

Válasz Dr. Majoros László opponensi véleményére

Mindenekelőtt szeretném köszönetemet kifejezni Dr. Majoros Lászlónak az MTA doktori értekezésem igen alapos bírálataért.

Köszönöm, hogy a benyújtott értekezésemet szakmailag megalapozottnak ítéli, alkalmasnak tartja az MTA doktora cím megszerzéshez és nyilvános védésre javasolta. Különösen sokat jelentenek elismerő szavai, mivel Dr. Majoros László a klinikai mikrobiológia, azon belül is a *Candida* fajok orvosi mikrobiológiai kutatásainak egyik vezető kutatója, így véleménye, nagyon fontos számomra.

A bírálatban felvetett kérdésekre, kritikákra az alábbiakban válaszolok.

Köszönöm bírálóm kritikai megjegyzéseit néhány szóhasználati kérdésben, azokkal egyetértek.

A feltett kérdésekre a következőkben válaszolok:

1. *A kis csíraszámú normál flóra tagként előforduló mikroorganizmusok egyik szerepe lehet, hogy megakadályozzák a nagyobb virulenciával rendelkező, obligát patogén kórokozók megtelepedését. Lehet-e hasonló szerepe ebben az összefüggésben a C. parapsilosis-nak? Magyarul, lehet-e kedvező a C. parapsilosis jelenléte a normál flórában?*

A bírálóm egy rendkívül érdekes téma területre vezet kérdésével. A humán mikrobiom vizsgálata az egyik legizgalmasabb területe mind a mikrobiológiának mind az immunológiának. Tény, hogy a különböző *Candida* fajok, így a *C. albicans* és a *C. parapsilosis* előfordulási gyakorisága, illetve a kolónia képző egységek száma különböző test tájakon és szervrendszerekben (mint pl. az emésztő szervrendszer vagy az uro-genitális szervrendszer) eltérő¹. Azt is tudjuk, épp saját nemrégiben közölt vizsgálataink alapján, hogy a szájüregben bizonyos kóros elváltozások során (mint pl az oral squamous cell carcinoma – OSCC) a gomba mikrobiom is megváltozik, nagyobb számú és változatosabb gomba mikrobiális közösség azonosítható a tumoros szájban². A megváltozott mikrobiom minden bizonnyal hatással bír a természetes immunitás felismerő

mechanizmusain keresztül a nyálkahártyák immunológiai homesztázisára, így közvetve befolyásolhatja a tumorok progresszióját, vagy más betegségek kialakulásának súlyosságát is. Erre vonatkozó vizsgálatokat már végeztek például a gyulladásos bélbetegség esetében, ahol a gomba sejtfalában megtalálható beta-glükánt felismerő C-típusú lektin a dectin-1 szerepét vizsgálták a betegség kialakulásában, illetve annak súlyosságában³. A megváltozott immunológiai mikrokörnyezet (legyen az mikroba vagy tumor indukálta) alapvetően képes befolyásolni mindkét, immunhomeosztázis által felügyelt folyamatot. Ezért legújabb kutatási irányunk éppen arra koncentrál, hogy felderítsük az emberi “mycobiom” vagyis gomba-mikrobiom szerepét az egészséges szervezetben és megértsük azt, hogy ennek a közösségnek a megváltozása (akár számban, akár minőségben), hogyan befolyásolja bizonyos kórfolyamatok kialakulását vagy a kialakult betegség súlyosságát, esetleg az alkalmazott terápia hatékonyságát. A feltett kérdésre tehát egyelőre nem tudok konkrét választ adni, az azonban bizonyos, hogy a mikrobiális közösség fajösszetételének, vagy az egyes fajok arányának megváltozása bizonyosan az immunológiai mikrokörnyezet megváltozásával jár. Erre mutat rá a különböző *Candida* fajok felismerésére és az általuk kiváltott immunválaszban megmutatkozó eltérésekre koncentráló kutatásunk. Annyit biztosan kijelenthetünk már most, hogy a *C. albicans* és a *C. parapsilosis* által indukált immunválasz számos ponton jelentősen eltér egymástól, így az előzőekben vázolt logika alapján, joggal feltételezhetjük, hogy a *C. parapsilosis* túlsúlyba kerülése megváltoztatja az immunológiai mikrokörnyezetet, amelynek több szinten lehet hatása. Arról, hogy ez előnyös vagy hátrányos a gazdaszervezet számára még nem áll rendelkezésünkre elég információ, de a kérdés mindenképpen izgalmas és reményeink szerint a jövőbeni munkánk erre választ adhat.

2. A virulencia faktorok *in vitro* elemzése alapján a *C. parapsilosis sensu stricto* a leginkább, míg a *C. metapsilosis* a legkevésbé virulens faj a „psilosis” csoporton belül. Mi lehet a magyarázata annak, hogy normál immunrendszerű egerek intravénás oltása után a 3 faj virulenciája nem különbözik szignifikánsan egymástól (Trevino-Rangel és mtsai. 2014).

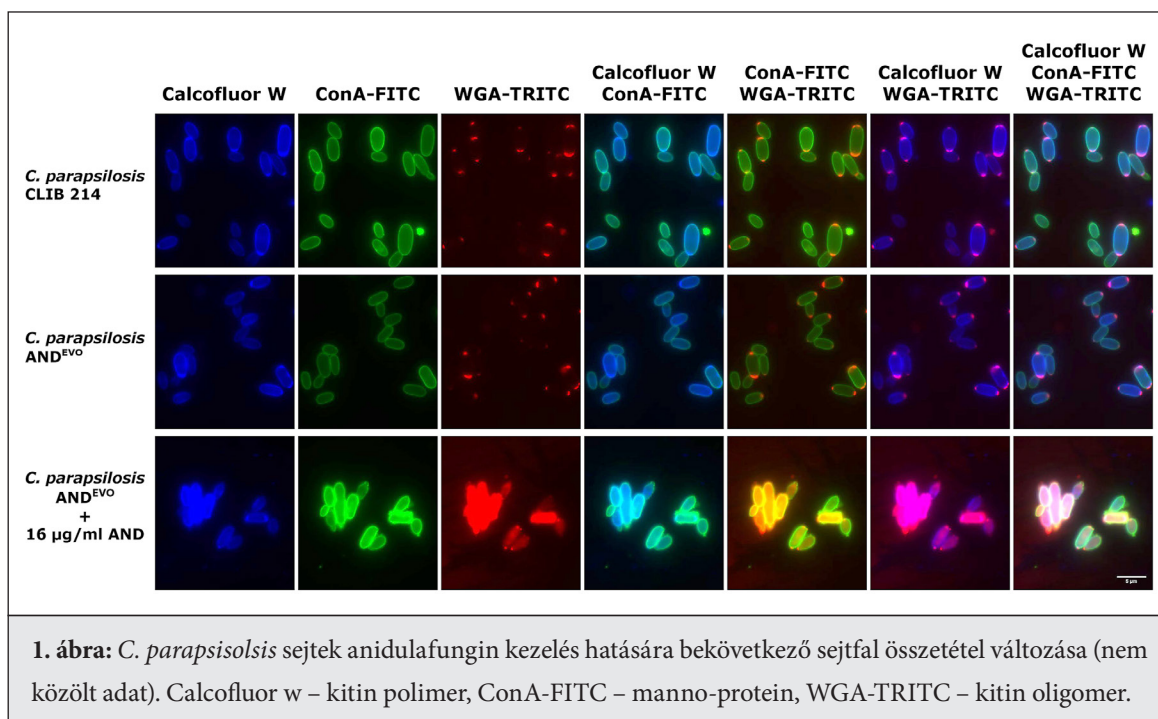
A különböző fertőzési modellek gyakran jelentős különbségeket mutatnak ugyanazon fajok összehasonlítása során is. Saját munkánk alapján tudjuk, hogy *in vitro* infekciós modellek (fagocita sejteket vagy rekonstruált emberi szövetek) használatával a 3 „psilosis” faj jelentős eltérést mutat virulencia tekintetében^{4,5}. Bertini és munkatársai⁶ 2013-ban ösztrogén kezelt Balb/c egereken végzett vaginális candidiázist modellező

fertőzés alkalmazásával kimutatták, hogy a *C. metapsilosis* sejteket jelentősen gyorsabban képes az egerek immunrendszere eltüntetni mint a másik két „*psilosis*” fajt. 2016-ban Hector Mora Montes kutatócsoportjával kollaborációban kimutattuk⁷, hogy a 3 faj emberi mononukleáris sejtek általi felismerése eltér és érdekes módon a *C. parapsilosis sensu stricto* és a *C. metapsilosis* által indukált citokin válasz hasonló volt. Ennek egyik magyarázata lehet, hogy a 3 faj sejtfa szerkezetében jelentős eltéréseket azonosítottunk. Hipotézisünk szerint, a *C. parapsilosis sensu lato* csoport tagjai inkább tekinthetők kommenzalista mikrobának mint primer patogénnek, így fiziológiai adaptációjuk a veleszületett immunitás határvonalain történő túlélésre specializálódtak (tápanyag felvétel, mikroelemek felvétele, hőmérséklet és pH adaptáció stb.), illetve az itt jellemző immunfolyamatokhoz történő alkalmazkodás illetve azokkal szembeni védekezés képességének kifejlesztése jellemző ezekre a mikrobákra. Azonban az immunológiai határvonalak átlépése után az immunrendszer viszonylag általános gombaellenes rendszere aktiválódik (lásd perifériás mononukleáris sejtek). Ezek alapján tehát a *C. parapsilosis sensu stricto* ebben a kommenzalista adaptációban jár előrébb a *C. metapsilosis*-hoz képest, azaz gyakrabban és hatékonyabban képes az emberi bőrön és nyálkahártyákon kolonizálni. Ez lehet a magyarázata annak, hogy a klinikumban viszonylag ritkán azonosítanak *C. metapsilosis* által okozott fertőzéseket. Azonban ha egy felszínen mindkét „*psilosis*” faj jelen van, akkor a barrierek áttörése után (pl. a véráramba kerülés után, ahogyan az a bírálóm által hivatkozott cikkben is történt) az immunrendszer nagyjából azonos hatékonysággal képes azokat eliminálni. A fentiek okán is fontos a virulencia és a virulencia faktorok fogalmának újragondolása, amelyről dolgozatom bevezetőjében is írtam. Véleményem szerint az opportunistá patogének estében a virulencia nem más mint adaptáció, a virulencia faktorok pedig olyan fiziológiai folyamatok amelyek képessé tesznek egy mikrobát egy adott környezetben történő túlélésre.

3. Jól ismert, hogy a „*psilosis*” csoport tagjai csökkent érzékenységgel rendelkeznek az echinocandinok iránt. Klinikailag, azonban minden nemzetközi adat azt mutatja, hogy az echinocandinok *in vivo* hatékonyak. A munkájában kapott eredmények lehetnek-e összefüggésben ezzel a klinikai tapasztalattal?

A *C. parapsilosis sensu stricto* faj izolátumai valóban magasabb MIC értékkel bírnak echinocandinokkal szemben (EUCAST adatok) mint más *Candida* fajok. Bizonyítja ezt bírálóm számos közleménye is, különböző *in vitro* és *in vivo* modellben. Néhány éve azonban az is világossá vált, hogy az echinocandinokkal szembeni rezisztenciáért

elsődlegesen felelős FKS génekben (β -glükán szintáz komplex egyes tagjait kódoló gének) bekövetkező pontmutációkon kívül egyéb rezisztencia mechanizmusok is kialakulhatnak és ún. másodlagos fiziológiai hatással járhatnak. Ismert ma már, hogy *C. albicans* esetében az echinokandinok hatására a *HOG1*, *CEK1*, *PKC* MAP kináz és a Ca^{2+} -kalcineurin jelátviteli utak aktiválódnak, amelyek következtében a celluláris glükán és kitin bioszintézis megváltozik ezáltal módosítva a kezelt sejtek sejtfal-szerkezetét⁸. megfigyelték azt is, hogy az FKS mutáns sejtekben a megnövekedett kitin mennyiség akkor is megjelenik, ha a sejteket nem kezelik echinocandinnal, valamint akkor is, megjelenik, ha egyébként echinocandin érzékeny (vad típusú) sejteket echinocandin kezelésnek vetik alá, mint egyfajta adaptációs folyamat következményeként. Ezek a mechanizmusok egyelőre részletesen nem tisztázottak *C. parapsilosis* esetében. Kutatócsoportunk vizsgálatai alapján ma már ismert, hogy a sejtfal kitin tartalma *C. parapsilosis* esetében is megemelkedik echinocandin kezelés hatására. Azt is megállapítottuk, hogy a megemelkedett kitin tartalom nem csak a mélyebb rétegekben elhelyezkedő kitin polimerek, hanem a sejtfal felsőbb rétegeiben elhelyezkedő kitin oligomerek esetében is igaz (1. ábra). Ennek következtében a gazdaszervezet felismerő mechanizmusai, illetve immunválasza megváltozhat, amely akár faj specifikus is lehet.



A különböző *Candida* fajok okozta szisztémás fertőzések elleni védekezésben az egyik legfontosabb szerepe a makrofágokon és dendritikus sejteken expresszálandó Dectin-1-nek van. Ez a sejtfelszínen található receptor a β -1,3-glükánt képes felismerni és ez által aktiválni az NF- κ B transzkripciós faktort, így megnöveli a gyulladást serkentő citokinek mennyiségét, valamint serkenti a gomba sejtek internalizációját makrofágok és neutrofil granulociták által⁹. Korábbi munkánkban bemutattuk, hogy a *C. parapsilosis* *och1* KO sejtjeit a makrofágok hatékonyabban képesek felismerni a Dectin-1 receptoron keresztül, mivel az *OCH1* géntermék hiányában a csökkent mennyiségű mannóz nem képes ugyan olyan hatékonyan maszkolni a β -1,3-glükán egységeket a sejtfal belsőbb rétegeiben, mint a vad típus esetén¹⁰.

Elképzelhető tehát, hogy a sejtfal echinocandinok által okozott struktúra változása lehetővé teszi, hogy a sejtfal mélyebb rétegeiben található komponensek jobban elérhetőbbé válnak az immunsejtek receptorainak számára, illetve a felborult sejtfal összetétel miatt a nagyobb mennyiségű sejtfalkomponens az immunológiai szempontból releváns receptorok nagyobb mértékű aktiválódását okozhatják.

4. Véleménye szerint az antifungális kezelések milyen módon befolyásolhatják a *Candida* fajok elleni immunválaszt, különös tekintettel *C. parapsilosis* esetén.

*C. parapsilosis*ról nem áll rendelkezésre olyan jellegű adat, hogy az antifungális kezelés a gombára kifejtett hatásán keresztül hogyan befolyásolja az immunválaszt. Azonban *in vitro* *C. albicans* fertőzés során caspofungin kezelés hatására jelentősen megnövekszik az INF- γ , a TNF- α , valamint az antifungális immunválasz egyik legfontosabb citokinjének, az IL-17-nek a koncentrációja is, aminek hátterében valószínűleg a caspofungin hatására bekövetkező sejtfal felépítésének átrendeződése áll¹¹. Az echinocandinokkal szembeni rezisztenciáért *Candida* fajokban elsősorban a β -glükán szintézist végző Fks1p/Fks2p-t kódoló génekben bekövetkező „hot spot” mutációk felelősek. Leírták, hogy az *FKS1*-ben bekövetkező mutációk hatására *C. albicans*-ban echinocandinok jelenléte nélkül megnövekszik a sejtfal kitin tartalma, ezzel egyidejűleg pedig lecsökken a makrofágok NF- κ B/AP-1 aktivitása *in vitro* fertőzések során¹². Amphotericin B rezisztens *C. tropicalis* törzsek esetén megfigyelték a β -glükán felszíni megjelenését és mennyiségének megemelkedését, ezzel párhuzamosan pedig több citokin (IL-1 β , TNF- α , IL-10, INF- γ , IL-22, IL-17) koncentrációjának növekedését¹³. Érdeemes megfigyelni, hogy

az első esetben az antifungális kezelésnek volt közvetett hatása a létrejött immunválaszra, az utóbbi két esetben viszont az adott organizmusokban megjelenő rezisztencia mechanizmusa okán, antifungális kezelés nélkül következik be változás az immunválasz jellegében. Érdekes módon úgy tűnik, hogy a különböző echinocandinok által gyakorolt hatás is eltér az immunválasz tekintetében. *C. glabrata* vad típusú és FKS2-ben pontmutációt hordozó, echinocandin rezisztens törzsét kezelték a vad típusnak megfelelő MIC-érték alatti 0,25-szoros és 0,5-szeres caspofungin és micafungin koncentrációkkal, miközben *in vitro* makrofágokat fertőztek. Az NF- κ B/AP-1 transzkripciósfaktor aktivációja alapján a vad típusú sejtek mind caspofungin, mind micafungin hatására emelkedett makrofág aktiválódást váltottak ki, ellenben az FKS2 mutáns törzs csak micafungin hatására váltott ki megnövekedett NF- κ B/AP-1 aktivációt¹⁴. Egy nem régiben megjelent tanulmány arra is rámutat, hogy az antifungális szereknek közvetlen hatása is lehet az immunválaszra. Micafungin stimulációt követő fertőzés esetén *in vivo* egér modellben a különböző immunsejtek hatékonyabban léptek fel *C. albicans* és *Aspergillus fumigatus* ellen. Valamint *Galleria mellonella* micafunginnal történő előkezelése *Staphylococcus aureus* fertőzés után megnövelte a lárvák túlélését¹⁵. A fentiek alapján tehát bizonyosan kijelenthető, hogy az antifungális kezelésnek hatása lehet a gazda immunválaszára egyrészt direkt másrészt indirekt módon. Reményeink szerint, a *C. parapsilosis* esetében a kutatócsoportunk munkája révén hamarosan további ismereteket szerezhetünk mindkét hatásról.

5. A különböző kórokozók elleni immunválasz egy nagyon finoman szabályozott rendszer. Nem véletlen, hogy kevés olyan terápiásan is használható gyógyszer van, amelyek az immunválaszba avatkozva fejtik ki a hatásukat. Véleménye szerint klinikailag milyen haszonnal járhat (a betegek jobb túlélése szempontjából) a különböző *Candida* fajok elleni immunválasz pontosabb megismerése?

A különböző *Candida* fajok elleni immunválasz több ponton is eltérő lehet. Ugyan a leginkább tanulmányozott *C. albicans* esetében áll rendelkezésünkre a legtöbb információ, ma már tudjuk, hogy az ún. "nem-albicans" fajok elleni gazda-válasz számos ponton eltérhet a *C. albicans*-nál megismertektől. Ennek egyik leginkább nyilvánvaló oka az, hogy a különböző fajoknak eltérő sejtfalszerkezete lehet. Saját munkánk alapján tudjuk, hogy a *C. parapsilosis* esetében a sejtfa szerkezete jelentősen eltér a *C. albicans*-nál megfigyelhetőétől. Tudjuk, hogy a mannoprotein réteg mintegy "letakarja" a mélyebb

rétegekben elhelyezkedő β -glükán hálózatot, amely elsődleges ligandja a dectin-1 nevű C-típusú lektin PRR-nek. Éppen ezért munkacsoportunk egyik most futó kísérelt sorozatában dectin-1 knock out egerek immunválaszát vizsgáljuk *C. parapsilosis* fertőzést követően. Előzetes eredményeink arra utalnak, hogy ellentétben a *C. tropicalis*-szal és a *C. albicans*-szal a dectin-1 hiányos egerek nem mutatnak fokozottabb érzékenységet *C. parapsilosis* fertőzésre. Ezzel összhangban azt is kimutattuk, hogy sem a Syk kináz sem a CARD9 molekula nem esszenciális a *C. parapsilosis* elleni immunválasz során, amely tovább erősíti azt a feltételezésünket, miszerint az immunrendszer egymástól eltérő molekuláris mechanizmusokat mozgósít a védekezés során, attól függően, hogy milyen *Candida* faj által történt a fertőzés. Az ehhez hasonló ismereteknek komoly klinikai jelentősége lehet azáltal, hogy egy esetleges immunterápia kidolgozása során egy pontos diagnózist követően célzottan a fertőzést kiváltó opportunistá patogén válik támadhatóvá.

Végezetül szeretném még egyszer megköszönni Dr. Majoros László részletes és alapos bírálatát.

Irodalom:

1. Findley, K. et al. Topographic diversity of fungal and bacterial communities in human skin. *Nature* **498**, 367-70 (2013).
2. Berkovits, C. et al. Analysis of oral yeast microflora in patients with oral squamous cell carcinoma. *Springerplus* **5**, 1257 (2016).
3. Ott, S.J. et al. Fungi and inflammatory bowel diseases: Alterations of composition and diversity. *Scand J Gastroenterol* **43**, 831-41 (2008).
4. Gacser, A., Schafer, W., Nosanchuk, J.S., Salomon, S. & Nosanchuk, J.D. Virulence of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* in reconstituted human tissue models. *Fungal Genet Biol* **44**, 1336-41 (2007).
5. Nemeth, T. et al. Characterization of virulence properties in the *C. parapsilosis* sensu lato species. *PLoS One* **8**, e68704 (2013).

6. Bertini, A. et al. Comparison of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* adhesive properties and pathogenicity. *Int J Med Microbiol* **303**, 98-103 (2013).
7. Estrada-Mata, E. et al. Members of the *Candida parapsilosis* Complex and *Candida albicans* are Differentially Recognized by Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Front Microbiol* **6**, 1527 (2015).
8. Perlin, D.S. Echinocandin Resistance in *Candida*. *Clin Infect Dis* **61 Suppl 6**, S612-7 (2015).
9. Netea, M.G., Joosten, L.A., van der Meer, J.W., Kullberg, B.J. & van de Veerdonk, F.L. Immune defence against *Candida* fungal infections. *Nat Rev Immunol* **15**, 630-42 (2015).
10. Perez-Garcia, L.A. et al. Role of Protein Glycosylation in *Candida parapsilosis* Cell Wall Integrity and Host Interaction. *Front Microbiol* **7**, 306 (2016).
11. Rueda, C., Cuenca-Estrella, M. & Zaragoza, O. Paradoxical growth of *Candida albicans* in the presence of caspofungin is associated with multiple cell wall rearrangements and decreased virulence. *Antimicrob Agents Chemother* **58**, 1071-83 (2014).
12. Ben-Ami, R. et al. Fitness and virulence costs of *Candida albicans* FKS1 hot spot mutations associated with echinocandin resistance. *J Infect Dis* **204**, 626-35 (2011).
13. Mesa-Arango, A.C. et al. Cell Wall Changes in Amphotericin B-Resistant Strains from *Candida tropicalis* and Relationship with the Immune Responses Elicited by the Host. *Antimicrob Agents Chemother* **60**, 2326-35 (2016).
14. Beyda, N.D., Liao, G., Endres, B.T., Lewis, R.E. & Garey, K.W. Innate inflammatory response and immunopharmacologic activity of micafungin, caspofungin, and voriconazole against wild-type and FKS mutant *Candida glabrata* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* **59**, 5405-12 (2015).
15. Fuchs, B.B. et al. Micafungin Elicits an Immunomodulatory Effect in *Galleria mellonella* and Mice. *Mycopathologia* **181**, 17-25 (2016).