

DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**AZ ANTIFUNGÁLIS REZISZTENCIA ÉS A VIRULENCIA
ÖSSZEFÜGGÉSÉNEK VIZSGÁLATA *CANDIDA*
PARAPSILOSIS-BAN**

PAPP CSABA GERGŐ

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

BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA



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

**SZEGED
2018**

Irodalmi áttekintés

A gombák által okozott megbetegedések egyre nagyobb jelentőséggel bírnak, mivel számuk és az általuk érintett földrajzi területek mérete is növekszik. *Candida* nemzetség fajai közül is több patogén, amelyek közül a *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei* és *C. tropicalis* a legjelentősebbek. A felsorolt fajok közül a *C. albicans* bír a legnagyobb jelentőséggel, azonban az utóbbi évtizedekben az egyéb nem-*albicans Candida* fajok okozta megbetegedések száma is fokozatosan nő. Ennek hátterében az antifungális szerek egyre inkább elterjedt használata és a különböző *Candida* fajok eltérő antifungális érzékenysége állhat. A *C. glabrata* mellett a *C. parapsilosis* az a két másik faj, amely leginkább teret nyert a *C. albicans* okozta megbetegedésekkel szemben. A *C. parapsilosis* jelentőségét tovább növeli, hogy a kórházi mikrobiális fertőzések egyik leggyakoribb okozója.

A *Candida* fajok okozta megbetegedések esetén az alkalmazott antifungális szerek csoportjainak száma viszonylag korlátozott. Alapvetően poliéneket

(amfotericin B), triazolokat (flukonazol, vorikonazol, posakonazol) és echinokandinokat (caspofungin, anidulafungin, micafungin) alkalmaznak a fertőzések kezelésére. Az antifungális terápia hatékonyságát csökkenti, ha a beteg egy rezisztens törzs által fertőződik. A rezisztencia mechanizmusa alapvetően az adott antifungális szer csoporttal szemben jellemző, így az adott szer csoportjának tagjai között gyakran okoznak keresztrezisztenciát, azonban bizonyos mechanizmusok a különböző csoportok között is létrehozhatják ezt. A különböző mechanizmusok elsősorban a *C. albicans*-szal és *C. glabrata*-val végzett kutatásokból ismertek.

Munkánk során *C. parapsilosis*-ban vizsgáltuk a különböző triazolokkal és echinokandinokkal szembeni rezisztencia mechanizmusok kialakulását és a mechanizmusok a gomba életképességére, valamint virulenciájára gyakorolt hatását.

Alkalmazott módszerek

Felhasznált gazda és gombasejtek tenyésztése és fertőzés: PBMC izolálása, tenyésztése és differenciáltatása, J774.2 sejtvonala tenyésztése, gazdasejtek fertőzése élesztőkkel, direkt szelekciós eljárás.

In vivo fertőzés: *G. mellonella* (nagy viaszmosoly) lárva fertőzés és egér intavénás fertőzés.

Mikroszkópia és áramlási citometria: Fc-Dectin-1-FITC és WGA-FITC festés, képek analízise.

Molekuláris módszerek: DNS izolálás gombasejtekből, PCR, gélelektroforézis, Southern hibridizáció, DNS restrikciós emésztése és ligálása, célzott génkiütés *C. parapsilosis*-ban Illumina szekvenálás (kollaborációban)

Szekvenálás in silico analízise (kollaborációban): *readek* összeillesztése *contigokká*, SNP analízis.

Analitikai módszerek (kollaborációban): élesztők sejtfalösszetételének vizsgálata HPLC-MS módszerrel, gomba membrán szterol-összetételének vizsgálata LC-MS módszerrel.

Gombák életképességvizsgálata: növekedési tesztek stresszorok jelenlétében és hiányában.

Fehérjeszerkezet modellezés: glükán szintáz enzim topológia modellezése in silico módszerrel.

Elért eredmények

C. parapsilosis cdr1-2 deléciós duplamutáns jellemzése

Létrehoztunk egy *C. parapsilosis cdr1-2* (ABC-transzporter) deléciós mutáns törzset. Megvizsgáltuk a létrehozott deléciós és szülői törzsek érzékenységét amfotericin B-vel, flukonazollal és caspofunginnal szemben. A deléciós törzs kismértékben érzékenyebbnek bizonyult flukonazolra és caspofunginra, ez amfotericin Besetén nem volt tapasztalható. A deléciós törzs megemelkedett virulenciát mutatott *in vitro* és *in vivo* körülmények közt egyaránt. Ez utóbbi fenotípus allélikusan dózisfüggő lehet, mivel a heterozigóta és homozigóta deléciós törzs az allélok elvesztésével párhuzamosan vált egyre inkább virulensé *in vitro* fertőzési modellben, azonban ez a jelenség *in vivo* egér modellben nem volt megfigyelhető.

Echinokandin evolvált törzsek létrehozása jellemzése

Létrehoztunk echinokandinok felhasználásával direkt szelekciós módszerrel három echinokandin

rezisztens *C. parapsilosis* törzset. Az evolvált törzsek közül a csapofungin (CAS^{EVO}) és anidulafungin (AND^{EVO}) segítségével szelektált törzsek keresztrezisztensé váltak az összes echinokandinra, míg a micafunginnal evolvált törzs (MIC^{EVO}) kizárólag micafunginra volt rezisztens.

Az evolvált törzsek érzékenyek bizonyultak sejtfal szintézist gátló vegyületekkel szemben. Ez a fenotípus a MIC^{EVO} törzsre hangsúlyozottan jellemző volt, ugyanis ez volt a legérzékenyebb a sejtfal stresszre, illetve érzékenyek bizonyult oxidatív stresszorokkal szemben is. Érdekes módon a CAS^{EVO} és MIC^{EVO} törzsek rezisztenciát mutattak a membrán károsító nátrium-dodecil-szulfáttal (SDS) szemben. Az echinokandin evolvált törzsek csökkent virulenciájára utal, hogy *in vivo* fertőzések modellben kisebb mértékben okozták a *G. mellonella* (nagy viaszmosoly) lárvák, illetve az egér fertőzési modellben az egerek szerveiben kisebb élőcsíraszámot fordultak elő, mint a vad típusú szülői törzs sejtjei.

A törzsek sejtfalának összetételét és szerkezetét vizsgálva a sejtfal összetétel nem változott meg az

echinokandin szelekció hatására a szülői törzshöz viszonyítva. Ezzel ellentétben a sejtfal szerkezete megváltozott az evolvált törzsekben, ugyanis ezen törzsek sejtjeinek felszínén nagyobb mennyiségben jelentek meg a sejtfal belső rétegeit alkotó β -1,3-glükán és a kitin, mint a szülői törzs sejtjeinek felszínén. Ez a szerkezeti változás lehet az oka az in vivo fertőzések során tapasztalt csökkent virulenciának.

A sejtfal szerkezetben bekövetkező változás azonban nem okozta az evolvált törzsek in vitro virulencia csökkenését, ugyanis az emberi végből izolált PBMC-DM primersejtek egyforma mértékben voltak képesek a különböző törzsek fagocitózisára.

Teljes genom szekvenálát követően azonosítottunk a *C. parapsilosis* β -1,3-glükán szintáz enzimet (Fks1) kódoló génjében aminosavcserét okozó mutációkat, amelyek valószínűleg felelősek a rezisztencia kialakulásáért. A létrejövő aminosav szubsztitúciók jellemzők voltak az adott törzsrre, így a CAS^{EVO} és AND^{EVO} törzsekben egy W1370R aminosav cserét homozigóta formában, illetve az AND^{EVO} törzsben még egy heterozigóta formában megjelenő S656P

szubsztitúciót azonosítottunk. A MIC^{EVO} törzs Fks1 fehérjében, ezektől eltérően az L703F aminosavcsere volt jellemző. In silico módszerekkel létrehoztuk a *C. parapsilosis* Fks1 fehérje topológiáját és az azonosított aminosavcseréket a modellre térképeztük. (Papp, és mtsi., 2018)

Triazol evolvált *C. parapsilosis* törzsek jellemzése

A korábbi módszerhez hasonlóan létrehoztunk három triazol evolvált törzset is a triazol rezisztencia és annak hatásainak vizsgálatára. A triazol evolvált törzsek érzékenységét vizsgálva a flukonazol (FLU^{EVO}) és vorikonazol (VOR^{EVO}) alkalmazásával létrehozott törzsek érzékenysége hasonló mintázatot mutatott: mindkettő rezisztensé vált flukonazolra és vorikonazolra, az itraconazol MIC értéke enyhe emelkedést mutatott, míg érzékenységük posakonazollal szemben nem változott. Ezzel ellentétben a posakonazol evolvált törzs (POS^{EVO}) az összes vizsgálatba bevont azokra rezisztenciát alakított ki és az azolok MIC értéke ennek a törzsnek az esetén volt a legmagasabb. A POS^{EVO} törzs esetén az előbbieken kívül, emelkedett echinokandinok MIC értéke is, sőt rezisztenciát micafunginra mutatott.

A triazol evolvált törzsek érzékenyek voltak ozmotikusan aktív vegyületekkel szemben. Érdekes módon a FLU^{EVO} és VOR^{EVO} törzsek rezisztenciát mutattak koffeinre, amely a sejtfal szintézist a TOR-szignalizáció útvonalán keresztül befolyásolja. Ezzel ellentétben a POS^{EVO} törzs koffein jelenlétében képtelen volt a növekedésre. A többi sejtfalszintézis zavaró vegyület esetén az evolvált törzsek érzékenyek bizonyultak. A membránkárosító SDS-re a FLU^{EVO} törzs rezisztens volt, viszont a VOR^{EVO} és POS^{EVO} törzsek nem növekedtek ennek a vegyületnek a jelenlétében.

Az *in vitro* és *in vivo* fertőzési kísérletek a FLU^{EVO} és VOR^{EVO} törzsek csökkent virulenciájára utalnak, ugyanis a J774.2 makrofágok hatékonyabban fagocitálták ezen törzsek sejtjeit, valamint ezek a gombák kisebb mértékű pusztulást okoztak *G. mellonella* lárvákban, mint a szülői törzs.

A szülői és triazol evolvált törzsek genomját szekvenálva azonosítottunk olyan génekben bekövetkezett pontmutációkat, amelyek potenciálisan felelősek lehetnek a rezisztens fenotípus kialakulásáért. A FLUEVO és VOREVO törzsekben az Mdr1 efflux-

pumpa fehérje expresszióját szabályozó *MRR1* génben azonosítottunk AS cserét okozó mutációt, tehát ezekben a törzsekben feltehetőleg az *Mdr1* konstitutívan nagy mennyisége okozta a rezisztenciát. A POS^{EVO} törzsben két potenciálisan rezisztenciát okozó génben azonosítottunk AS cserét okozó mutációkat. Az egyik ezek közül a Δ^5 szterol-deszaturáz (Erg3) kódolja, amely normál esetben az ergoszterol bioszintézis egyik kulcs enzime, illetve azolok jelenlétében a szintetikus útvonal módosulásával ez alakítja ki a toxikus szterolt. A másik mutációt elszenvedő gén a *BPH1* volt, amelynek terméke befolyással bír a sejtfa szintézisére.

Annak igazolására, hogy a POS^{EVO} törzs Erg3 enzime funkció veszteses változáson esett át megvizsgáltuk a POS^{EVO} törzs szterol összetételét a szülői CLIB 214 törzshöz viszonyítva. Az, hogy a POSEVO törzs sejtjeiben nem jött létre ergoszterol vagy toxikus szterol, hanem episzterol és ergoszta-dienol, illetve azol kezelés hatására lanoszterol/eburikol/obtusifoliol és 14α -metil-fekoszterol dúsult fel, arra utal, hogy ezen törzs ERG3 génjében funkció veszteses mutáció alakult ki.

Összefoglalás

- *C. parapsilosis cdr1-2* deléció, echinokandin és triazol evolvált törzsek létrehozása

- Létrehozott törzsek antifungális érzékenységének megállapítása

- Evolvált törzsek stressz toleranciájának vizsgálata

- *C. parapsilosis cdr1-2* deléció törzs *in vivo* és *in vitro* virulencia növekedésének kimutatása

- Echinokandin evolvált, illetve a FLU^{EVO} és VOR^{EVO} törzsek *in vivo* virulencia csökkenésének bizonyítása

- Echinokandin evolvált törzsek sejtfal összetételének és szerkezetének vizsgálata

- A *C. parapsilosis* Fks1 fehérje topológia modelljének előrejelzése

- Az evolvált törzsek genomjában potenciálisan rezisztenciát kialakító mutációk azonosítása

- A CLIB 214 és POS^{EVO} törzsek szterol összetételének meghatározása

Publikációs lista

Papp, C., Kocsis, K., Tóth, R., Bodai, L., Willis, R. J., Ksiezopolska, E., Lozoya-Pérez, E. N., Vágvölgyi, C., Mora-Montes, H. M., Gabaldón, T., Nosanchuk, J. D., Gácsér, A., Echinocandin microevolution of *Candida parapsilosis* influences virulence and abiotic stress tolerance. *mSphere*. **IF (2018): 3,575**

Zoppo, M., Lombardi, L., Rizzato, C., Lupetti, A., Bottai, D., **Papp, C.**, Gácsér, A., Tavanti, A. (2018) *CORT0C04210* is required for *Candida orthopsilosis* adhesion to human buccal cells. *Fungal Genet Biol*. **IF (2017): 3,476**

Rónavári, A., Igaz, N., Gopisetty, M. K., Szerencsés, B., Kovács, D., **Papp, C.**, Vágvölgyi, C., Boros, I. M., Kónya, Z., Kiricsi, M., Pfeiffer I. (2018) Biosynthesized silver and gold nanoparticles are potent antimycotics against opportunistic pathogenic yeasts and dermatophytes. *Int J Nanomedicine*. **IF (2017): 4,37**

Tóth, R., Cabral, V., Thuer, E., Bohner, F., Németh, T., **Papp, C.**, Nimrichter, L., Molnár, G., Vágvölgyi, C., Gabaldón, T., Nosanchuk, J. D., Gácsér, A. (2018)

Investigation of *Candida parapsilosis* virulence regulatory factors during host-pathogen interaction. Sci Rep. **IF (2018): 4,122**

Tóth, R., Tóth, A., **Papp, C.**, Jankovics, F., Vágvölgyi, C., Alonso, M. F., Bain, J. M., Erwig, L. P., Gácsér, A. (2014) Kinetic studies of *Candida parapsilosis* phagocytosis by macrophages and detection of intracellular survival mechanisms. Front Microbiol. **IF (2014): 5,12**

Németh, T., Tóth, A., Szenzenstein, J., Horváth, P., Nosanchuk, J. D., Grózer, Z., Tóth, R., **Papp, C.**, Hamari, Z., Vágvölgyi, C., Gácsér, A. (2013) Characterization of Virulence Properties in the *C. parapsilosis* Sensu Lato Species. PLoS One. **IF (2013): 4,49**

Összesített IF: 25,153

MTMT azonosító: **10038259**

Jelen kutatás megvalósítása a GINOP-2.3.2-15-2016-00035 és a GINOP-2.3.3-15-2016-00006 azonosító számú kiemelt projektek keretében zajlott.