

DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**AZ OPPORTUNISTA HUMÁNPATOGÉN *CANDIDA*
PARAPSILOSIS PATOMECHANIZMUSÁNAK
MOLEKULÁRIS SZABÁLYOZOTTSÁGA**

TÓTH RENÁTA

TÉMAVEZETŐ:

**DR. GÁCSER ATILA
EGYETEMI DOCENS**

BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA



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

**SZEGED
2016**

Bevezetés

Az opportunista gombafertőzések egyik leggyakoribb kórokozói világszerte a *Candida* fajok. Jelentős problémát okoznak az általuk okozott nozokomiális fertőzések, amelyek leginkább a legyengült immunrendszerű betegek körében fordulnak elő. Ezen megbetegedések száma az utóbbi évtizedekben egyre inkább növekszik.

Bár a nemzetségben a leggyakrabban azonosított faj a *Candida albicans*, a *Candida parapsilosis* által kiváltott megbetegedések is egyre nagyobb számban fordulnak elő. A *C. parapsilosis* az intenzív osztályokon kezelt immunszupresszált állapotú betegek mellett, kifejezetten gyakran fordul elő az újszülöttek körében is.

A faj jellegzetességei közé tartozik, hogy horizontális terjedéséből adódóan képes biofilmet képezni különböző orvosi eszközökön, könnyen szaporodik magas lipid és glükóz tartalmú tápanyagforrásokon és izolátumai körében előfordul az echinocandin típusú gombaellenes szerekkel szembeni rezisztencia is.

A *Candida* nemzetségben a *C. albicans* fertőzőképessége a leginkább tanulmányozott. Azonban a *C. parapsilosis* virulenciájáról, az azt meghatározó faktorokról és azok szabályozottságáról keveset tudunk.

Munkánk során célunk volt olyan *C. parapsilosis* szabályozó gének beazonosítása, amelyek a gomba fertőzőképességét befolyásolhatják. Ennek vizsgálatát egy deléciós mutáns könyvtár létrehozásával és annak tesztelésével terveztük megvalósítani. Ez lehetővé tette olyan gének beazonosítását, amelyek a gomba fertőzőképességét valamilyen módon befolyásolhatják.

Módszerek

Kísérletekben használt sejtek tenyésztése:

Élesztő és *E. coli* sejtek fenntartása, tenyésztése, kompetens sejtek előállítása és transzformálása

Molekuláris technikák:

DNS és RNS izolálás élesztőből, cDNS szintézis, PCR, qRT-PCR, célzott génkiütés élesztőből, molekuláris klónozás Gateway rendszerrel, bakteriális plazmid izolálás, gélelektroforézis

Deléciós könyvtár jellemzése során alkalmazott módszerek:

Életképesség komplex és minimál táptalajokon, oxidatív, sejtfal és sejtmembrán stresszel szembeni válasz vizsgálata, másodlagos morfológia váltás szérumban jelenlétében (mikroszkópos vizsgálat), biofilmképzés (MTT metabolikus aktivitás mérés) és antifungális szerekkel szembeni érzékenység tesztelése (mikrodilúciós módszer)

Egyéb módszerek:

Sejtfal festés fluoreszcens festékekkel – fluoreszcens mikroszkópia

In silico fehérje térszerkezeti analízis

In vivo virulencia vizsgálatok (*Galleria mellonella*)

Eredmények

A *C. parapsilosis* fertőzőképességét befolyásoló gének azonosítása és egy deléciós könyvtár létrehozása

Munkánkat megelőzően laboratóriumunkban egy célzott megközelítési módszert alkalmaztunk annak érdekében, hogy a *C. parapsilosis* fertőzőképességében részt vevő géneket beazonosítsuk. Ennek során, a gazda-patogén kölcsönhatást követően megvizsgáltuk a gomba teljes génexpressziós profilját (RNS szekvenálás). Az itt megemelkedett expressziót mutatott gének közül a transzkripciós faktorokra és protein kinázokra mint a fertőzőképességet szabályozó faktorokra összpontosítottunk. Ezeken kívül további olyan géneket is kiválasztottunk, amelyekről szintén feltételeztük, hogy a gomba virulenciáját szabályozhatják. Ezeknek a vizsgálatát a genomból történő eltávolításukon keresztül kapott homozigóta deléciós mutáns törzsek jellemzésével végeztük el. A gének egyenkénti eltávolítását a fúziós PCR-rel létrehozott konstrukciók segítségével, auxotrófia komplementációval végeztük el. Így előállítottunk egy 30 génre nézve deléciós mutáns könyvtárat génenként 2-2 független párhuzamossal.

A deléciós könyvtár széles körű vizsgálata

A mutáns könyvtár jellemzése során megvizsgáltuk az egyes törzsek életképességét komplex és különbözőképpen kiegészített minimál táptalajos közegekben. Teszteltük továbbá a törzsek választását különböző sejtfal (kongó vörös, kalkofluor fehér, koffein, higromicin B), sejtmembrán (SDS) és oxidatív (H_2O_2) stresszorok jelenlétében és

megvizsgáltuk az egyes törzsek morfológia váltásában és biofilm képzésében bekövetkező változásokat is. Emellett teszteltük a törzsek antifungális szerekkel szembeni érzékenységét is.

Eredményeink alapján a 30 létrehozott null mutáns közül 9 törzs mutatott csökkent életképességet, 14 törzs megváltozott ellenállóképességet oxidatív, sejtfal és/vagy sejtmembrán stresszor jelenlétében, és 7 törzsnek változott meg az antifungális szerekkel szembeni érzékenysége a vad típusú törzshöz képest. A deléciós könyvtár 3 tagja esetén változott meg azok másodlagos morfológiája, amelyek közül 1 kizárólag élesztő, míg további 2 rendellenesen megnyúlt hosszú pseudohifákat képzett. A teljes kollekció biofilm képzésének vizsgálata során szintén 3 törzs mutatott megváltozott fenotípust, amelyek közül 2 a legkevésbé, míg 1 sokkal hatékonyabban volt képes annak képzésére a referencia törzshöz képest. Kísérleteink alapján azt tapasztaltuk, hogy az itt beazonosított gének közül számos pleitrop hatással rendelkezik, mivel azok deléciója egyszerre kettő vagy több egymástól független fenotípus létrejöttét eredményezte.

Összesítve, a 30 deléciós törzs közül 17 esetben változott meg azok fenotípusa a vad típushoz képest. Mivel az alkalmazott kondíciók mindegyike befolyással rendelkezik a gomba fertőzőképessége felett, ezért elmondható, hogy az itt beazonosított gének legalább fele hozzájárul a *C. parapsilosis* fertőzőképességének kialakításához és fenntartásához.

A deléciós mutáns könyvtár átfogó jellemzése után kiemelt *C. parapsilosis* mutáns törzsek és azok további vizsgálatai

A továbbiakban olyan *C. parapsilosis* gének pontos szerepét határoztuk meg, amelyeket a gazda-patogén kölcsönhatást követően azonosítottunk be és amelyek eltávolítása a legtöbb rendellenes fenotípus megjelenését okozta.

A vasfelvételt és az alternatív szénforrás hasznosítását szabályozó *Cpar2_100540* transzkripciós faktor

A mutáns könyvtár tesztelése során a *CPAR2_100540Δ/Δ* deléciós törzs jellegzetességei közé tartozott annak érzékenysége a lúgos kémhatású közegre és az oxidatív stresszor jelenlétére. A gén legközelebbi ortológja (*C. albicans HAP5*) bizonyítottan részt vesz az alternatív szénforrások hasznosításában és a vasfelvétel szabályozásában.

A vasfelvétel lúgos közegben és vashiányos közegben is vas redukáló –pl. az Frp1- segítségével történik. *C. albicans*-ban az Frp1 egyik szabályozója a *HAP5* gén, amelynek hiányában a vas redukáló expressziója jelentősen lecsökken és a mutáns törzs növekedési rendellenességet mutat bázikus kémhatású közegben és vashiányos közegben is. Kísérleteink során, a *CPAR2_100540Δ/Δ* deléciós törzs csökkent növekedési képességet mutatott mindkét típusú közegben. Emellett a génexpressziós vizsgálatokat követően a deléciós törzsben mindkét közeg alkalmazásakor csökkent *FRP1* expressziót tapasztaltunk. Tehát az *CPAR2_100540* a *C. albicans HAP5*-höz hasonló módon végezheti a vasfelvétel szabályozását.

Azok a törzsek, amelyek nem képesek alternatív szénforrások hasznosítására általában a légzési láncot érintő valamilyen rendellenességgel rendelkeznek. *S. cerevisiae*-ben és *C. albicans*-ban a Hap5 a mitokondriális légzési lánc citokróm-c (CYC) és citokróm-c oxidáz (COX) gének expressziójának befolyásolásán keresztül végzi az alternatív szénforrások hasznosításának szabályozását. Azonban a két fajban a szabályozás ellentétes. Míg *S. cerevisiae*-ben a *hap5Δ/Δ* mutáns törzsekben az effektor gének expressziója lecsökken, addig *C. albicans*-ban megemelkedik. Kísérleteinkben a *CPAR2_100540Δ/Δ* mutáns törzs csökkent növekedést mutatott laktát és aminosavak -mint alternatív szénforrások- jelenlétében is. Emellett a génexpressziós analíziseket követően pedig megemelkedett *CYC1* és *COX4* expressziót detektáltunk. Tehát a *CPAR2_100540* részt vesz az alternatív szénforrások hasznosításában is, amelyet - a *C. albicans* HAP5-höz hasonlóan – a légzési lánc bizonyos elemeinek szabályozásán keresztül végezhet.

A továbbiakban elvégzett virulencia vizsgálatok alapján elmondható, hogy a mutáns törzs fertőzőképessége lecsökkent, tehát a *CPAR2_100540* gén szükséges lehet a *C. parapsilosis* fertőzőképességének kialakításához.

A másodlagos morfológia váltás szabályozását befolyásoló Cpar2_200390 transzkripció faktor

A *CPAR2_200390Δ/Δ* mutáns törzs jellegzetessége, hogy rendellenesen megnyúlt, pehelyszerűen aggregálódó másodlagos morfológiával rendelkezett. A gén legközelebbi ortológja a *S. cerevisiae*-ben és *C. albicans*-ban is leírt *SPT3* gén, ami mindkét fajban

a morfológia váltás szabályozását végzi. A szabályozás ezúttal is ellentétes, mivel a gén eltávolítása *S. cerevisiae*-ben kizárólag élesztő formák jelenlétét, míg *C. albicans*-ban - több egyéb fenotípusos rendellenesség mellett - hiperfilamentáló fenotípust mutatott. A *CPAR2_200390* gén eltávolítását követően kapott fenotípus profil teljesen megegyezett a *C. albicans*-ban korábban tapasztalt fenotípusokkal, tehát a gén az *SPT3*-hoz hasonlóan végezheti a morfológia váltás szabályozását.

A *CPAR2_200390Δ/Δ* további vizsgálatai során sejtfal stresszorról szembeni rezisztenciát is tapasztaltunk. A mutáns törzs sejtfalának fluoreszcens festékekkel történő vizsgálatát követően a mutáns sejtekben megemelkedett össz-kitin és kitin oligomer koncentrációt detektáltuk. Mindezek mellett a génexpressziós analízisek során a deléciós törzs megváltozott kitináz és kitin szintáz génexpressziót is mutatott, ami alapján azt feltételeztük, hogy a törzsben felborult a kitin bioszintézis.

A továbbiakban elvégzett fertőzőképességet tesztelő vizsgálatok alapján ezen mutáns törzs virulenciája is csökkent a referencia törzshöz képest, tehát az itt beazonosított gén is szükséges lehet a fertőzés kialakításához.

A biofilmképzés szabályozásában résztvevő Cpar2_602840 transzkripciós faktor

A *CPAR2_602840* gén legfőbb jellegzetessége, hogy annak eltávolításakor a mutáns törzs esetében hatékonyabb biofilmképzés következett be. A gén egyik közeli ortológját sem hozták eddig

összefüggésbe biofilmképzéssel, tehát az itt beazonosított gén *C. parapsilosis*-ban egyedülálló funkcióval bírhat. Kísérleteinkben a mutáns törzsben megvizsgáltuk minden ezidáig ismert biofilmképzést befolyásoló gén kifejeződését, ami eredményeként azt tapasztaltuk, hogy azok expressziója jelentősen megemelkedett. Ez arra utalt, hogy az itt beazonosított transzkripciós faktor *C. parapsilosis*-ban a biofilmképzés egy mester regulátora lehet. Emellett a mutáns sejtek sejtfalának vizsgálatakor jelentősen megemelkedett mannóz tartalmat is detektáltunk, ami a hiper-biofilm képző fenotípus egyik eredménye lehet.

A továbbiakban a törzs virulencia vizsgálatai során mérsékelten csökkent fertőzőképességet tapasztaltunk. A jövőben a mutáns törzset egy olyan modellrendszerben teszteljük majd, ami a biofilm képzés élettani vizsgálatának valódi modellje: ez a patkány vénás katéter.

A hőszénitívítást befolyásoló Cpar2_303700 kináz

A *CPAR2_303700Δ/Δ* deléciós törzs vizsgálatainkban jelentős mértékű szénitívítást mutatott a megváltozott hőmérsékleti viszonyokra. További jellegzetesség a növekedési rendellenesség és nagyfokú érzékenység az oxidatív stresszor jelenlétére. A gén legközelebbi ortológja a *S. cerevisiae*-ben korábban leírt *CGI121* - a konzervált KEOPS/EKC komplex tagja -, ami a telomer fenntartás szabályozásában vesz részt.

Az alacsony szekvencia azonosság miatt azonban elvégeztük a Cpar2_303700 és a Cgi121 fehérjék *in silico* térszerkezeti analízisét. Eredményként a két fehérje harmadlagos szerkezete között nagyfokú

hasonlóságot találtunk. További bizonyítékként megvizsgáltuk, hogy a Cpar2_303700 képes-e kölcsönhatni a Cgi121 legközelebbi kölcsönható partnerével, a Bud32 fehérjével. Eredményeink alapján a Cpar2_303700 és a Bud32 között, az eredeti konformációhoz hasonlóan, *in silico* stabil kölcsönhatás jött létre. Tehát az itt beazonosított fehérje és a Cgi121 egymáshoz hasonló proteinek lehetnek.

A *CGI121* deléciója során péklesztőben olyan fenotípusok menekítését tapasztalták, amelyek a telomer defekt következtében jöttek létre (oxidatív stresszor- és hőszenzitivitás, illetve növekedési defekt). Vizsgálataink során a *CPAR2_303700Δ/Δ* deléciója ugyanezeknek a fenotípusoknak a megjelenését okozta. Ez alapján ellentétes szabályozó mechanizmusokat feltételezhetünk. Ennek alátámasztásához később további kísérleteket tervezünk.

A továbbiakban a mutáns törzs virulencia vizsgálatai során ismételten csökkent fertőzőképességet tapasztaltunk, ami arra utalhat hogy a Cpar2_303700 szükséges lehet a gomba fertőzőképességéhez. Ismereteink szerint ez az első alkalom, hogy a KEOPS/EKC komplex összefüggésbe hozható egy patogén faj fertőzőképességével.

Összefoglalás

1. Munkánk eredményeként létrehoztunk egy 30 különböző génre nézve homozigóta deléciós mutáns könyvtárat, génenként 2-2 párhuzamossal.
2. Az egyes törzsek széles körű vizsgálatára során a teljes mutáns kollekciónak mintegy 57%-ánál tapasztaltunk megváltozott fenotípust a vad típusú törzshöz képest, tehát a beazonosított gének több mint fele részt vehet a gomba fertőzőképességében.
 - Ezek közül a vizsgált mutáns törzsek 30%-a mutatott csökkent életképességet YPD komplex, és/vagy különbözőképpen kiegészített minimál táptalajos közegben,
 - a deléciós könyvtár közel fele (47%) esetén változott meg az egyes oxidatív, sejtfal és sejtmembrán stresszorok jelenlétére adott válasz,
 - a mutáns kollekciónak 10%-nál detektáltunk megváltozott másodlagos morfológiát,
 - a vizsgált törzsek további 10%-a esetén tapasztaltunk biofilm képzési rendellenességet,
 - és végül, a törzsek kb. 23%-a mutatott megváltozott érzékenységet flukonazollal és / vagy kaszporfungin – diacetáttal szemben a vad típusú törzshöz viszonyítva.
3. Munkánk során sikeresen beazonosítottunk négy olyan *C. parapsilosis* szabályozó faktort kódoló gént, amelyek a gazda-

patogén kölcsönhatásban aktívan részt vesznek és a gomba fertőzőképességét számottevően befolyásolják.

- A *CPAR2_100540* által kódolt transzkripciós faktor (TF) a fertőzés során feltehetőleg a vasfelvételt befolyásolja egy vas reduktáz – az *FRP1* - szabályozásán keresztül, és az alternatív szénforrások hasznosításában is részt vehet, feltehetően a légzési lánc bizonyos elemeinek (*CYC*, *COX* gének) szabályozása révén.
- A *CPAR2_200390* által meghatározott TF a gomba másodlagos morfológia váltásának negatív regulátora és feltehetőleg a kitin szintáz és kitináz kódoló gének expressziójának szabályozásán keresztül befolyásolja a sejtfal kitin összetételét, így a gazda általi felismerést is.
- A *CPAR2_303700* által meghatározott protein kináz a gomba életképességét befolyásolhatja, aminek feltehetően szerepe lehet a gazdaszervezetben uralkodó környezeti viszonyokhoz (hőmérséklet és oxidatív stressz) való alkalmazkodásban.
- A *CPAR2_602840* által kódolt TF a *C. parapsilosis* biofilmképzésének egy mester regulátora lehet, ami befolyásolja a gomba sejtfal mannóz tartalmát, így annak immunsejtek általi felismerését is.
- A *G. mellonella* modellorganizmussal elvégzett *in vivo* kísérletek alapján, az itt beazonosított szabályozó faktorok mindegyike szükséges a gomba fertőzőképességének kialakításához.

Referált folyóiratban megjelent közlemények

Elsőszerzős közlemények:

Tóth, R., Toth, A., Papp, C., Jankovics, F., Vagvolgyi, C., Alonso, M.F., Bain, J.M., Erwig, L.P., and Gacser, A. (2014). Kinetic studies of *Candida parapsilosis* phagocytosis by macrophages and detection of intracellular survival mechanisms. *Front Microbiol* 5, 633.

IF: 3,989

Tóth, R., Alonso, M.F., Bain, J.M., Vagvolgyi, C., Erwig, L.P., and Gacser, A. (2015). Different *Candida parapsilosis* clinical isolates and lipase deficient strain trigger an altered cellular immune response. *Front Microbiol* 6, 1102.

IF: 4,165

Tóth, R., Toth, A., Vagvolgyi, C., and Gacser, A. (2016). *Candida parapsilosis* secreted lipase as an important virulence factor. *Curr Protein Pept Sci*.

IF: 2,441

Társszerzős közlemények:

Németh, T., Toth, A., Szenzenstein, J., Horvath, P., Nosanchuk, J.D., Grozer, Z., **Toth, R.,** Papp, C., Hamari, Z., Vagvolgyi, C., and Gacser, A. (2013). Characterization of virulence properties in the *C. parapsilosis sensu lato* species. *PLoS One* 8, e68704.

IF: 3,534

Grozer, Z., Toth, A., **Toth, R.,** Kecskemeti, A., Vagvolgyi, C., Nosanchuk, J.D., Szekeres, A., and Gacser, A. (2015). *Candida parapsilosis* produces prostaglandins from exogenous arachidonic acid and *OLE2* is not required for their synthesis. *Virulence* 6, 85-92.

IF: 5,418

Perez-Garcia, L.A., Csonka, K., Flores-Carreón, A., Estrada-Mata, E., Mellado-Mojica, E., Nemeth, T., Lopez-Ramirez, L.A., **Toth, R.,** Lopez, M.G., Vizler, C., *et al.* (2016). Role of Protein Glycosylation in *Candida parapsilosis* Cell Wall Integrity and Host Interaction. *Front Microbiol* 7, 306.

IF: 4,165

Összesített impakt faktor: 23,712