

DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**HUMÁN KERATINOCITÁK ÉS *CANDIDA* FAJOK
INTERAKCIÓJÁBÓL EREDŐ IMMUNOLÓGIAI
FUNKCIÓK VIZSGÁLATA**

NOVÁK ÁDÁM

TÉMAVEZETŐ:

**PROF. DR. GÁCSER ATTILA
EGYETEMI TANÁR**

BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA



SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

**TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS INFORMATIKAI
KAR**

MIKROBIOLÓGIAI TANSZÉK

SZEGED

2025

Bevezetés

Napjaink egyik növekvő tendenciát mutató problémája az invazív gombás megbetegedések, amelyek több millió embernél okoznak megbetegedéseket világszerte. Ezen kórképek kialakításában az opportunistá humánpatogén *Candida* gombafajok kiemelkedően magas szerepet kapnak. Ezen fajok által kialakított szisztémás megbetegedések okozta mortalitási ráták akár a 75%-ot is elérhetik. A klinikumban és a szakirodalomban is ismert *C. albicans* az egyik legismertebb és körüljáratott faj a *Candida* nemzetségen belül, de más nem *albicans* fajok is hozzájárulnak ezen kórképek megjelenésében. Ezek közé tartozik a *C. parapsilosis* faj, mely a humán bőrfelületek gyakori kommenzalistájaként ismert és onnan gyakran izolálható. Legnagyobb veszélyben az invazív kandidiázisokra az újszülöttek, idősek és immunszuppresszált egyének vannak.

Az utóbbi évek tanulmányinak túlnyomó része a *C. albicans* által okozott immunválasz kutatására irányul. Ennélfogva a nem *albicans* fajokról, mint például a *C. parapsilosis* fajról csak kevés ismeret áll rendelkezésre a

humán immunválasz tekintetében. A gombaellenes immunválasz feltárása fontos mérföldkő a hatékony antifungális terápiák megtalálásához. Az immunválasz egy nemzetségbe tartozó fajok esetén is jelentős eltéréseket tud mutatni, így szükséges a faji szinten történő vizsgálódás is.

A humán bőr az elsődleges immunológiai vonal a szervezetünk számára, amely felveszi a küzdelmet számos patogén mikroba, vírus vagy gomba által okozott támadással szemben. Az epidermiszben megtalálható keratinocita sejtek PRR-ek segítségével képesek PAMP-okat észlelni és szignalizációs folyamatok segítségével effektor funkciókat indukálni. Az effektor funkciókkal és a sejt-patogén interakciókkal kapcsolatos szakirodalom hiányos vagy felületesen tárgyalta, főleg nem *albicans* fajok esetében.

Kutatásunk során a humán bőrhámsejtek (keratinociták) és kommenzalista, valamint patogén *C. parapsilosis* és *C. albicans* fajok között végbemenő interakciókat tártuk fel részletesebben. Megvizsgáltuk, hogy a keratinociták milyen mértékben károsodnak ezen

két gombafaj által okozott fertőzés hatására és milyen a citokin/kemokin szekréciónak profiljuk. A gombák mennyire képesek kitapadni a hámsejtek felszínéhez. A keratinocita sejtek milyen internalizációs képességgel rendelkeznek. Valamint RNS kivonás és szekvenálás segítségével részletesebben betekintettünk a gomba és sejt oldali változásokra a fertőzést követően. Továbbá kitértünk a gombafertőzés okozta metabolomikai eltérésekre a sejtek részéről. Ezen túlmenően mindezeket a vizsgálatokat (kivéve RNS szekvenálás) elvégeztük olyan kontextusban is, hogy a keratinocita sejteket a kommenzalista gombával előinkubáltuk és ezt követően fertőztük meg őket patogén gombával, ilyen módon a sejtek előkészített immunitása kapcsán nyertünk információkat.

Módszerek

Keratinocita sejtvonalak és *Candida* törzsek fenntartása sejt-gomba interakciós fertőzésekhez: HaCaT és HPV-KER sejtek fagyasztása, fenntartása, *Candida* törzsek átoltása, keratinocita sejtek fertőzése *Candida* gombával.

LDH próba: Keratinocita sejtek pusztulása során felszabadult laktát-dehidrogenáz felszabadulás mérése *Candida* fertőzést követően.

Citokinek/kemokinek vizsgálata immunológiai módszer segítségével: Enzim kötött immunszorbens próba (ELISA) használata.

CFU meghatározás: Keratinocita sejtek *Candida* gombával történő fertőzése után a gombák mennyiségi meghatározása.

Képkalkotó áramlási citometria: GFP-jelölt *Candida* gombák asszociációjának vizsgálata a hámsejtekhez és pHRodo jelölt keratinocita sejtek által fagocitált *Candida* gombák mennyiségi meghatározása.

RNS szekvenálás: Keratinocita sejtekből és *Candida* gombákból való RNS kivonást követően RNS szekvenálás a génexpressziós változások meghatározására. Gomba oldalon az upregulált gének és *ECE1* expresszió, sejt oldalon a citokin/kemokin termelésért, antimikrobiális peptid termelésért felelős gének és további sejtes, valamint biológiai funkciók azonosítása.

Keratinocita sejtek metabolomikai változásainak detektálása: *Candida* fertőzést követően bőrhámsejtek metabolitjainak feltárása és GC-MS technikával történő azonosítása.

Eredmények

Hámsejtek károsodásának mértéke *Candida* fertőzést követően és előkészített immunitás esetén

A keratinocita sejtek *Candida* gombával történő fertőzését követően megmértük a hámsejtekből felszabaduló LDH mennyiséget, ami ezen sejtek károsodásának mértékére utal. Eredményeink azt mutatják, hogy a *C. albicans* SC5314 törzs hatására a keratinocita sejtek károsodása szignifikánsan megnőtt a kontroll csoporthoz képest és leginkább a HPV-KER keratinociták voltak érzékenyebbek. Ez a tendencia volt megfigyelhető 24 órával és 12 órával a fertőzést követően is. 48 órával a gombafertőzést követően már a HaCaT sejtek bizonyultak érzékenyebbnek az SC5314-es törzsön túl a WO-1 *C. albicans* törzs esetében is. Pre-inkubált

körülmények között csak HPV-KER sejtek esetén figyeltünk meg szignifikáns csökkenést a károsodásban alacsony fertőzési dózisú *C. albicans* SC5314 törzs esetében. A felkészített immunitás során használt kommenzalista gomba különböző fertőzési dózisaival hatással vannak a *C. albicans* SC5314 törzs által okozott károsodás mértékére.

Keratinociták citokin/kemokin termelése *Candida* fertőzésre és előkészített immunitás esetében

A HaCaT és HPV-KER sejtek citokin/kemokin termelését *Candida* fertőzést követően ELISA módszer segítségével állapítottuk meg. Azt tapasztaltuk, hogy mindkét sejtvonal esetén az IL-6 citokin és IL-8 kemokin termelés emelkedett meg szignifikánsan *C. albicans* fertőzés hatására a kontroll csoporthoz képest. Pre-inkubációs körülmény esetében rendszerszerűen nem állapítható meg emelkedett termelés sem IL-6-ra sem IL-8-ra, de az esetek nagyobb többségében az élő *C. parapsilosis* CLIB214 törzs általi pre-inkubáció eredményezett szignifikánsan emelkedett IL-6 és IL-8

szekréciót *C. albicans* fertőzés hatására dominánsan HPV-KER sejtek esetében.

Candida sejtek kitapadása keratinocitákhoz nem pre-inkubációs és pre-inkubációs esetben

A *Candida* gombasejtek kitapadásának mértékét keratinocitákhoz a fertőzést követően a felülúszóban lévő és a sejtekhez asszociált gombák YPD táptalajra végzett szélesztését követő CFU számolással határoztuk meg. Arra a megállapításra jutottunk, hogy a *C. albicans* törzsek kitapadó képessége szignifikánsan magasabb a *C. parapsilosis* törzsekhez képest. Ezen képesség tulajdonítható a *C. albicans* törzsek valódi hifaképző tulajdonságának és adhezinjeik magasabb kifejeződésének. A *C. parapsilosis* törzsek az előbb említett tulajdonságok hiányában hosszabb fertőzési időtartam után sem mutattak szignifikánsan nagyobb kitapadó képességet, mint ami a rövidebb inkubáció esetében volt megfigyelhető. Pre-inkubációs körülmények esetén nem volt detektálható változás az asszociációs képességben a nem pre-inkubációs állapothoz viszonyítva.

Keratinocita sejtek fagocitáló képessége *Candida* gombával szemben és pre-inkubációs állapotban

A hámsejtek fagocitáló képességét *Candida* gombasejtekkel szemben a gomba pH-Rodo festékkel való megjelölését követően áramlási citometria segítségével vizsgáltuk. Ez a festék a sejtekbe történő internalizáció esetén az ott uralkodó savas körülmények között emelkedett jelet emittál. Mivel a keratinociták nem tipikusan fagocitáló sejtek, így a fagocitózis csak néhány százalékos volt a teljes mért populációhoz képest, azonban a *C. albicans* törzseket szignifikánsan nagyobb mértékben voltak képesek fagocitálni a hámsejtek a *C. parapsilosis* törzsekhez képest. Ez tulajdonítható annak is, hogy a *C. albicans* törzsek esetén jelentősebben fennáll az asszociáció a sejtekhez, ami a fagocitózis meglétének egy fontos feltétele. Előkészített immunitású esetben a pre-inkubációt követő *C. albicans* SC5314 törzsszel végzett fertőzés után a sejtek internalizációs hatékonysága szignifikánsan csökkent a nem pre-inkubációs esethez képest, *C. albicans* WO-1 törzsre nem változott. Ennélfogva az előkészített immunitású állapot nem

mutatott hatékonyabb fagocitózist a keratinocita sejtek oldaláról *C. albicans* SC5314 törzzsel szemben.

Sejt-gomba interakciót követő génexpressziós változások és keratinociták antimikrobiális peptidválasza

A *Candida* gombasejtekből és keratinocita sejtekből RNS-t vontunk ki, majd RNS szekvenálással részletesebb információkhoz jutottunk a sejt-gomba interakció által okozott változások kapcsán. Az *ECE1* gén egy kulcsfontosságú virulencia faktor a *C. albicans* törzsek esetén, így felderítettük ennek a génnek az expresszióját. Arra a következtetésre jutottunk, hogy a gomba, keratinocita sejtekkel történő interakciója szignifikánsan nem emeli meg ennek a génnek az expresszióját, hanem alap állapotában magas expressziót mutat, főleg igaz ez a *C. albicans* SC5314 törzs esetében. Kísérleteink során *Candida* gombafertőzés hatására sem HaCaT, sem HPV-KER sejtvonalon nem tudtunk detektálni antimikrobiális peptid termelést. Továbbá fertőzés során a gomba oldalról megemelkedett olyan gének kifejeződése, melyek segítséget nyújtanak a gomba kitapadó képességének megnövelésében, a szabadgyök

okozta stressz csökkentésében, valamint a gomba anyagcseréjének és transzporter aktivitásának megnövekedett szabályozásában. Ezzel szemben a keratinocita sejtek oldaláról olyan folyamatok mutattak felülszabályozást, mint a szignalizáció, citokin/kemokin termelés és ROS szint csökkentés.

Nem pre-inkubált és pre-inkubált *Candida* fertőzés utáni metabolomikai változások a keratinocitákban

A HaCaT és HPV-KER hámsejtek *Candida* gombával történő fertőzését követően a sejteket feltártuk és tartalmukat GC-MS technikával vizsgáltuk, így a fertőzés hatására bekövetkező metabolomikai változásaikat tudtuk felderíteni. Általánosan elmondható, hogy a *C. albicans* SC5314 törzs általi fertőzés hatására szignifikánsabb metabolikus változások -gyakrabban emelkedettebb szintek, ritkábban kisebb termelődés-indukálódtak a fertőzetlen kontroll csoporthoz képest nem pre-inkubált és pre-inkubált állapotban is. Bár sok esetben megfigyelhető volt változás *C. albicans* WO-1 törzsnél is, de annak mértéke mérsékeltebb volt a *C. albicans* SC5314-es törzshöz képest. Olyan metabolitok

termelődése mutatott erőteljesebb változást a kontroll csoporthoz képest, amelyek felelősek a hámsejtek barrier funkcióinak felerősítésében, sejt differenciáció elősegítésében, kollagén szintézisben, gyulladásos folyamatokban és antioxidáns tulajdonságokban.

Összefoglalás

1. A keratinocita sejtek károsodása 12 és 24 órás *Candida* fertőzést követően, a *C. albicans* törzsek által szignifikánsan emelkedettebb és a HPV-KER sejtek esetén nagyobb sejtpusztulás figyelhető meg. 48 órás fertőzést követően a HaCaT sejtek válnak érzékenyebbekké. Pre-inkubált állapotban a HPV-KER sejtek esetén mérhető szignifikánsan alacsonyabb károsodás alacsony dózisú *C. albicans* SC5314 törzs fertőzésre.
2. A keratinociták *C. albicans* törzsek (főleg SC5314 törzs) fertőzése esetén mutatnak szignifikánsan magasabb IL-6 citokin és IL-8 kemokin termelést. Pre-inkubált állapotban bizonyos pre-inkubációs körülmények között szignifikánsan emelkedettebb

citokin/kemokin termelés figyelhető meg, főleg HPV-KER sejteknél a nem pre-inkubált helyzetben mértékhez képest.

3. A *C. albicans* törzsek szignifikánsan nagyobb mértékben képesek kitapadni a keratinocitákhoz, mint a *C. parapsilosis* törzsek. Pre-inkubált körülmények között a kitapadás hatékonysága nem változik a nem pre-inkubált állapothoz viszonyítva.
4. A hámsejtek fagocitáló képessége alacsony, de szignifikánsan hatékonyabban képesek a *C. albicans* törzsek internalizációjára. Pre-inkubált fertőzés során a *C. albicans* SC5314 törzzsel szemben a hámsejtek internalizációs képessége szignifikánsan csökkent volt a nem pre-inkubált állapotban mértékkel összehasonlítva.
5. A *C. albicans* törzsek *ECE1* génexpressziója keratinocita sejtekkel interakcióba hozva nem változik, alapállapotban magas szintet mutat és nagyobb az SC5314 törzs esetén. A HaCaT és HPV-KER sejtek *Candida* fertőzést követően nem mutattak antimikrobiális peptid termelést. Sejt-gomba interakció során gomba oldalról szignifikánsan

emelkedett folyamatok: adhéziós képesség, szabadgyök okozta stressz csökkentése, megnövekedett anyagcsere és transzporter aktivitás; sejt oldalról: szignalizáció, citokin/kemokin termelés és ROS csökkentés.

6. A bőrhámsejtek metabolizmusa *C. albicans* törzsek hatására mutat szignifikánsan nagyobb mértékű változásokat, mind pre-inkubált és nem pre-inkubált körülmények között. A kontroll csoporthoz képest szignifikánsan emelkedett metabolitokhoz köthető funkciók: sejt differenciáció, kollagén szintézis, gyulladásos folyamatok, antioxidáns tulajdonság, barrier szerep.

Publikációk listája

A disszertáció témájához kapcsolódó közlemény:

Novák Ádám, Zajta Erik, Csikós Máté, Halmos Emese, Horváth Márton, Tildy Orsolya, Szekeres András, Svorenj Gergő, Gémes Nikolett, Szebeni Gábor, Tóth Renáta, Gácsér Attila* (2025): Comprehensive analysis of human keratinocyte interactions with *Candida albicans* and *Candida parapsilosis*. - Virulence. doi: <https://doi.org/10.1080/21505594.2025.2532815>. IF: 5,40

A disszertáció témájához kapcsolódó egyéb közlemény:

Zajta Erik, Csonka Katalin, Tóth Adél, Tiszlavicz László, Németh Tamás, Orosz Anita, **Novák Ádám**, Csikós Máté, Vágvölgyi Csaba, Mócsai Attila, Gácsér Attila (2021): Signaling through Syk or CARD9 Mediates Species-Specific Anti-*Candida* Protection in Bone Marrow Chimeric Mice. - *mBio* 12 : 4 Paper: e01608-21 , 18 p. doi: <https://doi.org/10.1128/mbio.01608-21>. IF: 5,85

Egyéb tudományos közlemények:

Hernández-Chávez M.J., Clavijo-Giraldo D.M., **Novák Á.**, Lozoya-Pérez N.E., Martínez-Álvarez J.A., Salinas-Marín R., Hernández N.V., Martínez-Duncker I., Gácsér A., Mora-Montes H.M. (2019): Role of Protein Mannosylation in the *Candida tropicalis*-Host Interaction. - *Frontiers in microbiology* 10 Paper: 2743, 18 p. doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02743>. IF: 5,08

Váczy-Kálmán Zoltán, Szabó Dóra, Molnár Nikolett, Kiss Tibor, Kiss Levente, Yu Pei Tan, **Novák Ádám**, Pálfi Xénia, Gomba-Tóth Adrienn, Karácsony Zoltán (2025): *Microdochium majus* Isolated from Grapevine Is a Mycoparasite of *Botrytis cinerea*. - *Journal of Fungi* 11, no. 1: 31. doi: <https://doi.org/10.3390/jof11010031>. IF: 4,00

Összesített IF: 20,33

MTMT azonosító: 10073213

Társszerzői nyilatkozat

Kijelentem, hogy Novák Ádám szerepe meghatározó jelentőségű volt a

Novák Ádám, Zajta Erik, Csikós Máté, Halmos Emese, Horváth Márton, Tildy Orsolya, Szekeres András, Svorenj Gergő, Gémes Nikolett, Szebeni Gábor, Tóth Renáta, Gácsér Attila* (2025): Comprehensive analysis of human keratinocyte interactions with *Candida albicans* and *Candida parapsilosis*. - Virulence. doi: <https://doi.org/10.1080/21505594.2025.2532815>. IF: 5,40

és a

Zajta Erik, Csonka Katalin, Tóth Adél, Tiszlavicz László, Németh Tamás, Orosz Anita, **Novák Ádám**, Csikós Máté, Vágvolgyi Csaba, Mócsai Attila, Gácsér Attila* (2021): Signaling through Syk or CARD9 Mediates Species-Specific Anti-*Candida* Protection in Bone Marrow Chimeric Mice. - *mBio* 12 : 4 Paper: e01608-21 , 18 p. doi: <https://doi.org/10.1128/mbio.01608-21>. IF: 5,85

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. Gácsér Attila