

**DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI**

**A *CANDIDA PARAPSILOSIS IN VIVO* FERTŐZÉS  
JELLEMZÉSE:  
A SEJTFAL N-MANNOZILÁCIÓ SZEREPE A  
VIRULENCIÁBAN**

**CSONKA KATALIN**

**TÉMAVEZETŐ:**

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

**BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA**



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

**SZEGED  
2018**

## Bevezetés

Az invazív gombafertőzések száma az utóbbi évtizedekben jelentősen emelkedett, elsősorban a legyengült immunrendszerű betegek növekvő száma, az immunszuppresszív terápia elterjedése, a széles spektrumú antibiotikumok nem megfelelő használata és az antibiotikumokra rezisztens mikroorganizmusok számának növekedése következtében. Különösen az opportunista humánpatogén gombák által okozott fertőzések esetszámában következett be nagymértékű emelkedés, ezen belül is a *Candida* nemzetség tagjai okoznak kiemelkedően magas arányban megbetegedéseket. Az elmúlt két évtizedben a *Candida parapsilosis* egyre fontosabb kórokozóvá vált, mivel jelenleg geográfiai régióktól függően a második vagy harmadik leggyakrabban izolált faj *Candida* fertőzött páciensek vérkultúrájából. A *C. parapsilosis* által okozott fertőzések előfordulása különösen aggasztó a kritikusan alacsony születési súlyú újszülöttek körében, mivel az Egyesült Királyságban és Észak-Amerikában az invazív

gombafertőzések több mint egynegyedét okozza ebben a korcsoportban.

Kutatócsoportunk korábbi eredményei bizonyítják, hogy a *C. parapsilosis* sejtfal *N*-mannoziláció hiányában csökken a patogén gomba fertőzőképessége. Kísérleteink során *Drosophila melanogaster*ben, újszülött és kifejlett egér *in vivo* modellekben jellemeztük a *C. parapsilosis* fertőzést és vizsgáltuk a sejtfal mutáns törzs csökkent virulenciájának hátterében álló immunmechanizmusokat. Emellett vizsgáltuk a Dectin-1 receptor szerepét a *C. parapsilosis* törzsek felismerésében.

## **Alkalmazott módszerek**

### *In vivo* fertőzéses modellek:

- - *D. melanogaster* fertőzése különböző *Candida* fajokkal
- - újszülött egerek intravénás fertőzése a feji temporalis vénán keresztül
- - kifejlett egerek intravénás fertőzése farok vénán keresztül
-

### Molekuláris technikák:

- RNS izolálás
- qRT-PCR (kvantitatív valós-idejű PCR)

### Immunológiai módszerek

- áramlási citometria
- hisztopatológia
- ELISA (enzimkötött immunoszorbens próba)

### Egyéb módszerek:

- CFU (kolónia formáló egység) meghatározása

## **Eredmények:**

### 1. *C. parapsilosis* fertőzés jellemzése *D. melanogaster* modellben

Elsőként teszteltük a *MyD88*<sup>-/-</sup> *D. melanogaster* törzs túlélését a *C. albicans*szal, *C. glabrata*val és *C. parapsilosis*szal történt fertőzést követően. Eredményeink azt mutatják, hogy a *Candida* fajokkal injektált vad típusú (vt) legyek nem érzékenyek a *Candida* fertőzésre, ami megfelel a szakirodalmi adatoknak. A

*MyD88*<sup>-/-</sup> legyek halálzási aránya szignifikánsan nagyobb a *C. parapsilosis*szal történt inkubáció során összehasonlítva a PBS kontrollal. Mindemellett azt is tapasztaltuk, hogy a *C. parapsilosis* fertőzés a *C. albicans*hoz képest csökkent, míg a *C. glabrata*hoz viszonyítva nagyobb elhullást okozott a mutáns legyekben. Adataink alapján a *C. albicans* és *C. glabrata* fertőzött *GNBP3*<sup>hades</sup> legyek túlélési aránya szignifikánsan csökkent a PBS kontroll csoporthoz képest, emellett a *C. parapsilosis* fertőzés szignifikáns csökkenést okozott a  $\beta$ -glükán receptor mutáns *ecetmuslica* túlélésében. A *psh*<sup>-/-</sup> legyek a vad típushoz hasonlóan rezisztensek a *C. albicans* és *C. parapsilosis* fertőzésre és egyedül a *C. glabrata*val történt infekció okozott érzékenységet a kontrollhoz képest.

## 1.2. A sejtfa*N*-mannoziláció szerepének vizsgálata a *C. parapsilosis* virulenciájában a *D. melanogaster* modellben

Vizsgáltuk, hogy a sejtfa*N*-mannán komponense hatással van-e a *C. parapsilosis* patogenitására ebben a modellben, monitoroztuk a vt, a *MyD88*<sup>-/-</sup>, a *GNBP3*<sup>hades</sup>

és a *psh*<sup>-/-</sup> legyek túlélését a *Cpoch1Δ/Δ* (*N*-mannán mutáns *C. parapsilosis* törzs) és a referencia törzssel történt fertőzést követően. Azt tapasztaltuk, hogy a *Cpoch1Δ/Δ* fertőzésre a *MyD88*<sup>-/-</sup> legyek érzékenységet mutatnak a PBS kontroll csoporthoz viszonyítva, azonban a legyek túlélési aránya szignifikánsan magasabb a referencia törzssel injektált csoporthoz képest. A *GNBP3*<sup>hades</sup> legyek életképessége szignifikánsan csökkent a *Cpoch1Δ/Δ*-val való inkubáció hatására, emellett nem detektáltunk különbséget a referencia törzs és a *Cpoch1Δ/Δ* fertőzött csoportok túlélési arányában. A vt és *psh*<sup>-/-</sup> legyek életképessége nem mutatott eltérést a gombával fertőzött és a PBS kontroll csoport között.

### 1.3. A *D. melanogaster* humorális válaszána vizsgálatá a *C. parapsilosis* fertőzést követően

Kísérleteink során a mikrobiális stimulust követő Drosomycin (*Drs*) és Metchnikowin (*Mtk*) antimikrobiális peptidek (AMP-k) indukcióját valós-idejű PCR-rel tanulmányoztuk. A vizsgálatokhoz referenciaként a *C. albicans* gomba és a *M. luteus*

baktérium törzset használtuk. Megfigyeltük, hogy a vt gazdaszervezetben a *Candida* fajok által indukált AMP-k mRNS szintje szignifikánsan alacsonyabb, mint a *M. luteus* indukált mintákban, ezen belül a *C. albicans* szignifikánsan magasabb *Drs* és *Mtk* expressziót váltott ki, mint a *C. parapsilosis*. A vt légyhez viszonyítva a gombával és a baktériummal inkubált *MyD88<sup>-/-</sup>* csoportok esetében szignifikánsan alacsonyabb mRNS szintet detektáltunk. A *C. albicans* és *C. parapsilosis* fertőzött vt ecetmuslica csoportokhoz viszonyítva a *GNBP3<sup>hades</sup>* legyekben szignifikáns csökkenést figyeltünk meg a *Drs* és *Mtk* indukcióban, míg a Persephone hiánya nem volt szignifikáns hatással a gombával stimulált az AMP-k mRNS szintjére.

Azt tapasztaltuk, hogy a vt *D. melanogaster* törzsben a *Cpoch1Δ/Δ* törzssel történt fertőzés magasabb indukciót okozott, ami a *Mtk* esetében szignifikánsnak bizonyult a referencia törzshöz viszonyítva. Ezen felül nem tapasztaltunk különbséget a *MyD88<sup>-/-</sup>*, a *GNBP3<sup>hades</sup>* és a *psh<sup>-/-</sup>* ecetmuslica törzsekben a referencia és a

*Cpoch1Δ/Δ C. parapsilosis* törzsek által stimulált AMP-k mRNS szintjében.

## 2. A szisztémás *C. parapsilosis* fertőzés jellemzése újszülött egér modellben

Munkánk során egy intravénás újszülött egér modellt írunk le a szisztémás *C. parapsilosis* fertőzés tanulmányozására. A 2 napos BALB/c egerek *C. parapsilosis*szal történő oltása után az élesztősejtek homogén terjedését figyeltük meg a különböző szervekben, amit hisztopatológiai vizsgálatokkal is alátámasztottunk. Kettő és hét nappal a fertőzést követően szignifikánsan alacsonyabb számú CFU-t detektáltunk a *Cpoch1Δ/Δ* fertőzött egerek lépében, veséjében és májában a vad típusú *C. parapsilosis*hoz (*Cp vt*) viszonyítva. Azt tapasztaltuk, hogy 7 nappal a fertőzést követően az egerek veséjében a *Cpoch1Δ/Δ* szignifikánsan nagyobb TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  citokin és KC kemokin termelődést indukált a *Cp vt*-hez képest.

Adataink alapján szignifikánsan csökkent CFU volt detektálható a *Cpoch1Δ/Δ* fertőzött felnőtt és újszülött egerek lépében, veséjében és májában a *Cp vt*-



vel fertőzött egér csoportokhoz viszonyítva. Azt tapasztaltuk, hogy a kifejlett egerekhez képest az újszülött egerek szerveiben még detektálható a *Cpoch1Δ/Δ* 7 nappal a fertőzést követően.

### 3. A vad típusú és a sejtfal mutáns *C. parapsilosis* fertőzés jellemzése felnőtt egér modellben

Összehasonlítva a vad típusú és a sejtfal mutáns törzssel történt fertőzést azt tapasztaltuk, hogy az egerek hatékonyabban ellenállnak a *Cpoch1Δ/Δ* fertőzésnek, ugyanis szignifikánsan kevesebb *Cpoch1Δ/Δ* CFU-t detektáltunk a lépben, a májban és a vesében a *Cp* vt injektált csoporthoz képest. Munkánk során áramlási citometriával elemeztük a *C. parapsilosis* törzsekkel történt fertőzés hatását a neutrofil granulociták, makrofágok és dendritikus sejtek toborzására. Azt tapasztaltuk, hogy a *Cp* vt indukálta az immunsejtek beáramlását a fertőzött szervekbe, ami a harmadik napon mutatott nagyobb mértékű immunsejt akkumulációt.

Megfigyeltük, hogy a *Cpoch1Δ/Δ* stimulus alacsonyabb makrofág és dendritikus sejt akkumulációt eredményezett összehasonlítva a *Cp* vt által indukált

immunsejt kompozícióval. A Multiplex ELISA eredmények alapján a kontroll egér csoporthoz viszonyítva a *Cp* vt fertőzés indukálta a TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 gyulladáscsökkentő citokinek és a GM-CSF kemokin mennyiségét, emellett szignifikáns citokin szekréciót tapasztaltunk az IFN $\gamma$ , IL-5, IL-4, IL-13, IL-17A, IL-22, továbbá az IL-27 és az IL-9 citokin esetében. A kontroll csoporthoz viszonyítva a *Cpoch1 $\Delta/\Delta$*  fertőzés szignifikáns indukciót az IL-27, IL-9 és IL-23 gyulladáscsökkentő citokinek termelésében okozott.

#### 4. A Dectin-1 receptor szerepének vizsgálata a szisztémás *C. parapsilosis* fertőzés során

A lépből, a májból és a veséből meghatározott gomba telepszám alapján nem találtunk különbséget a vt és a Dectin-1<sup>-/-</sup> egerek érzékenységiében a *C. parapsilosis* fertőzés hatására. Szintén megfigyeltük, hogy a *C. parapsilosis* által kiváltott természetes immunsejtek kompozíciójában nincs különbség a Dectin-1<sup>-/-</sup> és a vt egerek között. Eredményeink alapján a Dectin-1 deficiens és a vad típusú egerek hasonló hatékonysággal

kontrollálták a *Cpoch1Δ/Δ* sejtek terjedését és nem találtunk különbséget az immunsejtek toborzásában a vese makrofág és dendritikus sejt akkumulációjában. Azonban a *Cpoch1Δ/Δ* stimuláció utáni 3. napon, a vad típusú egerekhez képest a Dectin-1<sup>-/-</sup> egerek csökkent neutrofil granulocita számát figyeltük meg a vesében.

### **Összefoglalás:**

Kísérleteink során kimutattuk, hogy:

1. A *D. melanogaster*ben a *C. parapsilosis* elleni védelemben szerepet játszik a GNBP3 β-1,3-glükán receptor általi felismerés és a Toll útvonal aktiváció, míg a Persephone nem befolyásolja a *C. parapsilosis* fertőzés kimenetelét.
2. Az *N*-mannoziláció a *D. melanogaster* modellben befolyásolja a *C. parapsilosis* virulenciáját, ezzel egyidőben kimutattuk, hogy a MyD88 deficiens *Drosophila* túlélésének vizsgálata alkalmas rendszerré teszi az ecetmuslicát a *C. parapsilosis* törzsek virulencia különbségeinek kimutatására.

3. Munkánk során egy intravénás újszülött egér modellet írunk le a szisztémás *C. parapsilosis* fertőzés tanulmányozására.
4. Egy összehasonlító elemzés segítségével bemutattuk, hogy a felállított modell alkalmazható a különböző *C. parapsilosis* törzsek virulenciájának megfigyeléséhez.
5. A kifejezett egerekhez képest az újszülött egerek érzékenyebbek mind a vad típusú mind pedig a sejtfal mutáns *C. parapsilosis* törzsszel történt fertőzésre.
6. A vad típusú *C. parapsilosis* indukálja a neutrofil granulociták, makrofágok és dendritikus sejtek toborzását, emellett a fertőzés korai időpontjaiban a TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, GM-CSF és IFN- $\gamma$  termelődést, ami elősegítheti a gombasejtek hatékony eliminációját.
7. A sejtfal *N*-mannán oldalláncainak hiányában a *C. parapsilosis* csökkent virulenciával rendelkezik, alacsonyabb immunsejt infiltrációt indukál és a gyulladáscsökkentő citokinek termelődését váltja ki.
8. A vad típusú *C. parapsilosis* felismerése és a sejtfal *N*-mannoziláció hiányában megfigyelt csökkent virulencia független a Dectin-1 receptortól.

## Referált folyóiratban megjelent közlemények:

1. **Csonka, K**, Vadovics, M, Marton, A, Vagvolgyi, C, Zajta, E, Toth, A, Toth, R, Vizler, C, Tiszlavicz, L, Mora-Montes, HM, Gacser, A (2017). “Investigation of OCH1 in the virulence of *Candida parapsilosis* using a new neonatal mouse model.” *Frontiers in Microbiology* 8: 1197. *IF: 4,019*
2. Pérez-García, LA, **Csonka, K**, Flores-Carreón, A, Estrada-Mata, E, Mellado-Mojica, E, Németh, T, López-Ramírez, LA, Toth, R, López, MG, Vizler, C, Marton, A, Tóth, A, Nosanchuk, JD, Gácser, A, Mora-Montes, HM (2016). “Role of protein glycosylation in *Candida parapsilosis* cell wall integrity and host interaction” *Front. Microbiol.* 8(7):306. *IF: 4,076*
3. Toth, A, Zajta, E, **Csonka, K**, Vágvolgyi, C, Netea, MG, Gácser, A (2017) “Specific pathways mediating inflammasome activation by *Candida parapsilosis*.” *Sci. Rep.* 22(7):43129. *IF: 4,122*
4. Navarro-Arias, MJ, Defosse, TA, Dementhon, K, **Csonka, K**, Mellado-Mojica, E, Dias Valério, A, González-Hernández, RJ, Courdavault, V, Clastre, M, Hernández, NV, Pérez-García, LA, Singh, DK, Vizler, C, Gácser, A, Almeida, RS, Noël, T, López, MG, Papon, N, Mora-Montes, H (2016). “Disruption of protein mannosylation affects *Candida guilliermondii* cell wall, immune sensing, and virulence.” *Front. Microbiol.* 2(7):1951. *IF: 4,076*

5. Estrada-Mata, E, Navarro-Arias, MJ, Pérez-García, LA, Mellado-Mojica, E, López, MG, **Csonka, K**, Gacser, A, Mora-Montes, HM (2016). "Members of the *Candida parapsilosis* Complex and *Candida albicans* are Differentially Recognized by Human Peripheral Blood Mononuclear Cells." *Front Microbiol.* 13;6:1527. *IF: 4,076*
6. Toth, A, Nemeth, T, **Csonka, K**, Horvath, P, Vagvolgyi, C, Vizler, C, Nosanchuk, J D, Gacser, A (2014). "Secreted *Candida parapsilosis* lipase modulates the immune response of primary human macrophages." *Virulence* 5(4): 555-562. *IF: 3,319*
7. Toth, A, **Csonka, K**, Jacobs, C, Vagvolgyi, C, Nosanchuk, J D, Netea, M G, Gacser, A (2013). "*Candida albicans* and *Candida parapsilosis* induce different T-cell responses in human peripheral blood mononuclear cells." *J Infect Dis* 208(4): 690-698. *IF: 5,778*

Összesített IF: **29,466**

## Társszerzői nyilatkozat

Kijelentem, hogy Csonka Katalin szerepe meghatározó jelentőségű volt a

**Csonka, K**, Vadovics, M, Marton, A, Vagvolgyi, C, ... Mora-Montes, HM, Gacser, A (2017). “Investigation of OCH1 in the virulence of *Candida parapsilosis* using a new neonatal mouse model.” *Frontiers in Microbiology* 8: 1197. *IF: 4,019*

Pérez-García, LA, **Csonka, K**, ... Gácser, A, Mora-Montes, HM (2016). “Role of protein glycosylation in *Candida parapsilosis* cell wall integrity and host interaction” *Front. Microbiol.* 8(7):306. *IF: 4,076*

címmel megjelent közleményekben, így az értekezésben és a publikációkban közölt eredményeket tudományos fokozat (Ph.D.) megszerzésére nem használtuk fel és ezt a jövőben sem fogjuk tenni.

\*felelős szerző

.....

Prof. Dr. Gácser Attila

