből a felesleget, így biztosítva az optimális működését. A magasabb rendű organizmusok úgy védekeznek a kórokozók ellen, hogy a nyomelemek, például a cink ionok fehérjékhez kötött formában jelennek meg, amelyek így a legtöbb mikroba számára hozzáférhetetlenek. Emiatt a sikeres

kórokozóknak rendelkezniük kell egy cink transzportrendszerrel, hogy hozzáférjenek, szállítsák és felhasználják az ily módon kötött cink ionokat. Ezzel szemben a kórokozóknak a cink mérgező is lehet abban az esetben, ha a felesleges, vagy nagy mennyiségű cink ionokat nem képesek intracelluláris raktáraikba szállítani. *Mycobacterium tuberculosis*-t vagy *Candida glabrata*-t fagocitáló és elimináló makrofágokban a fagolizozómában a gomba számára toxikus szintre emelkedik a cink ionok koncentrációja, amely a kórokozó pusztulásához vezet. A gazdaszervezetben tehát mind a korlátozott mennyiségű cink, mind a patogének számára toxikus koncentráció jelenléte cink védelmi funkciót tölt be, amelyet „nutritional immunity”-nek nevez a szakirodalom.

Kutatócsoportunk célul tűzte ki a *C. parapsilosis* cink ion transzportereinek *in silico* elemzését, a feltételezett cink ion transzporterek génelécíós mutánsainak létrehozását, valamint a mutánsok fenotípusos és a transzporterek funkcionális jellemzését. Részletesen vizsgáltuk a *CpZRT21* és *CpZRC1* cink transzporterek jelentőségét *in vitro* egér és humán makrofágokkal

történő interakciójuk során, valamint *in vivo* viaszmosy lárvák és egerek fertőzése során.

Alkalmazott módszerek

Kísérletekben felhasznált sejtek tenyésztése

Élesztő sejtek fenntartása és tenyésztése, *E. coli* sejtek fenntartása és tenyésztése, J774.2 egér és M1 típusú humán makrofágok tenyésztése

Létrehozott törzsek jellemzése során alkalmazott módszerek

Növekedési tesztek különböző stresszorok jelenlétében, növekedési tesztek különböző pH értékű és cink ion tartalmú folyadék tápoldatban, cinkoszóma festés, cink transzporter GFP jelölés

Molekuláris technikák

DNS és RNS izolálás élesztő sejtekből, cDNS szinézis, PCR, gélelektroforézis, RT-qPCR

Fluoreszcens mikroszkópia során használt technikák

AlexaFluor647 festés, CONA-TRITC sejtfol festés, DAPI sejtmag festés, Kalkofluor fehér sejtfol festés, Fluozin3 cink ion festés, Zinquin cinkoszóma festés

In vitro J774.2 és M1 típusú humán makrofág-gomba vizsgálatok

Fagocitózis meghatározása, ölési hatékonyság meghatározása, intracelluláris cink ion mennyiség meghatározása, *C. parapsilosis* cink ion mérgezésén alapuló eliminálásának vizsgálata

In vivo vizsgálatok során használt módszerek

Viaszmoly lárva fertőzés és a lárvák túlélésének vizsgálata, intravénás fertőzés végrehajtása egérmodellben: fertőzést követő élőcsíraszám meghatározás

Eredmények

A *C. parapsilosis* cink homeosztázisában résztvevő transzporterek azonosítása

Munkánk kezdetén kollaborációs partnerünkkel (Duncan Wilson, University of Exeter, Exeter, UK) kollaborációban *in silico* elemeztük, és összehasonlítottuk a *C. albicans* SC5314 és *S. cerevisiae* S288C vad típusú törzsének genomjait a *C. parapsilosis* CLIB 214 vad típusú törzsével, a *C. parapsilosis* cink transzportert kódoló génjeinek azonosítása érdekében. Hat potenciális cink transzporter kódoló gént azonosítottunk, amelyek a cink felvételben (Sc/CaZrt2 ortológ: CPAR2_210740, CPAR2_806710, CPAR2_806720, CaZrt101 ortológ: CPAR2_500170), a cink detoxifikáló folyamataiban (Sc/CaZrc1 ortológ: CPAR2_212100) és a vakuoláris cink ion exportban (ScZrt3 ortológ: CPAR2_212080) potenciálisan szerepet játszhatnak. Az *in silico* analízis során nem találtunk CaPra1 cinkofór fehérjét kódoló génszakaszhoz hasonlókat a *C. parapsilosis* genomjában, amely arra enged következtetni, hogy ez a faj a *C. albicans*-tól eltérő

módon veszi fel a gazda által kötött formában tartott cink ionokat.

Az azonosított gének expresszióját különböző cink ion koncentrációjú, valamint savas vagy neutrális kémhatású környezetben vizsgáltuk. Megállapíthattuk, hogy az azonosított, cinkfelvételben szerepet játszó gének (*CpZRT21*, *CpZRT22* és *CpZRT23*, *CpZRT101*) expressziós profilja a *C. albicans*-ban ismert gének mintázatához hasonlít, ugyanakkor a feltételezetten cink-detoxifikációban és raktározásban szerepet játszó *CpZRC1* egyedi, a vizsgált fajoktól eltérő expressziós mintázatot mutatott. A hat potenciális cink transzporter génjét deletáltuk a genomból, és a mutások életképességét különböző hőmérsékleten tenyésztve változatos stresszkörülmények (pl. különböző sejtfal és membránstresszorok, savas és lúgos kémhatás, valamint könnyű és nehézfémek jelenlétében) között vizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy a *CpZRT21* gén deléciója alacsony cink koncentrációjú környezetben mutatott növekedési defektust, valamint a *CpZRC1* gén pedig magas cink ion tartalmú körülmény között bizonyult esszenciálisnak.

A CpZRT21 gén és cink felvétel analízise és funcionális vizsgálata in vitro makrofág és in vivo modellekben

A savas közegben működő és cink felvételért felelős *Sc/CaZRT2* génhez a *CpZRT21*, *CpZRT22* és *CpZRT23* *C. parapsilosis* gén is nagymértékű hasonlóságot mutatott, utóbbi kettő gén egymás paralógjainak tekinthető. Feltételezhető, hogy ezen gének ilyen mértékű expansziója a Pra1 cinkofór fehérje hiányának kompenzációjával magyarázható. A *CpZRT21* (ahogy *C. albicans* esetében ismert) esszenciálisnak bizonyult savas kémhatású cink ion limitált környezetben, azonban a fenotípusos vizsgálat során a *CpZRT22* és *CpZRT23* gének nem bizonyultak esszenciálisnak. A *CpZRT22* vagy *CpZRT23* gén elvesztése megnövekedett *CpZRT21* expressziót eredményezett, amely arra enged következtetni, hogy e három gén expressziója egymást kölcsönösen befolyásoló, ugyanazon szabályozási folyamat alatt állhat.

In vitro J774.2 egér és humán M1-típusú makrofágokkal végzett fagocitózis és gomba eliminálásra irányuló

kísérleteink eredményei szerint a CpZrt21 alacsony affinitású plazmamembrán cink importer hiánya nagyobb mértékű túlélést biztosít a patogén számára a makrofágokkal történő interakció során. Ez azzal magyarázható, hogy a transzporter hiánya részben megvédheti a gomba sejteket a nagy mennyiségű, a gomba számára toxikus fagolizoszómális cink ion koncentrációval szemben.

In vivo *G. mellonella* rovar és BALB/c vad típusú egér modellben végzett kísérleteink során megállapítottuk, hogy a *C. albicans*-ban ismert CaZrt2 jelentős szerepe ellenére a *CpZRT21* gén nem befolyásolja a *C. parapsilosis* virulenciáját.

A *C. parapsilosis* cink detoxifikáló rendszerének részletes jellemzése, valamint CpZrc1 vakuoláris cink transzporter funkcionális vizsgálata *in vitro* makrofág és *in vivo* modellekben

Munkánk során azonosítottuk a *S. cerevisiae* a *C. albicans* cink-méregtelenítő transzporter *ZRC1* ortológot (CPAR2_212100, *CpZRC1*) *C. parapsilosis*-ban. A

CpZRC1 eltávolítása a gomba életképességének csökkenéséhez vezetett 5 mM vagy azt meghaladó cink ion tartalmú környezetben, ami alátámasztja a *CpZrc1* cink detoxifikáló szerepét. Megállapítottuk, hogy a *C. parapsilosis* képes intracelluláris cink ion raktárak, cinkoszómák létrehozására magas cink ion tartalmú közegben, azonban (*C. albicans*-szal ellentétben) *ZRC1* független módon. A *CpZRC1* funkcionális vizsgálata során a *CpZrc1* transzporter vakuoláris membránhoz történő lokalizációját állapítottuk meg, amely a pékélesztő és a *Cryptococcus neoformans* cink detoxifikáló rendszeréhez hasonlít.

J774.2 egér és humán M1 típusú makrofágokkal végzett *in vitro* kísérleteink eredménye szerint a *CpZRC1* gén hiánya nem befolyásolja a makrofágok fagocitózisának mértékét, azonban a vakuoláris membrán lokalizált cink-importerrel nem rendelkező Δ/Δ *CpZRC1* sejtek csökkent életképességét detektáltuk. Ez arra enged következtetni, hogy a *C. parapsilosis* sejteknek a gomba számára toxikus cink ion mennyiséggel kell megküzdeniük a vizsgált makrofágokon belül.

In vivo viaszmolylárvával végzett kísérleteink során nem tapasztaltunk virulencia változást a *CpZRC1* eltávolítását követően, azonban vad típusú egér modell esetében megállapítottuk, hogy a *CpZRC1* gén megnövelt expressziója jelentősen megnövelte a *C. parapsilosis* sejtek ellenálló képességét a lépben.

Egér és humán makrofágok cink mérgezésen alapuló *C. parapsilosis* elimináló rendszerének jellemzése

A J774.2 és M1 típusú humán makrofágokat érintő fagocitózisra és gomba eliminációra vonatkozó *in vitro* vizsgálataink bebizonyították, hogy a cink felvételért felelős *CpZRT21* gén hiányában a gombasejtek fokozott túlélést mutattak a makrofágokkal való kölcsönhatás során. Ezzel szemben a vakuoláris cink transzporter *CpZrc1* hiánya a kontroll törzshöz képest megnövekedett sejtpusztulást eredményezett mind J774.2, mind M1 típusú makrofágok jelenlétében. Eredményeink arra utalnak, hogy a cinkfelvétel ($\Delta/\Delta CpZRT21$) és a cink mérgeztelenítés ($\Delta/\Delta CpZRC1$) hiányos *C. parapsilosis* mutánsokra irányuló hatások oka megegyezik.

Megállapítottuk, hogy amikor a makrofágok fagocitizálják a *C. parapsilosis* sejteket, az immunsejtek megnövelik a cink ionok mennyiségét, amely a patogén eliminációjához vezet. Ez a megfigyelés igaz mind az egér J774.2, mind a humán M1 típusú makrofágokra. Megfigyeltük, hogy a makrofágokon belüli intracelluláris szabad cink ionok már fél órával a fertőzés után együtt lokalizálódnak a *C. parapsilosis* sejtekkel, és ez a jelenség 4 órás inkubáció után egyre gyakoribbá válik. Ezek az eredmények összhangban vannak a legújabb szakirodalmi adatokkal, amely alátámasztja azt az elképzelést, hogy a makrofágok képesek növelni a fagolizoszomális cink szintjét, ezáltal elősegítve a kórokozók hatékony eliminációját.

Összefoglalás

1. Munkánk során *in silico* azonosítottunk hat potenciális cink transzportert kódoló gént *C. parapsilosis*-ban, majd ezen gének deléciós mutánsait létrehoztuk és jellemeztük.

2. *C. albicans*-hoz hasonlóan a *C. parapsilosis* cink ion felvételét savas környezetben kizárólag CpZrt21 cink transzporter közvetíti. Ebben a fajban azonban két további Zrt2 ortológ is jelen van, amelyek a CpZRT21-gyel megegyező szabályozás alá eshetnek cink ion limitált körülmények között.

3. Megállapítottuk, hogy a *C. parapsilosis* magas cink tartalmú környezeti körülmények között cink raktárakat, ún. cinkoszómákat képez. Azonosítottunk egy vakuolum membránjában lokalizált cink transzportert *C. parapsilosis*-ban, a CpZrc1-et, amely erre a fajra egyedi módon nélkülözhetetlen a cink méregtelenítéséhez.

4. Eredményeink alapján amint a makrofágok fagocitizálják a *C. parapsilosis* sejteket, cink ionok

halmozódnak fel a fagolizoszómában, ami hozzájárulhat a gombasejtek pusztulásához.

Referált folyóiratban megjelent közlemények

1. Németh, M. T., **Takács, T.**, Wilson, D., Gácsér, A., (2018). Identification and functional characterization of zinc transporters in the human fungal pathogen *Candida parapsilosis*. *Medical Mycology*, **IF (2018): 2.9**

2. **Takács, T.**, Németh, M. T., Vágvölgyi, C., Wilson, D., & Gácsér, A. (2021) Investigation of the zinc uptake system of the human fungal pathogen *Candida parapsilosis*. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, **IF (2021): 2.3**

3. **Takács, T.**, Németh, M. T., Vágvölgyi, C., Wilson, D., & Gácsér, A. (2021): Investigation of the parts of zinc homeostasis in the human fungal pathogen *Candida parapsilosis*. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, **IF (2021): 2.3**

4. Mendoza, S., Zamith-Miranda, D., **Takacs, T.**, Gacsér, A. Nosanchuk, J. D., Guimarães, A., (2021).

Complex and Controversial Roles of Eicosanoids in Fungal Pathogenesis. *Journal of fungi*, **IF (2021): 5,7**

5. Takács, T., Németh, M. T., Szilovics, Z., Vágvölgyi, C., Wilson, D., & Gácsér, A. (2022). Investigation of the zinc uptake system of the human fungal pathogen *Candida parapsilosis*. *Acces Microbiology*, **IF (2021): 2,3**

6. Takács, T., Németh, M. T., Bohner, F., Vágvölgyi, C., Jankovics, F., Wilson, D., & Gácsér, A. (2022). Characterization and functional analysis of zinc trafficking in the human fungal pathogen *Candida parapsilosis*. *Open biology*, **IF (2022): 5,8**

7. Bohner, F., Papp, C., **Takacs, T.**, Varga, M., Szekeres, A., Nosanchuk, J. D., Vágvölgyi, C., Tóth, R., & Gacsér, A. (2023). Acquired Triazole Resistance Alters Pathogenicity-Associated Features in *Candida auris* in an Isolate-Dependent Manner. *Journal of fungi*, **IF (2023): 4,7**

Összesített IF: 26.0

MTMT azonosító: 10064917