

**DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI**

**AZ ANTIFUNGÁLIS REZISZTENCIA KIALAKULÁSÁNAK  
ÉS KÖVETKEZMÉNYÉNEK VIZSGÁLATA A  
HUMÁNPATOGÉN *CANDIDA AURIS* ESETÉBEN**

**BOHNER FLÓRA FATIME**

**TÉMAVEZETŐK  
PROF. DR. GÁCSER ATTILA  
DR. TÓTH RENÁTA**

**BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA**



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

**SZEGED**

**2023**

## Bevezetés

A patogén gombák által okozott opportunista fertőzések évről-évre egyre nagyobb egészségügyi kockázatot jelentenek. Bár a megbetegedések legnagyobb száma a testfelszínt érinti, ezen területek kolonizációja jelentősen megnöveli az invazív fertőzések kialakulásának esélyét. A mikroorganizmusok a véráramba jutva szisztémás fertőzések kialakítására képesek, amelyek kezelésére limitált számú gomba ellenes szer áll rendelkezésünkre.

A gombákhoz köthető végzetes kimenetelű fertőzések meghatározó hányadáért a *Candida* nemzetségbe tartozó patogének tehetőek felelőssé. Bár a nemzetség legjelentősebb képviselőjének továbbra is a *Candida albicans* tekinthető, az utóbbi évek epidemiológiai kutatásai a nem-*albicans* fajok izolálhatóságának növekedésére mutatnak rá. Ilyen feltörekvő fajként tartjuk számon, az először 2009-ben izolált *Candida auris*-t is. Ezen patogén mellett, hogy főként kórházi környezetben terjedve, egy már eleve legyengült betegpopulációt veszélyeztet, nagy hatékonysággal képes rezisztenciát kialakítani a klinikai gyakorlatban alkalmazott gomba ellenes szerekkel szemben. Ezen tulajdonságai miatt a *C. auris* által kiváltott fertőzések mortalitási aránya 30-70% közé tehető.

Az ezidáig azonosított *C. auris* izolátumok mintegy 90%-a mutat rezisztenciát az azokkal történő kezelésre, míg megközelítőleg 30%-a amfotericin-B és 5%-a echinocandin rezisztens. A *Candida* nemzetségben belül a több antifungális szer csoporttal szemben rezisztens izolátumok aránya is magasabb az általánosnál (multi drog rezisztens), míg egyes törzsek egyik gomba ellenes szer csoporttal végzett terápiára sem reagálnak, vagyis pán-drog rezisztensnek tekinthetők. A terápiával szemben ellenálló izolátumok magas száma arra enged következtetni, hogy ezen patogén olyan tulajdonságokkal rendelkezik melyek az antifungális szer hatásmechanizmusától függetlenül megkönnyítik a szerzett antifungális rezisztencia kialakulását anélkül, hogy jelentős mértékben csökkentenék a gombasejtek életképességét.

Munkánk során célunk volt annak vizsgálata, hogy a *C. auris* milyen mechanizmusokon keresztül képes ellenállóvá válni az antifungális terápiára, illetve, hogy a szerzett rezisztencia milyen további fenotípust, genotípust, valamint virulenciát érintő változásokkal hozható összefüggésbe.

## **Alkalmazott módszerek**

### **Kísérletekben felhasznált sejtek tenyésztése**

Élesztő sejtek fenntartása és tenyésztése, J774.2 sejtvonaltal tenyésztése, *in vitro* mikroevolúciós eljárás

### **Létrehozott törzsek jellemzése során alkalmazott módszerek**

Antifungális érzékenység meghatározása mikrodilúciós módszerrel, növekedési tesztek folyékony tápoldatban, abiotikus stressztolerancia vizsgálat szilárd táptalajon, sejtfall összetétel meghatározása fluoreszcens mikroszkópia és áramlási citometria segítségével, efflux folyamatok aktivitásának vizsgálata fluoreszcens jelölés segítségével, XTT redukciós próba a biofilm képzés meghatározására, teljes genom szekvenálás eredményének *in silico* analízise, *in vitro* fagocitózis vizsgálat

### **Molekuláris technikák**

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

### ***In vivo* vizsgálatok során használt módszerek**

Intravénás fertőzés végrehajtása egérmodellben, fertőzést követő élőcsíraszám meghatározás

### **Analitikai módszerek (kollaborációban)**

Szterol összetétel meghatározás LC-MS módszerrel, metabolomikai vizsgálatok (GC-MS), lipidomikai analízis (UHPLC-HRMS)

# Eredmények

## Rezisztens *C. auris* törzsek létrehozása

A mindhárom antifungális szer csoporttal szemben (poliének, azolok, echinocandinok) rezisztens törzseket mikroevolúciós eljárással hoztuk létre. Ehhez két gomba ellenes szerekre érzékeny *C. auris* klinikai izolátumok választottunk ki (0381, 0387). Ezen törzseket az egyes antimikotikumok emelkedő koncentrációját tartalmazó tápoldatban tenyésztettük, így létrehozva a rezisztens sejtek megjelenéséhez szükséges szelekciós nyomást. Ezzel a módszerrel a poliének közül amfotericin B-re, a triazolok csoportjából flukonazolra, posakonazolra és vorikonazolra, valamint az echinocandinok közé tartozó micafunginra nézve hoztunk létre rezisztens törzseket. Az előre meghatározott legmagasabb antifungális szer koncentráció elérését követően a létrehozott törzseket szelekciós nyomás nélkül tenyésztettük biztosítva a rezisztens fenotípus stabilizálódását.

## Amfotericin B rezisztens törzsek jellemzése

Az amfotericin B jelenlétében szelektált törzsek esetében nem alakult ki stabil rezisztencia a létrehozásukhoz felhasznált antimikotikummal szemben. A 0381 AMB<sup>ev</sup> törzs a kiindulási érzékeny izolátumhoz hasonló érzékenységi profilt

mutatott, míg a 0387 AMB<sup>ev0</sup> törzs esetén flukonazollal és vorikonazollal szemben keresztrezisztenciát azonosítottunk. Az utóbbi törzs növekedési képessége komplex tápoldatban elmaradt a kiindulási izolátumtól, illetve a sejtfal stresszt indukáló koffeinnel, valamint a membrán detergens SDS-el szemben is növekedett érzékenységet mutatott. A létrehozott törzsek *in vivo* intravénás egérfertőzési modellben a kiindulási klinikai izolátumhoz hasonló virulenciát mutattak. Míg a 0381 AMB<sup>ev0</sup> törzs esetén nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést, addig a 0387 AMB<sup>ev0</sup> kevésbé hatékonyan volt képes a vesék, illetve a szív kolonizálására.

### **Triazol rezisztens törzsek jellemzése**

A triazolok jelenlétében szelektált törzsek minden esetben rezisztensé váltak a létrehozásukhoz használt antifungális szerrel szemben. Emellett a 0381 FLU<sup>ev0</sup> keresztrezisztenciát mutatott vorikonazollal szemben, míg a 0381 VOR<sup>ev0</sup> flukonazollal szemben mutatott rezisztenciát. A 0381 POS<sup>ev0</sup> törzs mindhárom triazzal szemben elveszítette az érzékenységet. Hasonló eredményt kaptunk a 0387 FLU<sup>ev0</sup>, POS<sup>ev0</sup> és VOR<sup>ev0</sup> törzsek esetében is, azonban ezen törzsek az echinocandinok csoportjába tartozó caspofunginnal szemben is rezisztenciát mutattak, ami multi drog rezisztencia kialakulására utal.

A 0387 klinikai izolátumból létrehozott triazol rezisztens törzsek mindegyike megnövekedett osztódási rátát mutatott, azonban a maximális sejtkoncentrációt alacsonyabb sejtszám mellett érték el.

A 0381 POS<sup>evo</sup> általános érzékenységet mutatott mind a sejtfal károsító anyagokkal, mind a membrán detergensként alkalmazott SDS-szel szemben is. A membrán károsító ágensre a 0387 POS<sup>evo</sup> és VOR<sup>evo</sup> törzsek is érzékenyek voltak, illetve mindhárom 0387 klinikai izolátumból létrehozott törzs egységesen toleranciát mutatott a koffein jelenlétére. A membrán stresszre érzékeny törzsek esetében az ergoszterol koncentrációjának csökkenését tapasztaltuk, illetve ezen törzsek esetében egy korábban még *Candida* fajokban nem azonosított szterol származékot, portenszterolt detektáltunk. A triazolok hatásmechanizmusának megfelelően az azokkal történő kezelés hatására a membrán ergoszterol tartalma lecsökkent. A 0381 evolvált törzsek, illetve a 0387 FLU<sup>evo</sup> esetében az ergoszterol bioszintézis útvonal alternatív ágának aktiválódásával megjelent a toxikus hatással bíró 14-Me-ergosztadién-diól, valamint ehhez kapcsoltan a korábban a szintézis útvonalon még nem elhelyezett szterol származékot a stigmaszeront is azonosítottuk.

Az egyes sejtfal komponensek sejtfelszíni megjelenésének vizsgálata továbbá arra utal, hogy a 0387



POS<sup>evo</sup> és VOR<sup>evo</sup> esetében a mannán és a  $\beta$ -glükán mennyisége növekedett, illetve mindhárom törzs esetében szignifikánsan megnövekedett a kitin-oligomerekre specifikus fluoreszcens jelölés intenzitása.

Az evolvált törzsek efflux folyamatainak analízise arra utal, hogy a 0381 FLU<sup>evo</sup> és VOR<sup>evo</sup> esetében főként a Cdr1 transzporter, míg a 0387 triazol evolvált törzsek esetében az MFS transzporterek csoportjába tartozó Mdr1 és Tpo3 vehet részt a sejtek detoxifikációs folyamatiban. A 0381 törzsek esetében feltehetőleg a *TAC1b* génben bekövetkező pontmutációk tehetőek felelőssé a megváltozott efflux folyamatokért.

A teljes genom szekvenálás eredménye továbbá rámutatott, hogy a 0387 triazol evolvált törzsek egységesen pontmutációt hordoznak a cAMP függő protein kináz A (PKA) szignalizációs útvonal regulátorát kódoló *BCY1* génben. Ezen törzsek mind biofilm képző képességükben, mind rapamicin érzékenységükben eltérést mutattak a kiindulási izolátumhoz képest, ami arra utal, hogy a *BCY1* funkciója *C. auris* estében megegyezik a *Candida* nemzetség többi tagja esetében már leírtakkal, így közvetetten szerepet játszik az antifungális rezisztenciában. Emellett a 0387 POS<sup>evo</sup> törzsben a szterol bioszintézis útvonal egyik kulcsenzimét kódoló *ERG3* génben is pontmutációt azonosítottunk.

A triazol evolvált törzsekkel elvégzett *in vivo* vizsgálatok arra utaltak, hogy a 0381 izolátumból létrehozott rezisztens törzsek hatékonyabban képesek a máj és az agy kolonizációjára, míg a 0387 triazol evolvált törzsek esetén egységesen virulencia csökkenést tapasztaltunk.

### **Micafungin rezisztens törzsek jellemzése**

A 0381 MICA<sup>evo</sup> törzs mindhárom vizsgált echinocandin típusú szerrel (anidulafungin, caspofungin, micafungin) ellen rezisztenciát mutatott. A 0387 MICA<sup>evo</sup> az általános echinocandin rezisztencia mellett, keresztrezisztenciát mutatott traizolokkal szemben is, illetve az amfotericin B MIC értékeiben is növekedést tapasztaltunk. A kiterjedt rezisztencia ellenére a 0387 MICA<sup>evo</sup> nem mutatott jelentős érzékenységet a vizsgált abiotikus stresszorok jelenlétére, míg a 0381 MICA<sup>evo</sup> a sejtfal károsító kalkoffluor fehér (KF) és kongó vörös (KV) magasabb koncentrációira érzékenyebb volt a kiindulási izolátumnál.

Az áramlási citometriás mérések alapján mindkét micafungin jelenlétében szelektált törzsben a mannánok fokozottabb sejtfelszíni jelenlétét tapasztaltuk, míg a  $\beta$ -glükán aránya a két törzsben eltérő előjellel változott.

Mind a 0381, mind a 0387 MICA<sup>evo</sup> törzsek genom analízisének során pontmutációt azonosítottunk az *FKSI*

gében, ami az echinocandinok célenzimét, a 1,3- $\beta$ -D-glükán szintetázát kódolja. Ezen klasszikus echinocandin rezisztencia mechanizmus mellett számos további genom modifikációt azonosítottunk, melyek közül a 0387 MICA<sup>evo</sup> törzsben megjelenő *ERG3* mutáció köthető közvetlenül az antifungális rezisztenciához. Emellett ebben a törzsben a triazolokhoz hasonlóan aminosav cserét találtunk a *BCY1* génben, illetve a PKA útvonal katalitikus funkcióját ellátó Tpk2-t kódoló génben.

A széleskörű rezisztencia ellenére egyik micafungin szelektált törzs esetében sem tapasztaltunk virulencia csökkenést intravénás egér modellben. Ugyanakkor a 0381 MICA<sup>evo</sup> szignifikánsan hatékonyabban volt képes a vese, az agy és a szív kolonizációjára, míg a 0387 MICA<sup>evo</sup> estében magasabb CFU értékeket azonosítottunk az agyban és a szívben. Az agy magas szintű érintettsége miatt hosszabb távú fertőzés (7 nap, 15 nap és 30 nap) esetén is vizsgáltuk az evolált törzsek kolonizációs képességét. A detektált CFU értékek a vizsgált szervek fokozatos feltisztulására utaltak, azonban a 0387 MICA<sup>evo</sup> törzssel fertőzött kísérleti állatok esetében a szívben egy stabil perzisztáló gombasejt populáció jelenlétét azonosítottuk.

## Összefoglalás

1. Mikroevolúciós módszerrel két érzékeny kiindulási izolátumból kiindulva hoztunk létre amfotericin B-re, flukonazolra, posakonazolra, vorikonazolra és micafunginra nézve rezisztens törzseket
2. Jellemeztük a létrehozott törzsek antifungális szerekkel szembeni érzékenységét, általános növekedési képességet, stressztoleranciáját és sejtfal összetételét. Összefüggéseket azonosítottunk a szerzett antifungális rezisztencia és a törzsek éltképesége között.
3. Analizáltuk a triazol evolvált törzsek szterol összetételét, melynek során az ergosterol bioszintetikus útvonalon korábban még el nem helyezett szterol származékok jelenlétét azonosítottuk.
4. Vizsgáltuk egyes létrehozott törzsek genomikai, metabolomikai és lipidomikai sajátosságait. Számos az antifungális rezisztenciában közvetlenül (*ERG3*, *TAC1b*, *FKS1*) vagy közvetetten (*BCY1*, *TPK2*) szerepet játszó genomi változást találtunk.
5. *In vivo* kísérletek során bizonyítottuk, hogy *C. auris* esetében a rezisztencia kialakulása nem minden esetben jár együtt fitness változásra visszavezethető virulencia csökkenéssel.

## Referált folyóiratban megjelent közlemények

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. *Scientific reports* **IF (2018): 4,011**

Papp, C., **Bohner, F.**, Kocsis, K., Varga, M., Szekeres, A., Bodai, L., Willis, J. R., Gabaldón, T., Tóth, R., Nosanchuk, J. D., Vágvölgyi, C., & Gácsér, A. (2020). Triazole Evolution of *Candida parapsilosis* Results in Cross-Resistance to Other Antifungal Drugs, Influences Stress Responses, and Alters Virulence in an Antifungal Drug-Dependent Manner. *mSphere*, **IF (2020): 4,282**

**Bohner, F.**, Gácsér, A. & Toth, R. Epidemiological Attributes of *Candida* Species in Tropical Regions. (2021) *Curr Trop Med Rep.* **IF (2021): 0,876**

**Bohner, F.**, Papp, C., & Gácsér, A. (2022). The effect of antifungal resistance development on the virulence of *Candida* species. *FEMS yeast research* **IF (2022): 3,2**

**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**

**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: 22,869**

**MTMT azonosító: 10060352**