

DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

OPPORTUNISTA PATOGÉN *COCHLIOBOLUS* IZOLÁTUMOK JELLEMZÉSE

Krizsán Krisztina



**Témavezető:
Dr. Papp Tamás
Egyetemi docens**

Biológia Doktori Iskola

**Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi és Informatikai Kar
Mikrobiológiai Tanszék**

**Szeged
2012**

BEVEZETÉS

Az Ascomycota törzs, Pleosporales rendjébe sorolt *Cochliobolus* nemzetség tagjai elsősorban talajból és fűfélékről izolálható, melanizált hifákkal rendelkező gombák. A növényi kórokozóként ismert *Cochliobolus*-ok változatos másodlagos metabolitok termelésére képesek. A nemzetség anamorf alakjait a *Bipolaris* és a *Curvularia* nemzetségekbe sorolják.

Egyes fajok, mint a *B. australiensis*, *B. hawaiiensis*, *B. spicifera*, illetve a *Cu. lunata*, *Cu. brachyspora* és *Cu. senegaliensis*, gyakran izolálható melanizált gombák okozta megbetegedésekből (*phaeohyphomycosis*), gombák által kiváltott allergiás tünetekkel járó orrmelléküreg-gyulladásból és szaruhártyafekélyből (keratomikózis). Elsősorban a trópusi, szubtrópusi éghajlatú területeken fordulnak elő, de a globális felmelegedés következtében egyre több európai esetet is regisztrálnak. Gombaellenes szerekkel szembeni érzékenységüket tekintve a legelterjedtebb amfotericin B (AMB) csak nagy dózisban hatásos ellenük, itrakonazollal szemben viszont általában érzékenyek. Az antimikrobiális szerekkel szembeni vizsgálatok nagyrészt *Bipolaris* sp. szintjén meghatározott izolátumokkal történtek.

A *Cochliobolus* nemzetség tagjai aszkospórájuk morfológiája alapján könnyen elkülöníthetők a Pleosporaceae család többi tagjától, míg a *Bipolaris* és *Curvularia* nemzetségek a konídiumok alakja alapján különböztethetők meg. Azonban a klinikumban megjelenő *B. australiensis* és *B. spicifera*, a határozásban használt konídium méret, morfológia és szeptátság, illetve az ITS régió szekvenciájának vizsgálata alapján sem azonosíthatók egyértelműen.

A *Cochliobolus* nemzetség rendszertanát vizsgáló tanulmányok az ITS régió, *gpd*, *Brn1* és LSU szekvenciák filogenetikai elemzése alapján, két csoportot állapítanak meg a nemzetségben belül. A *Cochliobolus* 1 csoport kizárólag növénypatogén, tipikus hajlott konídiummal rendelkező *Bipolaris*-okat tartalmaz, míg a *Cochliobolus* 2 csoport foglalja magába a nem tipikus, rövidebb egyenes konídiumokkal rendelkező *Bipolaris* és *Curvularia* fajokat, valamint az általunk is vizsgált humán kórokozó *B. australiensis*-t, *B. hawaiiensis*-t és *B. spicifera*-t. A *Bipolaris* nemzetség humán fertőzésekből izolált tagjai esetén nem készült a fertőzés szempontjából jelentős extracelluláris enzimtermelés, illetve esetlegesen a fajazonosítást megkönnyítő szénasszimilációs spektrum felvételét célzó tanulmány.

CÉLKITŰZÉSEK

Kutatásunk célja az opportunistá patogén *B. australiensis*, *B. hawaiiensis* és *B. spicifera* fajok azonosításában használt karakterek vizsgálata és új molekuláris markerek

azonosítása, továbbá fiziológiai tulajdonságaik jellemzése és a nemzetség által termelt ophiobolinok antimikrobiális hatásának vizsgálata volt.

Ennek érdekében a következő célkitűzéseket fogalmaztuk meg:

1. A humánkórokozó *Cochliobolus* fajok azonosításában használt morfológiai markerek vizsgálata.
2. A humán keratomikózisból származó *Bipolaris*-ok megkülönböztetésére alkalmas molekuláris markerek azonosítása.
3. A humán keratomikózisból származó *Bipolaris* izolátumok filogenetikai analízise.
4. A humán kórokozó *Cochliobolus* izolátumok szénforrás hasznosítási spektruma.
5. A humán keratomikózisból származó izolátumok extracelluláris enzim termelésének vizsgálata.
6. A *Cochliobolus* izolátumok antifungális szerekkel szembeni érzékenységeinek vizsgálata.
7. Antifungális hatású vegyületek kombinációinak vizsgálata *Cochliobolus* izolátumokkal szemben.
8. A *Bipolaris* nemzetség tagjai által termelt ophiobolinok antimikrobiális hatása.

ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

DNS alapú technikák:

- Genomi DNS tisztítása
- Polimeráz láncreakció (PCR)
- DNS szekvenálás

Agaróz gélelektroforézis

Nukleotid szekvenciák elemzése:

- Nukleotid szekvenciák analízise (BLAST, FASTA)
- Nukleotid szekvenciák illesztése (Probalign)
- Filogenetikai analízis (MrBayes)

Szénasszimilációs tesztek Petri-csészén

Extracelluláris enzimaktivitás vizsgálat Petri-csészén

Antifungális érzékenységi tesztek 96 mintahelyes mikrotiter lemezen (hatóanyag kombinációknál Checkerboard-titrálás)

Analitikai módszerek:

- Spektrofotometriás mérések
- Nagyfelbontású folyadék kromatográfia (HPLC)
- Vékonyréteg kromatográfia (TLC)

Fény- és fluoreszcens mikroszkópos vizsgálatok

EREDMÉNYEK

A humánkórokozó *Cochliobolus* fajok azonosításában használt morfológiai markerek vizsgálata.

Felülvizsgáltuk a klinikai mintákból származó *Bipolaris* fajok azonosítása során használt konídium alak, hossz, szélesség és szeptumszám, mint morfológiai markerek

használhatóságát humán keratomikózisból és törzsgyűjteményből származó (CBS, BRIP) törzseken. Eredményeinket összevetettük az azonosítás alapjául szolgáló klinikai *Bipolaris*-ok azonosításával foglalkozó eddigi legalaposabb tanulmányban rögzített értékekkel (McGinnis 1986). Az általunk vizsgált izolátumok esetén a *Curvularia* nemzetség tagjai a konídium morfológia, a *B. hawaiiensis* izolátumok pedig a konídiumok mérete alapján megkülönböztethetők a többi fajtól, azonban a *B. australiensis* és *B. spicifera* törzsek sem a konídium mérete és alakja, sem a válaszfalak száma alapján nem különíthetők el egymástól.

A humán keratomikózisból származó *Bipolaris*-ok megkülönböztetésére alkalmas molekuláris markerek azonosítása

Megvizsgáltuk a humán keratomikózisból és törzsgyűjteményből származó *B. australiensis*, *B. hawaiiensis* és *B. spicifera* fajok szekvencia-alapú azonosításának lehetőségeit. A morfológiai vizsgálatok megerősítéseként használt rDNS köztes átíródó elválasztó régió (ITS) esetén mindhárom fajt elkülönítő differenciáló karaktert nem tudtunk azonosítani. Emiatt a klinikai azonosításban alkalmazott hasonlóság alapú keresés során, 98-100%-os egyezést kaptunk az opportunistá patogén *Bipolaris* fajokon kívül más, távolabbi rokon fajokkal is. Ezért vizsgáltuk a kalmodulin (*cmd*), transzlációs elongációs faktor *1a* (*tef*), tubulin (*tub*) és az rDNS intergénikus elválasztó régiójának szakaszait (IGS). A vizsgálatokban a *B. australiensis*, *B. hawaiiensis* és *B. spicifera* típus-törzseket jelöltük ki referenciatörzsnek, melyek alapján meghatároztuk a fajra jellemző eltéréseket. Az azonosított fajspecifikus eltérést mutató helyeket, a keratomikózisból származó izolátumokon és ahol rendelkezésre állt, génbanki szekvenciákon is teszteltük. Ezek alapján megállapítottuk, hogy a *cmd*, *tef* és *tub* szekvenciák nem hordoztak mindhárom faj azonosítására alkalmas motívumot, ezzel szemben az IGS régióban számos, mindhárom fajra jellemző megkülönböztető karaktert azonosítottunk. Ezért a humán kórokozó *Bipolaris* fajok azonosítására az IGS régiót javasoljuk, a referencia törzsekben meghatározott karakterek alapján.

A RAPD analízis használata is felvetődött a fajok elkülönítése során, melyben egyes indítószekvenciákkal szintén sikerült a fajokra jellemző mintázatokat azonosítani.

A humán keratomikózisból származó *Bipolaris* izolátumok filogenetikai analízise

A *B. australiensis* és *B. spicifera* morfológiai és molekuláris hasonlóságait látva, felvetődött a kérdés, hogy esetükben ténylegesen beszélhetünk-e két különálló fajról. Ennek eldöntése érdekében filogenetikai módszerekkel vizsgáltuk a *B. australiensis*, *B. hawaiiensis* és *B. spicifera* fajok rokoni kapcsolatait. Az ITS, *tef* és RAPD molekuláris mintázaton alapuló elemzés eredményeként többségében alacsony támogatottságú, politómiával terhelt filogramokat kaptunk. A legjobb eredményt az ITS + *tef* + *tub* + RAPD + IGS kombinált

adatmátrix Bayes-féle elemzése során kaptuk, melyben a dichotómikus elágazásokat hordozó filogramon, a *Curvularia* sp., *B. hawaiiensis*, *B. australiensis* és *B. spicifera* izolátumok is, jól elkülönülő csoportokat alkottak. Bár a filogramon két elkülönülő csoportot alkottak a *B. australiensis* és *B. spicifera* izolátumok, a morfológiai és fajspecifikus molekuláris karakterek vizsgálatának eredményei is arra engednek következtetni, hogy esetükben feltehetően egy faj két változatáról lehet szó.

A humán kórokozó *Cochliobolus* izolátumok szénforrás hasznosítási spektruma.

Munkánk során meghatároztuk a fiziológiai szempontból kevésbé jellemzett humán keratomikózisokból izolált *Bipolaris* és *Curvularia* törzsek, illetve törzsgyűjteményi izolátumok szénforrás hasznosítási spektrumát, a vegyületek okozta morfológiai és fiziológiai eltéréseket. A tesztelt vegyületeket az egyes izolátumok nagyon eltérően hasznosították, a hasznosítási spektrumok filogenetikai információt nem hordoztak.

A humán keratomikózisból származó *Cochliobolus* izolátumok extracelluláris enzim termelésének vizsgálata

Megvizsgáltuk a humán keratomikózisból és törzsgyűjteményből származó *Cochliobolus* izolátumok extracelluláris elasztáz, foszfolipáz, keratináz, lipáz és fehérjebontó enzim termelésének képességét. Az izolátumok mindegyike képes elasztáz és lipáz termelésére, melyek esetleges, a fertőzésben betöltött szerepét érdemes lenne további vizsgálatok tárgyává tenni. Foszfolipázt és proteinázt csak néhány izolátum termelt. Keratinolitikus aktivitást egy izolátumnál sem tudtunk kimutatni.

A *Cochliobolus* izolátumok antifungális szerekkel szembeni érzékenysége

A *Bipolaris* és *Curvularia* nemzetségek antifungális érzékenységevel több tanulmány is foglalkozott, azonban csak kevés fajszerű vizsgálat készült. Meghatároztuk az amfotericin B (AMB), natamicin, ekonazol, flukonazol (FLU), itrakonazol (ITR), ketokonazol (KET), klotrimazol (CLZ), mikonazol (MCZ) és terbinafin 90%-os gátlási koncentrációit a humán keratomikózisból és törzsgyűjteményből származó *B. australiensis*, *B. hawaiiensis* és *B. spicifera* izolátumokkal szemben. Az AMB általában magas dózis mellett tudta gátolni a gombák növekedését, azonban az ITR és egyes esetekben a CLZ és KET is nagyon hatásos volt. Emellett meghatároztuk az elsősorban koleszterinszint csökkentőként használt, de antifungális hatással is rendelkező atorvasztatin, fluvasztatin (FLV), lovasztatin, rozuvasztatin és szimvasztatin (SIM) minimális gátló koncentrációit (MIC) is az izolátumainkkal szemben. Leghatásosabbnak a FLV és SIM bizonyult a vegyületek közül.

Antifungális hatású vegyületek kombinációinak vizsgálata *Cochliobolus* izolátumokkal szemben

Teszteltük az AMB-sztatin, illetve FLU-, ITR-, KET- és MCZ-sztatin kombinációkat, hat választott izolátummal szemben. A leghatásosabbak az AMB-sztatin és FLU-sztatin kombinációk voltak. Szinergizmust ritkán, additív kölcsönhatást többször tapasztaltunk a FIC index és Abbott-formula alapján is, bár számos esetben a szinergizmushoz nagyon közeli értékekkel. Antagonizmust egy esetben sem tapasztaltunk.

A *Bipolaris* nemzetség tagjai által termelt ophiobolinok antimikrobiális hatása

Meghatároztuk a gombacsoportra jellemző és kis mennyiségben az opportunistáknak humán patogének fermentlevéből is kimutatható ophiobolin A és B antifungális hatását, a napjainkban használt gombaellenes szerek nagy részével szemben rezisztens járomspórás gombákkal szemben. Az ophiobolin A 3,125-12,5 µg/ml koncentráció tartományban, míg az ophiobolin B 25-50 µg/ml tartományban éri el a MIC értéket *Gilbertella*, *Micromucor*, *Mucor*, *Rhizomucor* és *Rhizopus* izolátumokkal szemben. Továbbá a *Mucor* és *Rhizopus* izolátumoknál, az ophiobolin A hatására bekövetkező abnormális hifamorfológiát, plazma kiáramlást, elágazó, sokszor szegmentált csíratömlő képzést figyeltünk meg. Az ophiobolin A hatását APOAF apoptózis detektáló kit és DAPI festéssel vizsgálva megállapítottuk, hogy a vegyület apoptotikus-jellegű folyamatok beindításával gátolja a gombák növekedését.

ÖSSZEFOGLALÁS

1. Megállapítottuk, hogy morfológiai alapon nem különíthetők el egymástól a *B. australiensis* és *B. spicifera* izolátumok.
2. A vizsgált DNS szakaszok közül az ITS, *cmd*, *tub* és *tef* szekvenciák nem alkalmasak a három klinikumban előforduló *Bipolaris* faj megkülönböztetésére. Erre a célra az IGS régió használatát javasoljuk a referencia törzsekben általunk meghatározott karakterek alapján.
3. A filogenetikai elemzések alapján is feltételezzük, hogy a *B. australiensis* és *B. spicifera* fajok valójában egy faj változatai.
4. Meghatároztuk a humán szaruhártyafekélyből származó izolátumok szénasszimilációs spektrumát. A vizsgálat filogenetikai információt nem hordozott.
5. Az extracelluláris enzimtermelés vizsgálatában mindegyik klinikai izolátum jó elasztáz és lipáz termelőnek bizonyult, továbbá néhány izolátumnál mértünk proteáz és foszfolipáz aktivitást is.
6. A vizsgált antifungális szerek közül az ITR majd KET és CLZ bizonyult a leghatékonyabbnak, az AMB csak nagy dózisban volt hatásos, míg FLU-ra több esetben is rezisztensek voltak a vizsgált izolátumok. Sztatinok közül a FLV és SIM gátolta leghatékonyabban a *Bipolaris*-okat.

7. A kombinációs vizsgálatokban az AMB-sztatin és FLU-sztatin kombinációk voltak a leghatékonyabbak. FLU-FLV kombinációkban szinergizmust is kimutattunk, de többségében additív kölcsönhatásokat tapasztaltunk.

8. Meghatároztuk az ophiobolin A és B MIC értékét egyes járomspórás gombákhoz tartozó izolátumokkal szemben. *Mucor* és *Rhizopus* izolátumok esetén megállapítottuk, hogy az ophiobolin A apoptotikus-jellegű folyamatokat indukál.

A DOLGOZAT ALAPJÁT KÉPEZŐ KÖZLEMÉNYEK

Folyóirat cikkek:

Krizsán K, Bencsik O, Nyilasi I, Galgóczy L, Vágvölgyi Cs, Papp T (2010) Effect of the sesterterpene-type metabolites, ophiobolin A and B, on zygomycetes fungi. *FEMS microbiol Lett* 313, 135-140 IF: 2.199

Nyilasi I, Kocsubé S, **Krizsán K**, Galgóczy L, Pesti M, Papp T, Vágvölgyi Cs (2010) *In vitro* synergistic interactions of the effects of various statins and azoles against some clinically important fungi. *FEMS Microbiol Lett* 307, 175-184 IF: 2.199

Konferencia összefoglalók, poszterek:

Krizsán K, Nagy G, Nagy G László, Papp T, Vágvölgyi Cs (2012) Sequence-based identification and evaluation of the phylogenetic relationships of opportunistic pathogenic *Bipolaris* species. *Mikológiai Közlemények, Clusiana* 51 (1), 104-105.

Krizsán K, Nagy G, Nagy G László, Tóth E, Papp T, Vágvölgyi Cs (2012) Molecular identification of clinically important *Bipolaris* species. 11th European Conference on Fungal Genetics. Marburg ECFG 2012, 2012, 30 March- 02 April, Marburg, Germany.

Krizsán K, Vallet GS, Lengyel A, Nyilasi I, Vágvölgyi Cs, Papp T (2011) Carbon assimilation spectrum of human pathogenic *Bipolaris* species. *Acta Microbiol Immunol Hung* 58, 177.

Krizsán K, Lengyel A, Nyilasi I, Papp T, Vágvölgyi Cs (2011) Susceptibility of three human pathogenic *Bipolaris* species to currently used antifungal agents. *Acta Microbiol Immunol Hung* 58, 176.

Krizsán K, Lengyel A, Fürtön H, Nyilasi I, Papp T, Vágvölgyi Cs (2010) Susceptibility of the human pathogenic species to various antifungal agents. 11th International Symposium Interdisciplinary Regional Research ISIRR 2010, 13-15 October, Szeged, Hungary, Abstracts

Krizsán K, Bencsik O, Vágvölgyi Cs, Papp T (2010) Antimicrobial effects of ophiobolin A. Central European Symposium on Industrial Microbiology and Microbial Ecology, Power of Microbes in Industry and Environment 2010, 22-25 September, Malinska, Croatia, Abstracts

Krizsán K, Vallet GS, Nyilasi I, Vágvölgyi Cs, Papp T (2010) Carbon source utilization of *Bipolaris* isolates. Central European Symposium on Industrial Microbiology and Microbial Ecology, Power of Microbes in Industry and Environment 2010, 22-25 September, Malinska, Croatia, Abstracts

Krizsán K, Bencsik O, Vágvölgyi Cs, Papp T (2010) Antifungal effects of ophiobolin. 2nd Central European Summer Course on Mycology CESC 2010, Biology of pathogenic fungi, 04-09 July, Szeged, Hungary, Abstracts

Krizsán K, Fürtön H, Papp T, Vágvölgyi Cs (2010) Molecular identification of human pathogen *Bipolaris* species. 2nd Central European Summer Course on Mycology CESC 2010, Biology of pathogenic fungi, 04-09 July Szeged, Hungary, Abstracts

Krizsán K, Nagy L, Fürtön H, Manikandan P, Narendran V, Revathi R, Raghavan A, Madhavan B, Vágvölgyi Cs, Papp T (2009) Characterization of *Bipolaris* isolates using

molecular and biochemical markers. *Acta Microbiol Immunol Hung* 56, 193.

Krizsán K, Bencsik O, Szekeres A, Vágvolgyi Cs, Papp T (2009) Antifungal effect of ophiobolins. *Acta Microbiol Immunol Hung* 56, 193-194.

Nyilasi I, Kocsubé S, **Krizsán K**, Galgóczy L, Vágvolgyi Cs, Papp T (2009) *In vitro* synergistic interactions between statins and various azole antifungals against some clinically important fungi. *Acta Microbiol Immunol Hung* 56, 218-219.

Krizsán K, Bencsik O, Szekeres A, Vágvolgyi Cs, Papp T (2009) Effect of ophiobolin A on opportunistic pathogen fungi. 11th Regional Conference on Environment and Health DKMT-2009, 15-16 May, Szeged, Hungary, Abstracts

Krizsán K, Papp T, Revathi R, Raghavan A, Narendran V, Madhavan B, Kredics L, Manikandan P, Vágvolgyi cs (2008) *Bipolaris* isolates from human keratomycoses. *Acta Microbiol Immunol Hung* 55, 212-213.

Linka B, **Krizsán K**, Papp T, Szekeres A, Vágvolgyi Cs (2007) Sensitivity of different *Zygomycetes* to the sesterterpene, ophiobolin A. *Acta Microbiol Immunol Hung* 54, 76-77.

Lukács Gy, **Krizsán K**, Papp T, Vágvolgyi Cs (2006) Comparison of *Bipolaris* isolates using molecular and biochemical markers. *Acta Microbiol Immunol Hung* 53, 311.

EGYÉB KÖZLEMÉNYEK:

Folyóiratcikkek:

Galgóczy L, Kovács L, **Krizsán K**, Papp T, Vágvolgyi Cs (2009) Inhibitory effect of cysteine and cysteine derivatives on germination of sporangiospores and hyphal growth of different *Zygomycetes*. *Mycopathologia* 168, 125-134. *IF: 1.652*

Nyilasi I, Papp T, Csernetics Á, **Krizsán K**, Nagy E, Vágvolgyi Cs (2008) High-affinity iron permease (*FTR1*) gene sequences-based molecular identification of clinically important *Zygomycetes*. *Clin Microbiol Inf* 14, 393-397. *IF: 2.980*

Konferencia összefoglalók, posztterek:

Galgóczy L, Kovács L, **Krizsán K**, Papp T, Vágvolgyi Cs (2009) Inhibitory effect of cysteine and cysteine derivatives on different *Zygomycetes*. *Acta Microbiol Immunol Hung* 56, 152.

Összesített impakt faktor: 9,604