

**DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI**

**AZ OPPORTUNISTA HUMÁNPATOGÉN *CANDIDA*  
*PARAPSILOSIS* ÉLESZTŐGOMBA ELLENI  
TERMÉSZETES ÉS ADAPTÍV IMMUNVÁLASZ  
VIZSGÁLATA**

**TÓTH ADÉL**

**TÉMAVEZETŐ:**

**DR. GÁCSER ATILA  
TUDOMÁNYOS FŐMUNKATÁRS**

**BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA**



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

**SZEGED  
2015**

## Bevezetés

Az invazív *Candida* fertőzés komoly egészségügyi problémát jelent napjainkban, amely főként a legyengült immunrendszerű betegeket veszélyezteti. Noha az invazív candidiasis leggyakoribb okozója a *C. albicans*, a nem-*albicans* fajok által kiváltott fertőzések előfordulási gyakorisága az utóbbi évtizedekben folyamatos növekedést mutat. A *C. parapsilosis* geográfiai régiótól függően a második vagy harmadik leggyakrabban izolált invazív candidiasist okozó faj a *C. albicans* után, jelenleg világszerte ezeknek a fertőzéseknek mintegy 17 %-áért felelős. Noha az utóbbi években intenzíven vizsgálják az invazív candidiasis patogenezisét, a tanulmányok túlnyomó többsége a *C. albicans* által kiváltott immunválasz kutatására irányul, míg a *C. parapsilosis* által okozott fertőzések immunológiai hátteréről jelenleg kevés ismeretünk van.

Munkánk során célunk a *C. parapsilosis* által kiváltott természetes és adaptív immunválasz néhány aspektusának jellemzése, illetve a *C. albicans* által indukált védekezési mechanizmusokkal való

összehasonlítása volt. Vizsgáltuk a *C. parapsilosis* és a *C. albicans* által indukált citokin termelést és T helper sejt polarizációt humán perifériás vérből származó mononukleáris sejtekben, valamint egyes mintázatfelismerő receptorok, illetve intracelluláris jelátvitelben részt vevő molekulák szerepét a *Candida* fajok által indukált gyulladásos válasz során. Részletesen vizsgáltuk továbbá a *C. parapsilosis* és a *C. albicans* által indukált inflammaszóma aktivációt humán THP-1 makrofágokban.

## **Alkalmazott módszerek**

### Sejttenyésztés, primer sejtek izolálása

- mononukleáris sejtek (PBMC) izolálása humán perifériás vérből
- makrofágok differenciálata mononukleáris sejtekből
- emlős sejtvonalak fenntartása/tenyésztése

### In vitro PBMC/makrofág stimuláció

- primer sejtek és sejtvonalak *in vitro* stimulációja különböző *Candida* törzsekkel

### Molekuláris technikák

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

### Immunológiai módszerek

- áramlási citometria
- intracelluláris citokin festés
- ELISA (enzimkött immunoszorbens próba)

### Egyéb módszerek

- reaktív oxigényök (ROS) termelés mérése
- lizoszómális katepszin B felszabadulás mérése
- laktát dehidrogenáz (LDH) aktivitás mérése

## **Eredmények**

### 1. Humán perifériás vérből izolált mononukleáris sejtek *C. parapsilosis* és *C. albicans* fertőzésre adott válaszreakciójának összehasonlítása

#### 1.1. A *C. parapsilosis* és a *C. albicans* által indukált T helper sejt polarizáció összehasonlítása

Először megvizsgáltuk a hővel elölt *C. parapsilosis* és *C. albicans* által indukált gyulladásos citokin termelést humán perifériás vérből izolált mononukleáris sejtekben. Azt tapasztaltuk, hogy a *C. parapsilosis*-szal stimulált sejtek hasonló mértékű TNF $\alpha$  és IL-6, valamint mintegy 20 %-kal alacsonyabb szintű IL-1 $\beta$  termelést mutattak a *C. albicans*-szal fertőzött sejtekhez képest. A Th sejt citokinek vizsgálata esetén azonban eredményeink azt mutatták, hogy a *C. parapsilosis* 48 óra elteltével szignifikánsan alacsonyabb IFN $\gamma$ , ugyanakkor magasabb IL-10 termelést indukált mononukleáris sejtekben, mint a *C. albicans*. Továbbá, a *C. parapsilosis* jelentősen kisebb mértékű IL-17 és IL-22 termelést váltott ki 7 napos

stimulációt követően. Intracelluláris citokin festést követő áramlási citometriás analízissel megerősítettük, hogy a *C. parapsilosis*-szal stimulált mintákban 7 nap elteltével alacsonyabb volt az IL-17 termelő CD4<sup>+</sup> Th sejtek aránya. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy míg a *C. albicans* fertőzés Th1/Th17-domináns T-sejt polarizációt indukál, *C. parapsilosis* fertőzés esetén ez az egyensúly Th2/Treg irányba tolódik el.

## 1.2. A *C. parapsilosis* immunológiai felismerésében szerepet játszó receptorok azonosítása

A továbbiakban megvizsgáltuk a Dectin-1, TLR4 és TLR2 receptorok szerepét a *C. parapsilosis* és a *C. albicans* által indukált citokin termelésben. A Dectin-1 receptor gátlása esetén mind a *C. parapsilosis*-szal, mind a *C. albicans*-szal stimulált mononukleáris sejtek jelentősen csökkent citokin (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IFN $\gamma$ ) termelést mutattak, jelezve, hogy ez a receptor mindkét faj felismerésében fontos szerepet játszik. Ugyanakkor, míg a TLR4 blokkolása nem volt hatással a mononukleáris sejtek citokin termelésére, eredményeink

alapján a TLR2 szerepet játszik az IL-1 $\beta$  és IL-6 indukciójában. Nem tapasztaltunk azonban jelentős különbséget a *C. parapsilosis*-szal és *C. albicans*-szal stimulált mononukleáris sejtek citokin termelésében a receptor blokkolók alkalmazása során (noha a Dectin-1 gátlása esetén a *C. parapsilosis*-szal stimulált mintákban valamivel nagyobb mértékben csökkent a TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 és IL-10 szintje a *C. albicans*-szal fertőzött sejtekhez viszonyítva), ami arra utal, hogy egyéb receptorok aktivációja lehet felelős a két faj által indukált citokin termelés különbségéért.

### 1.3. A *C. parapsilosis* felismerését követő intracelluláris jeltovábbítás elemeinek vizsgálata

A MAPK kaszkád mind a TLR-ek, mind a CLR-ek által indított jelátvitelben szerepet játszik, az egyes MAP kinázok szerepe a szignalizáció során azonban kevésbé tisztázott. Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy mind a három klasszikus MAP kináz (p38, ERK, JNK) gátlása jelentősen csökkentette mind a *C. parapsilosis*-szal, mind a *C. albicans*-szal stimulált mononukleáris sejtek citokin

(TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IFN $\gamma$ ) termelését, jelezve, hogy mindhárom enzim szerepet játszik a két *Candida* faj felismerését követő jelátvitelben. Továbbá, míg a p38 és ERK inhibíció a *C. parapsilosis*-szal stimulált minták citokin (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) termelését csökkentette nagyobb mértékben, a JNK gátlása a *C. albicans*-szal stimulált minták citokin szekréciójára volt nagyobb hatással. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az egyes MAP kinázok citokin indukcióban betöltött szerepe különbözik *C. parapsilosis* és *C. albicans* stimuláció esetén.

## 2. A *C. parapsilosis* és a *C. albicans* által indukált inflammaszóma aktiváció összehasonlítása

A mononukleáris sejtek élő *C. parapsilosis*-szal és *C. albicans*-szal történő stimulációja során azt tapasztaltuk, hogy míg mindkét faj azonos mértékben indukálta a TNF $\alpha$  és IL-6 termelést, a *C. parapsilosis* jelentősen alacsonyabb IL-1 $\beta$  szekréciót váltott ki, mint a *C. albicans*. A továbbiakban ennek a különbségnek a hátterében meghúzódó lehetséges mechanizmusokat



vizsgáltuk részletesen. Az IL-1 $\beta$  érett formájának kialakulása monocitákban és makrofágokban kaszpáz-1-, illetve inflammaszóma-aktiváció-függő. Míg monocitákban a kaszpáz-1 folyamatosan aktív, makrofágokban először a pro-kaspáz-1 hasítása szükséges az enzim aktivációjához. Kísérleteink során PMA-kezelt THP-1 makrofágokban vizsgáltuk a *C. parapsilosis* és a *C. albicans* által indukált inflammaszóma aktivációt. Azt tapasztaltuk, hogy a *C. parapsilosis* csak hosszú inkubáció után és viszonylag nagy sejtszám esetén indukálta az IL-1 $\beta$  szekréciót, ellentétben a *C. albicans*-szal, amely már néhány óra elteltével jelentős IL-1 $\beta$  termelést váltott ki. Noha *C. albicans* esetén a hifaképzésnek fontos szerepet tulajdonítanak az inflammaszóma aktiváció során, érdekes módon eredményeink szerint az IL-1 $\beta$  szekréció mértéke független volt a *C. parapsilosis* pseudohifák jelenlététől. Továbbá, nem tapasztaltunk különbséget a THP-1 makrofágokban az IL-1 $\beta$  mRNS és pro-IL-1 $\beta$  szintjében *C. parapsilosis* és *C. albicans* stimulációt követően, ami arra utal, hogy a csökkent IL-1 $\beta$  szekréció nem transzkripciós vagy translációs különbségek

eredménye, hanem a pro-IL-1 $\beta$  alacsony hatékonyságú aktivációjából adódik. Különböző inhibitorok alkalmazása segítségével kimutattuk, hogy mind a *C. parapsilosis*-szal, mind a *C. albicans*-szal stimulált THP-1 sejtekben hasonló módon képződik az érett IL-1 $\beta$ , és a folyamat kaszpáz-1-, kaszpáz-8-, Syk- és TLR4-függő. Az NLRP3 és ASC deficiens THP-1 sejtekkel folytatott kísérletek megerősítették, hogy az IL-1 $\beta$  szekréció mindkét faj esetén NLRP3 inflammaszóma aktiváció-függő. Az NLRP3 inflammaszóma aktivációjában szerepet játszó három legfontosabb mechanizmus a reaktív oxigéngyökök képződése, a katepszin B lizoszómából történő felszabadulása, illetve az intracelluláris K<sup>+</sup> koncentráció csökkenése. Eredményeink szerint az IL-1 $\beta$  szekréció mind *C. parapsilosis*, mind *C. albicans* stimulációt követően K<sup>+</sup>-efflux függőnek bizonyult, a katepszin B gátlása azonban nem volt hatással a THP-1 sejtek IL-1 $\beta$  termelésére, noha a *C. albicans* intenzívebb katepszin B felszabadulást indukált, mint a *C. parapsilosis*. Továbbá, a NADPH-oxidáz gátlása jelentősen csökkentette mind az intracelluláris pro-IL-1 $\beta$ , mind a szekretált IL-1 $\beta$  szintjét,

jelezve a ROS lehetséges szerepét az inflammaszóma aktivációban. Ezt erősíti az az eredményünk is, miszerint a *C. albicans* intenzív ROS termelést indukált THP-1 makrofágokban, míg a *C. parapsilosis* a fertőzés első négy órájában egyáltalán nem indukálta a reaktív oxigénradikálok képződését. Ezen túlmenően kimutattuk, hogy az inflammaszóma aktiváció *C. albicans* fertőzés esetén fagocitózis-függő, és a THP-1 sejtek szignifikánsan nagyobb mértékben fagocitálják a *C. albicans*, mint a *C. parapsilosis* sejtjeit. Eredményeink alapján úgy tűnik, hogy számos mechanizmus közrejátszik abban, hogy a *C. parapsilosis* alacsonyabb szintű IL-1 $\beta$  szekréciót indukál, mint a *C. albicans*.

## Összefoglalás

Kísérleteink során kimutattuk, hogy:

1. A *C. parapsilosis* a *C. albicans*-hoz hasonló mértékben indukálja a TNF $\alpha$  és IL-6, azonban szignifikánsan kisebb mértékben az IL-1 $\beta$  termelését mononukleáris sejtekben
2. Míg a *C. albicans* Th1/Th17 irányú polarizációt indukál mononukleáris sejtekben, *C. parapsilosis* fertőzés esetén az egyensúly Th2/Treg irányba tolódik el
3. A Dectin-1 receptor fontos szerepet játszik mind a *C. albicans*, mind a *C. parapsilosis* immunológiai felismerésében
4. A p38, ERK és JNK MAP kinázok fontos szerepet játszanak a *C. parapsilosis* és *C. albicans* által indukált citokin termelés indukációjában, az egyes kinázok szerepe azonban kismértékben különbözik *C. parapsilosis* és *C. albicans* fertőzés esetén
5. A *C. parapsilosis* szignifikánsan kisebb mértékű IL-1 $\beta$  szekréciót indukál THP-1 makrofágokban, mint a

- C. albicans*, ami a pro-IL-1 $\beta$  alacsony hatékonyságú hasításából adódik
6. A *C. parapsilosis* által indukált IL-1 $\beta$  termelés THP-1 makrofágokban kaszpáz-1, kaszpáz-8, Syk, TLR4, ASC és NLRP3-függő
  7. A *C. parapsilosis* által kiváltott IL-1 $\beta$  szekréció független a pszeudohifák jelenlététől
  8. A *C. albicans* szignifikánsan nagyobb mértékű ROS termelést és katepszin B felszabadulást indukál THP-1 makrofágokban, mint a *C. parapsilosis*
  9. A *C. parapsilosis* és *C. albicans* által indukált IL-1 $\beta$  termelés K<sup>+</sup> efflux és NADPH-oxidáz-függő, azonban független a katepszin B aktivitásától
  10. A THP-1 makrofágok szignifikánsan nagyobb mértékben fagocitálják a *C. albicans*, mint a *C. parapsilosis* sejtjeit

## Referált folyóiratban megjelent közlemények

- 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*
- Nemeth, T, **Toth, A**, Hamari, Z, Falus, A, Eder, K, Vagvolgyi, C, Guimaraes, A J, Nosanchuk, J D, Gacser, A (2014). "Transcriptome profile of the murine macrophage cell response to *Candida parapsilosis*." Fungal Genet Biol 65: 48-56. *IF: 3,262*
- 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*
- Grozer, Z, **Toth, A**, Toth, R, Kecskemeti, A, Vagvolgyi, C, Nosanchuk, J D, Szekeres, A, Gacser, A (2015). "*Candida parapsilosis* produces prostaglandins from exogenous arachidonic acid and OLE2 is not required for their synthesis." Virulence 6(1): 85-92. *IF: 3,319*
- Nemeth, T, **Toth, A**, Szenzenstein, J, Horvath, P, Nosanchuk, J D, Grozer, Z, Toth, R, Papp, C, Hamari, Z, Vagvolgyi, C, Gacser, A (2013). "Characterization of Virulence Properties in the *C. parapsilosis* Sensu Lato Species." PLoS One 8(7): e68704. *IF: 3,534*
- Pallagi, P, Balla, Z, Singh, A K, Dosa, S, Ivanyi, B, Kukor, Z, **Toth, A**, Riederer, B, Liu, Y, Engelhardt, R,

- Jarmay, K, Szabo, A, Janovszky, A, Perides, G, Venglovecz, V, Maleth, J, Wittmann, T, Takacs, T, Gray, M A, Gacser, A, Hegyi, P, Seidler, U, Rakonczay, Z, Jr. (2014). "The role of pancreatic ductal secretion in protection against acute pancreatitis in mice\*." Crit Care Med 42(3): e177-188. *IF: 6,147*
- Toth, R, **Toth, A**, Papp, C, Jankovics, F, Vagvolgyi, C, Alonso, M F, Bain, J M, Erwig, L P, Gacser, A (2014b). "Kinetic studies of *Candida parapsilosis* phagocytosis by macrophages and detection of intracellular survival mechanisms." Front Microbiol 5: 633. *IF: 3,941*
- Tako, M, **Toth, A**, L, G N, Krisch, J, Vagvolgyi, C, Papp, T (2010). "A new beta-glucosidase gene from the zygomycete fungus *Rhizomucor miehei*." Antonie Van Leeuwenhoek 97(1): 1-10. *IF: 1,673*

**Összesített impakt faktor: 30,973**

## Társszerzői nyilatkozat

Kijelentem, hogy Tóth Adél szerepe meghatározó jelentőségű volt a

**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

Nemeth, T, **Toth, A**, Hamari, Z, Falus, A, Eder, K, Vagvolgyi, C, Guimaraes, A J, Nosanchuk, J D, Gacser, A\* (2014). "Transcriptome profile of the murine macrophage cell response to *Candida parapsilosis*." Fungal Genet Biol 65: 48-56. *IF*: 3,262

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

.....

Dr. Gácser Attila