

DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**GAZDA - PATOGÉN KÖLCSÖNHATÁS
VIZSGÁLATA *CANDIDA* FERTŐZÉSEK SORÁN**

Németh Tibor Mihály

Témavezető:
Dr. Gácsér Attila
Tudományos főmunkatárs



Biológia Doktori Iskola
Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi és Informatikai Kar
Mikrobiológiai Tanszék

Szeged

2013

Irodalmi áttekintés

A *Candida* fajok által kiváltott fertőzések száma az elmúlt harminc év során látványosan megemelkedett. Bár ezek az élesztők a normál humán flóra tagjaiként ismertek, elégtelen immunválasz esetén gyakran halálos kimenetelű szisztémás fertőzéseket (candidémia) képesek kiváltani. A leggyakrabban izolált kórokozó a *Candida albicans*, amely így az elmúlt évtizedekben a *Candida* fertőzések vizsgálatának szinte egyedüli tárgyát képezte. Az ezredfordulót követően az egyéb ún. nem-*albicans* fajok térnyerése egyre kifejezettebbé vált, amelyek antibiotikumokkal szembeni ellenálló képessége, epidemiológiája és a gazda sejtekkel való kölcsönhatása eltért a *C. albicans* tulajdonságaitól. Napjainkban a *C. albicans* után a candidémiából második leggyakrabban izolált faj a *C. parapsilosis*, amely bizonyos földrajzi területeken eléri, sőt szélsőséges esetben meg is haladja a *C. albicans* esetszámát. Mivel a *C. parapsilosis* dominanciája az elmúlt egy évtizedben jelentkezett, ezért a fajról rendelkezésünkre álló ismeretek igen hiányosak. Ezen ismeretek bővítése céljából kidolgoztunk egy *in vitro* fertőzéses modellt, amely révén tanulmányozható a

gazda és a kórokozó kölcsönhatása. Munkánk eredményei a fagocita - *C. parapsilosis* interakció jellemzésével, az abban szerepet játszó emlős és gomba gének azonosításával, illetve különböző *C. parapsilosis* izolátumok teljes genom szekvenciájának meghatározásával és összehasonlításával gazdagítják a szakirodalmi adatokat.

Alkalmazott módszerek

A kísérletekben használt sejtek tenyésztése és fertőzés: primer sejtek izolálása és fenntartása, fagocita sejtvonalak fenntartása, élesztők fenntartása és felszaporítása, fagociták *in vitro* fertőzése, fagociták ölési hatékonyságának vizsgálata

Mikroszkópos technikák: Lyotracker Red/FITC festés, fluoreszcens konfokális mikroszkópia, akridin narancs/kristály ibolya festés és fluoreszcens mikroszkópia, scanning elektronmikroszkópia

Molekuláris technikák: DNS izolálás élesztőből, RNS izolálás fagocitákból és élesztőből, RNS microarray, cDNS szintézis, qRT-PCR, áramlási citometria, PCR, gélelektroforézis, Southern hibridizáció, Sanger-szekvenálás, pulzálatott terű gélelektroforézis

Szekvenálás és *in silico* vizsgálatok (kollaborációban): teljes genom szekvenálás és könyvtár összeillesztés, SNP-k, rekombinációs események és strukturális variánsok detektálása, RNS szekvenálás és könyvtár összeillesztés, gének prediktálása, transzkriptómok összehasonlító elemzése

Elért eredmények

In vitro fertőzéses modell kidolgozása egér makrofágok és a *C. parapsilosis* kölcsönhatásának tanulmányozására

A J774.2 makrofágok és a *C. parapsilosis* GA1 jelű klinikai izolátum kölcsönhatását áramlási citométer és különböző mikroszkópos technikák segítségével (fluoreszcens, konfokális fluoreszcens, SEM) követtük nyomon. Megállapítottuk, hogy a fagocitózis a fertőzés 30. percében megkezdődik, és hozzávetőlegesen a harmadik órájában telítési fázist ér el. A fagoszómalizozóma kolokalizáció és ezzel párhuzamosan az élesztők eliminációja a nyolcadik órában következik be.

A fenti időpontokban izolált gazda RNS mintákkal microarray analízist végeztünk. A két időpontban 115 (3 h) és 511 (8 h) gén expressziója tért el szignifikánsan a nem fertőzött kontrollétól. Elsősorban sérülésre adott -, stressz - illetve immunválaszban szerepet játszó gének transzkripció intenzitása emelkedett meg. Az eredmények alátámasztásához hat gén (*CD83*, *IL1 β* , *IL15*, *TNF α* , *TFRSF9* (transzmembrán fehérje, kostimulációs molekula) és *PTGS-2* (prostaglandin bioszintézisben szerepet játszó citoplazmatikus enzim))

expresszióját vizsgáltuk qRT-PCR-rel. A méréseket az inkubáció 3., 8. és 24. órájában izolált mintákon végeztük el. A relatív expressziókat aktin belső kontrollra normalizáltuk és a nem fertőzött kontrollhoz viszonyítottuk $2^{-\Delta(\Delta Ct)}$ módszerrel. A qRT-PCR eredmények korreláltak a microarray analízis adataival.

TNFRSF9 megemelkedett expressziója egyéb *Candida* törzsekkel (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. metapsilosis*, *C. orthopsilosis*, *C. tropicalis*) történő indukció után is kimutatható volt.

Áramlási citometriás mérések igazolták, hogy *C. parapsilosis* stimulálás hatására nem csak RNS szinten történik indukció, hanem a funkcionális fehérje mennyisége is megemelkedik a makrofágok felszínén.

Az említett gén relatív mennyiségét primer fagocitákban (egér hasüregi - és humán PBMC-kből differenciáltatott makrofágokon) is megvizsgáltuk a GA1 törzs jelenlétében a kölcsönhatás 3., 6., 12. és 24. órájában. Úgy tapasztaltuk, hogy a *TNFRSF9* génről képződő transzkript mennyisége szignifikánsan megemelkedik a nem fertőzött kontrollhoz képest.

THP-1 humán monociták és a *C. parapsilosis sensu lato* csoport tagjainak *in vitro* kölcsönhatásából származó teljes RNS populáció transzkriptóm analízise

Kísérleteinkben a THP-1 humán monocitákat különböző *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* és *C. metapsilosis* törzsekkel inkubáltuk, majd meghatároztuk mind a humán, mind az élesztő RNS populációt. Az RNA-seq eljárás alkalmasnak bizonyult a gazda és az élesztő transzkriptómot is tartalmazó RNS minták szimultán analízisére. A szekvenálás során generált nagy mennyiségű adat kiértékelése folyamatban van. A rendelkezésünkre álló információk a következők.

A THP-1 és *C. parapsilosis* CDC317, *C. orthopsilosis* MCO 456 és *C. metapsilosis* PL 429 (három filogenetikailag nagyon közeli mégis egészségügyi vonatkozásukban lényegesen eltérő faj) kölcsönhatásának vonatkozásában meghatároztuk a három élesztő fajban a monociták jelenlétére megemelkedett expressziót mutató géneket és fajonkénti eloszlásukat. Meghatároztuk az ortológ gének eloszlását a három rokon fajban. Az RNA-seq adatok alapján több, mint 300 eddig nem ismert transzkriptet azonosítottunk

C. parapsilosis-ban. Úgy találtuk, hogy a *C. metapsilosis* (evolúciós léptékben) a közelmúltban teljes genom duplikáción ment keresztül. Technikai problémák miatt (a gomba transzkriptóm elfedte a humán RNS populációt) a fagocitákban bekövetkező változásokról jelenleg nincsen információnk.

A két klinikai (CDC317 és GA1) és két környezeti (CBS 1954 és CBS 6318) izolátum THP-1 sejtekkel való kölcsönhatásának összehasonlítását az élesztő transzkriptómok euklidészi távolságának "heatmap" ábrázolásával végeztük el. Ez alapján a két különböző forrásból származó izolátumok egyértelműen elkülönültek egymástól, amely a vizsgált törzsek eltérő transzkripciós mintázatára utal. A négy törzsből összesen 5.167 transzkriptet azonosítottunk, amelyek közül 729 expressziója tért el szignifikánsan a monociták jelenlétében a kontroll állapothoz viszonyítva. Ezek közül minden időpontban meghatároztuk azt a harminc gént, amely bármely két minta összehasonlításában a legnagyobb mennyiségbeli eltérést mutatja, és ezen gének alapján elvégeztük a különböző RNS minták euklidészi távolságainak meghatározását. A számítások

többsége folyamatban van, eredmények az alábbi összehasonlításokban állnak rendelkezésünkre: 1.) monociták nélküli alap expresszió a két klinikai és két környezeti izolátum esetében, 2.) két környezeti izolátum expressziója a monocita nélküli kontroll és az egy órás fertőzés vonatkozásában és 3.), 4.) a monocita nélküli kontroll és a 3 illetve 12 órás fertőzésből izolált két klinikai izolátum összehasonlításában. A vizsgált minták valamennyi esetben eltérő csoportokba illeszkedtek, amely az expressziós mintázat eltérésére utal.

A rendelkezésünkre álló mintákban összesen 118.641 humán transzkriptet azonosítottunk, amelyek közül mindössze 29 mennyisége mutatott szignifikáns eltérést a nem fertőzött kontrollhoz képest. Ezek közül, az elérhető adatbázis szerint, 21 kódol fehérjét. A 29 transzkript alapján elkészítettük a minták euklidészi távolságainak "heatmap"-jét. A csoportok mintázata szerint a monociták környezeti és klinikai izolátumokra adott válaszában különbség mutatkozik. (Közlés alatt)

Klinikai és környezeti *C. parapsilosis* törzsek összehasonlító genomikai analízise

Korábbi munkánk során különböző *C. parapsilosis* törzsek eltérő virulenciájára és molekuláris tulajdonságaira lettünk figyelmesek. Hogy az izolátumok közötti genomi különbségeket feltérképezzük két környezeti (CBS 1954 és CBS 6318) és egy klinikai izolátum (GA1) teljes genom szekvenciáját határoztuk meg, és hasonlítottuk össze a CDC317, szintén klinikai, referencia genommal. Vizsgálatainkat a CRG (Barcelona, Spanyolország) Komparatív genomikai csoportjával (Toni Gabaldón és Leszek Pryszcz) közösen végeztük.

Az *in silico* analízis során 5.147 SNP-t azonosítottunk a referencia genomhoz viszonyítva, amelyeket a három törzsben tapasztalt eloszlásuk szerint csoportosítottunk. Bár ebben a fajban rekombinációra utaló nyomok ezidáig ismeretlenek voltak, az SNP-k gyakorisága és előfordulása valamint az ALS gének környező régióinak elemzése erre az eseményre utal.

Az összehasonlítás során 5 duplikációt (DUP) és 35 deléciót (DEL) azonosítottunk. A DUP#5 egy a *S. cerevisiae*-ben azonosított *ARR3* (arzenit transzporter)

gén ortológját érinti. A két klinikai izolátumban kópiaszámuk eltérő mivolta (8 és 10) és a géneket övező régiók analízisének eredménye arra enged következtetni, hogy a két izolátumban a géncsalád expanzióját eltérő gének duplikációja okozta. Ennek ismeretében feltételezhető, hogy a környezet → gazda átmenet a faj törzsfjlődése során egynél többször következhetett be. Ez ellentétes a jelenleg uralkodó nézettel, miszerint a klinikai *C. parapsilosis* izolátumok klonális eredetűek.

A 35 deléció mérete 17-től 23.475 bázispárig terjed. Ezek közül 31 fehérje kódoló régiót érint, és 18 valószínűsíthetően génfüzióhoz vezetett. Többségük egy adott törzsre specifikus. Az *in silico* vizsgálat öt deléciót heterozigotikusnak határozott meg. A 35-ből húsz deléciót kísérletes validálásra választottunk ki, amelyek során PCR és Southern hibridizációs stratégiát alkalmaztunk Sanger szekvenálással kiegészítve. Ez utóbbi révén definiált nukleotidsorrend segítségével a deléciók pontos töréspontjait egyértelműen meg tudtuk határozni. A húsból tíz esetben a szekvenálás sikertelen volt, valószínűleg a fragmentumok bonyolult másodlagos struktúrái miatt. A rendelkezésünkre álló információk

ismeretében az adhézióban szerepet játszó *ALS* gének elvesztését okozó deléciókat övező régiók elemzése szintén rekombinációs eseményekre utaló mintázatot azonosított. A kiválasztott 20 régió esetében alkalmazott molekuláris eszközök 19 esetben igazolták és pontosították az *in silico* eredményeket. Ugyanakkor az öt feltételezett heterozigotikus régió közül csak három bizonyult valóban annak. (Pryszcz és mtsi, 2013)

Összefoglalás

- *In vitro* fertőzéses modellrendszer megalkotása emlős fagociták és *Candida* sejtek kölcsönhatásának tanulmányozására

- Az interakció nyomon követése mikroszkópos technikákkal.

- Humán monociták és *Candida* sejtek kölcsönhatásából izolált teljes transzkriptómok analízise RNA-seq módszerrel

- Teljes genom duplikáció kimutatása *C. metapsilosis*-ban

- Több mint 300, eddig ismeretlen gén azonosítása *C. parapsilosis*-ban

- Rekombinációs események nyomaira utaló molekuláris mintázatok azonosítása *C. parapsilosis*-ban.

- Három *C. parapsilosis* izolátum teljes genom szekvenciájának meghatározása és összehasonlítása a referencia törzssével

- Az *in silico* eredmények bizonyítása molekuláris eljárásokkal

Publikáció referált folyóiratokban

Gacser, A., Tizslavicz, Z., Nemeth, T., Seprenyi, G., and Mandi, Y. (2013). Induction of human defensins by intestinal Caco-2 cells after interactions with opportunistic *Candida* species. *Microbes Infect.* **IF: 2,92**

Kredics, L., Varga, J., Kocsube, S., Rajaraman, R., Raghavan, A., Doczi, I., Bhaskar, M., Nemeth, T.M., Antal, Z., Venkatapathy, N., *et al.* (2009). Infectious keratitis caused by *Aspergillus tubingensis*. *Cornea* 28, 951-954. **IF: 2,11**

Manikandan, P., Varga, J., Kocsube, S., Anita, R., Revathi, R., Nemeth, T.M., Narendran, V., Vagvolgyi, C., Panneer Selvam, K., Shobana, C.S., *et al.* (2013). Epidemiology of *Aspergillus* keratitis at a tertiary care eye hospital in South India and antifungal susceptibilities of the causative agents. *Mycoses* 56, 26-33. **IF: 1,28**

Manikandan, P., Varga, J., Kocsube, S., Revathi, R., Anita, R., Doczi, I., Nemeth, T.M., Narendran, V., Vagvolgyi, C., Bhaskar, M., *et al.* (2010). Keratitis caused by the recently described new species *Aspergillus brasiliensis*: two case reports. *J Med Case Rep* 4, 68. **IF: 0,36**

Nagy, I., Filkor, K., Nemeth, T., Hamari, Z., Vagvolgyi, C., and Gacser, A. (2011). *In vitro* interactions of *Candida parapsilosis* wild type and lipase deficient mutants with human monocyte derived dendritic cells. *BMC Microbiol* 11, 122. **IF: 2,96**

Nemeth, T., Toth, A., Szenzenstein, J., Horvath, P., Nosanchuk, J.D., Grozer, Z., Toth, R., Papp, C., Hamari, Z., Vagvolgyi, C., and Gacser, A. (2013). Characterization of virulence properties in the *C. parapsilosis sensu lato* species. *PLoS One* 8, e68704. **IF: 3,73**

Pryszcz, L.P., Nemeth, T., Gacser, A., and Gabaldon, T. (2013). Unexpected genomic variability in clinical and environmental strains of the pathogenic yeast *Candida parapsilosis*. *Genome Biol Evol.* **IF: 4,759**

Összesített impakt faktor: 18,119