

Válasz Prof. Dr. Pócsi István az MTA doktora opponensi véleményére

Mindenekelőtt szeretném köszönetemet kifejezni Prof. Dr. Pócsi Istvánnak az MTA doktori értekezésem igen alapos bírálataért.

Köszönöm, hogy a benyújtott értekezésemet tudományos szempontból megalapozottnak ítéli, alkalmasnak tartja az MTA doktora cím megszerzéshez és nyilvános védésre javasolta.

Kritikai megjegyzéseivel egyetértek, a magyar szaknyelv pontosabb használatára törekedni fogok. Valóban helyesebb a *Candida parapsilosis* fertőzések patogenezisééről és patomechanizmusairól beszélni, illetve a Sap-ok esetében, ahogyan bírálóm rámutatott a proteázok kifejezés a helyes. Az „apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD” molekula helyesebb magyar megfelelője talán az „apoptosis-kapcsolt CARD-domént hordozó fehérje” lehetne. Egyetértek és megfogadom bírálóm ábraszerkesztéssel kapcsolatos kritikáit. Köszönöm továbbá dicsérő szavait a dolgozatban bemutatott további terveinkkel kapcsolatban, amelyekről válaszaiban néhány részletet ismertetni is fogok.

A bírálóban megfogalmazott kérdésekre a következőkben válaszolok:

1. A *C. parapsilosis* esetében a lipáz és proteináz gének száma jóval kisebb, mint a *C. albicans* esetében. A genomanalízisek eredményeinek ismeretében várható-e a *C. parapsilosis* hidroláz gének számának és ezáltal a mikroba patogenitásának a növekedése (lásd a SAPP1 gén duplikációját), vagy éppen, a *Candida dubliniensis*-hez hasonlóan (Jackson és munkatársai, 2009, PMID: 19745113; Moran és munkatársai, 2011 és 2012, PMID: 21076011 és 21904553), pszeudogének kialakulása és génvesztés révén a virulencia csökkenése, továbbá bizonyos anatómiai nichekhez (Moran és munkatársai, 2012, PMID: 21904553) és korcsoportokhoz (lásd pl. a nagyon kis súllyal született újszülötteket, 19. oldal) történő adaptáció zajlik? Ez a mikrobiális evolúciobiológiai megközelítés kiegészíthetné az újszülöttek immunrendszerének a sajátosságain (pl. Th2/Th17 dominancia) alapuló elgondolásokat (lásd a 84. oldalon). Ugyanezt a kérdést szeretném feltenni a *C. metapsilosis*, *C. orthopsilosis* és *C. parapsilosis* fajok vonatkozásában is (77. oldal).

Bírálom egy nagyon érdekes és számos szempontból nehezen megválaszolható kérdést feszeget. Bennünk is felmerült az ún. „patogén-evolúció” kérdése és ezért néhány évvel ezelőtt, azóta is gyümölcsöző, kollaborációt építettünk ki Prof. Toni Gabaldon (Center for Genomic Regulation, Barcelona, Spanyolország) munkacsoportjával. Első lépésként *C. parapsilosis* klinikai és környezeti izolátumok teljes genom szekvenciáit határoztuk meg¹. Célunk az volt, hogy összehasonlítsuk a különböző környezeti viszonyokból izolált törzsek genomját és esetleges különbségeket azonosítsunk. A viszonylag kis mintaszám ellenére, több érdekes megfigyelést tettünk. Egyrészt eredményeink cáfolni látszanak azt, az eddig általánosan elfogadott nézetet, miszerint a *C. parapsilosis* klinikai izolátumok, mintegy egymás klónjai lennének, ugyanis a genomelemzések valószínűsíthető rekombinációs és hibridizációs eseményekre utaltak. Ez tehát arra utal, hogy egymástól függetlenül, többször is kialakulhattak humánpatogén vonalak a *C. parapsilosis* fajon belül. Érdekes megfigyelésünk volt az, hogy a genomok összehasonlítása során bizonyos gének sokszorozódása volt megfigyelhető a környezeti izolátumok esetében, amely nem volt jellemző a klinikai izolátumokra. Az arzén transzporter gének feldúsulása például kapcsolatban lehet a nem klinikai környezethez történő adaptációval. Ha a bírálóm által említett szekretált enzimek génjeit tekintjük, akkor egyértelműen látható a gének számának növekedése *C. albicans* esetében, amely összefüggésben lehet a virulencia növekedésével. Elméletünk szerint, az emberi környezethez történő adaptáció (elsősorban a különböző tápanyagokhoz, hipoxiás körülményekhez, illetve az immunrendszer védelmi mechanizmusaihoz) a hajtóereje ennek a folyamatnak. A továbbiakban vizsgáltuk a *C. parapsilosis sensu lato* fajcsoportba tartozó, a klinikumban szintén viszonylag gyakran előforduló faj a *C. orthopsilosis* genomját² és megállapítottuk, hogy az általunk vizsgált törzs nagy valószínűséggel egy hibridizációs eseményt követően alakult ki. Ez az eredmény arra utalt, hogy az emberi környezethez történő alkalmazkodás egyik eszköze lehet a sejtek közötti hibridizációs esemény. *C. orthopsilosis* esetében azt is megállapítottuk, hogy ez a hibridizáció nagy valószínűséggel két egymástól jelentősen eltérő genommal rendelkező szülő (ún. típus 1 és típus 2) között zajlott le. Ez a megfigyelés azért is nagyon izgalmas mert felveti annak lehetőségét, hogy egy környezethez történő alkalmazkodás során a viszonylag lassú adaptációs (evolúciós) folyamatok mellett egy sokkal gyorsabb esemény is lejátszódhat. Így bizonyos tulajdonságok megszerzése jelentősen rövidebb idő alatt válik lehetségessé, illetve a bírálóm által említett számbeli változások is könnyebben lezajlanak bizonyos gének esetében. Ezt a hibridizációs elméletet azóta tovább erősítette legújabb közös publikációnk Toni Gabaldonnal,

ahol 11 *C. metapsilosis* klinikai izolátum teljes genom szekvenciáját határoztuk meg³. Eredményeink arra utalnak, hogy minden esetben egy erősen heterozigota hibrid genomról van szó, ráadásul mind a 11 izolátum esetében azonos hibridizációs esemény feltételezhető ugyanazon szülői törzsek között, annak ellenére, hogy az izolátumok különböző földrajzi régiókból származtak. Bizonyítottuk, hogy a hibrid genom diploid, ráadásul eredményeink feltételezik azt is hogy “mating” útján jöhetett létre a múltban. Ezek az eredményeink és a most is folyamatban lévő projektekből származó adatok tehát jelentősen átértékelhetik a patogénné válásról eddig alkotott elképzeléseinket, illetve átrendezhetik az egyes fajok között eddig megállapított határokat.

2. A lipáz deficiens sejtek szaporodása nagy lipidtartalmú tápközegben lassabb, mint a vad típusú sejteké (49. oldal; Gácsér és munkatársai, 2007, PMID: 17853941). Bár a SAPP1 hiányos mutáns törzsek 20 % hővel inaktivált humán szérumot tartalmazó PBS-ben a vad típushoz hasonló sejtszám növekedést mutattak (27. ábra a 70. oldalon; Horváth és munkatársai, 2012, PMID: 22301631) más tenyésztési körülmények között, pl. eltérő fehérjeforrások jelenlétében, eltérő (lassabb) szaporodás ebben az esetben is lehetséges. Ennek megvizsgálását mindenképpen javasolni szeretném. Felvetődik ugyanis az a kérdés, hogy mivel a lassú szaporodás önmagában is globális transzkriptom és metabolikus változásokat vált ki Saccharomyces cerevisiae élesztőben (Lu és munkatársai, 2009, PMID: 19056679; Slavov és munkatársai, 2012, PMID: 22456505) vajon az észlelt fenotípusok legalábbis egy része nem a C. parapsilosis mutánsok lassabb szaporodásának tulajdonítható-e az adott körülmények között a deletált hidroláz(ok) típusától függetlenül?

Köszönöm bírálóm felvetését a proteináz mutánsok növekedésével kapcsolatban, a laborunkban jelenleg is folyó egyik projekt célja éppen ennek a deléciós törzsnek a behatóbb fenotípusos vizsgálata. Reményeim szerint hamarosan további adatok állnak majd rendelkezésünkre. A kérdés második részére nehezebb a válasz. Miután a mutánsaink tápanyagban gazdag közegben szaporodásukban nem mutattak eltérést a vad típushoz viszonyítva, így azt feltételezzük, hogy a szekretált hidrolázok elvesztése, többek között a gazdaszervezettel összefüggésbe hozható körülmények között okoz szaporodás csökkenést. Az opportunistá patogének esetén a virulencia sokszor nem más mint a gazdához, mint élőhelyhez történő alkalmazkodás képességének kifejlesztése. Ebben az értelemben tehát a gazdát “reprezentáló” *in vitro* környezetben tapasztalt lassabb növekedés értelmezhető akár csökkent virulenciaként is. Esetünkben a szekretált hidrolázok bizonyos speciális körülmények között (ilyen például a magas lipid tartalmú

tápközeg) bizonyosan eszenciálisak a hatékony szaporodáshoz, ezzel magyarázható a mutáns sejtek lassabb növekedése ebben a speciális tápközegben. A gazdaszervezetben számos eltérő mikrokörnyezetet jelentő „niche” található, hiszen a bőrön vagy a vérben teljesen más tápanyagok, mikroelemek állnak rendelkezésre. Ennek fényében egy gén elvesztésének következtében létrejövő szelektív hátrány (abban az értelemben szelektív, hogy olyan körülmények közötti növekedési deficiencia amely a gazdaszervezetet mint környezetet reprezentálja) véleményem szerint definiálható virulencia csökkenésként. A szekretált hidrolázok példáját tekintve a lipázok a bőrön például segíthetik a megtapadást és a tápanyagok felvételét a bőr-lipidrétegének bontásával, azonban a véráramba kerülve már sokkal inkább az immunmoduláló molekulák hidrolízise által fejtik ki a fertőzést támogató hatásukat. Így ha tetszik, akkor ezek a képességek plasztikusnak tekinthetők és attól függően fejtik ki hatásukat, hogy milyen a gazdaszervezetben jellemző mikrokörnyezetbe kerül a gomba. Az előző erősen hipotetikus megállapítással összhangban 2016 végén Ballour és munkatársai⁴ írták le annak a lehetőségét, hogy a gombasejtek a különböző testtájakon elérhető szénforrásoktól függően képesek a sejtfal szerkezetüket alapvetően megváltoztatni. Kimutatták, hogy laktát jelenlétében a sejtfalban előforduló fontos mikroba asszociált molekuláris mintázat a β -glükán rejtetté válik. A gomba ezen a szénforráson lassabban növekszik mint glükózon, azonban bizonyos mikrokörnyezetben (vér, vaginális folyadék) a laktát koncentrációja magasabb mint más területeken és az ezekhez történő adaptáció a sejtfal szerkezetének direkt megváltoztatásával szelektív előnyt jelent a gomba számára az immunrendszer előli menekülés során.

3. A fagoszómák és lizoszómák ko-lokalizációjának a tanulmányozására vonatkozóan a szerző két eljárást, Alexa Fluor 647 – LysoTracker Green áramlási citométeres „kvantitatív imaging” (61. oldal) és Calcofluor White – LysoTracker Red fluoreszcens mikroszkópos (72. oldal) módszereket használt. Ezekben az esetekben szeretném megkérdezni az elvégzett független kísérletek számát és azt is, hogy a bemutatott változások szignifikánsak voltak-e? Az értekezés egyik legnagyobb értéke egyébként éppen a nagyszámú kísérleti adat megfelelő és alapos statisztikai elemzése.

A 19. ábrán bemutatott kvantitatív képalkotó módszerrel elért eredményeink 3 független kísérletből mutatnak 1 reprezentatív ábrát. Miután az áramlási citometriás eljárások során nagyszámú sejtről kapunk eredményt (jelen esetben 10.000 sejtet vizsgáltunk meg) ezért azok statisztikai ereje igen nagy. A 3 ismételt kísérletnél tendenciájában hasonló eredményeket kaptunk, de azok jelentősen szórtak. Ennek oka a primer sejtek

használata volt, a primer sejtek esetében gyakran találkozunk rendkívül nagy eltérésekkel, amelyek a donorok jelentős különbségéből adódnak. Emiatt mindenképpen tervezzük, további minták vizsgálatát. A *sapp1* mutánsok esetében szintén humán primer makrofágokat használtunk, a kísérleteket ebben az esetben 4 donorral végeztük el, a bemutatott ábra ezek közül mutat egy reprezentatív felvételt. Itt hagyományos mikroszkópos eljárást alkalmaztunk, így sokkal kevesebb sejtről állt rendelkezésünkre adat. Egyetértek bírálómmal, hogy a jövőben mindenképpen szükséges lesz a fago-lizozóma fúzió részletesebb vizsgálatára és ebben az esetben is alkalmazni fogjuk a kvantitatív képalkotó eljárást.

4. A *C. albicans* és *C. parapsilosis* sejtek által kiváltott citokin termelési vizsgálatokban hővel előlt *Candida* sejteket használtak (79. oldal), ami jelentősen befolyásolhatja az eredményeket, pl. a sejtfalszerkezet megváltozása miatt (83. és 92. oldalak). Erre a szerző maga is helyesen mutat rá. A hőkezelés a gombafajok felismerésében szerepet játszó receptorok azonosítását is megnehezítheti (91 és 92. oldalak). A szerző írja 83. oldalon: „Legújabb kísérleteinkben azonban kidolgoztunk egy olyan ko-inkubációs rendszert, ahol az élő sejtek kölcsönhatásait vizsgálhatjuk a humán fagocita sejtekkel.” Megtudhatunk-e erről részleteket? Sikerült-e megerősíteni az előlt sejtekkel kapott eredmények legalább egy részét?

A szakirodalomban elfogadott megközelítési mód a hővel előlt gomba sejtek és konídiumok alkalmazása a gazda immunválaszának tanulmányozása során⁵. Tudjuk, hogy a hőkezelt sejtek alkalmazása során kétségtelenül és bizonyítottan számos hasznos információhoz juthatunk, a hőkezelés során a gomba sejtfalában irreverzibilis változások következnek be, amelyek alapvetően befolyásolhatják a gazda immunválaszát⁶. Jóllehet egyes vélemények alapján a gazdaszervezetben bekövetkező ölt mechanizmusok következtében nagyon hasonló folyamatok mennek végbe a sejtfalban *in vivo* is. Ennek ellenére vagy éppen ezért fontosnak tartottuk megvizsgálni, hogy az élő *Candida* sejtek hogyan indukálják a gyulladásos citokinek termelését mononukleáris sejtekben. Az erről készült publikációnk hamarosan megjelenik (Tóth és munkatársai, Scientific Reports 2017), eredményeink rövid összefoglalása szerint tudjuk, hogy a mononukleáris sejteket élő *C. parapsilosis*-szal és *C. albicans*-szal fertőzve, mindkét faj azonos mértékben indukálta a TNF α és IL-6 szekréciót, a *C. parapsilosis* szignifikánsan alacsonyabb IL-1 β termelést váltott ki, mint a *C. albicans*. A továbbiakban ennek a különbségnek a hátterében meghúzódó lehetséges mechanizmusokat vizsgáltuk részletesen.

Az IL-1 β 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 *C. albicans* által indukált inflammaszóma aktivációt. Azt tapasztaltuk, hogy a *C. parapsilosis* csak hosszú inkubáció után és viszonylag nagy sejtszámban indukálta az IL-1 β szekréciót, ellentétben a *C. albicans*-szal, amely már néhány óra elteltével jelentős IL-1 β termelést váltott ki. Noha *C. albicans* esetén a hifaképzésnek fontos szerepet tulajdonítanak az inflammaszóma aktiváció során, érdekes módon eredményeink szerint az IL-1 β szekréció mértéke független volt a *C. parapsilosis* pseudohifák jelenlététől. Továbbá, nem tapasztaltunk különbséget THP-1 makrofágokban az IL-1 β mRNS és pro-IL-1 β szintjében *C. parapsilosis* és *C. albicans* stimulációt követően, ami arra utal, hogy a csökkent IL-1 β szekréció nem transzkripció vagy transzlációs különbségek eredménye, hanem a pro-IL-1 β 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 β , 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 β 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⁺ koncentráció csökkenése. Eredményeink szerint az IL-1 β szekréció mind *C. parapsilosis*, mind *C. albicans* stimulációt követően K⁺-efflux függőnek bizonyult, a katepszin B gátlása azonban nem volt hatással a THP-1 sejtek IL-1 β 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 β , mind a szekretált IL-1 β 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 oxigéngyökök 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 β szekréciót indukál, mint a *C. albicans*. Az inflammaszóma aktiváció vizsgálata laboratóriumunkban jelenleg is folyik, így reméljük, hogy a jövőben még pontosabb képet kaphatunk a *C. parapsilosis* és *C. albicans* által indukált gyulladásos válaszról.

Végezetül szeretném még egyszer megköszönni Prof. Dr. Pócsi Istvánnak dolgozatom alapos bírálatát.

Irodalom:

1. Pryszcz, L.P., Nemeth, T., Gacser, A. & Gabaldon, T. Unexpected genomic variability in clinical and environmental strains of the pathogenic yeast *Candida parapsilosis*. *Genome Biol Evol* **5**, 2382-92 (2013).
2. Pryszcz, L.P., Nemeth, T., Gacser, A. & Gabaldon, T. Genome comparison of *Candida orthopsilosis* clinical strains reveals the existence of hybrids between two distinct subspecies. *Genome Biol Evol* **6**, 1069-78 (2014).
3. Pryszcz, L.P. et al. The Genomic Aftermath of Hybridization in the Opportunistic Pathogen *Candida metapsilosis*. *PLoS Genet* **11**, e1005626 (2015).
4. Ballou, E.R. et al. Lactate signalling regulates fungal beta-glucan masking and immune evasion. *Nat Microbiol* **2**, 16238 (2016).
5. van de Veerdonk, F.L. et al. The macrophage mannose receptor induces IL-17 in response to *Candida albicans*. *Cell Host Microbe* **5**, 329-40 (2009).
6. Netea, M.G. et al. Immune sensing of *Candida albicans* requires cooperative recognition of mannans and glucans by lectin and Toll-like receptors. *J Clin Invest* **116**, 1642-50 (2006).