Doktori (PhD) értekezés tézisei

A *Saccharomyces cerevisiae* var. *'boulardii'* probiotikus élesztő eredetű fungémia okainak felderítése a gomba virulencia faktorainak vizsgálatán keresztül

Imre Alexandra

Témavezetők:
Prof. Dr. Pócsi István
Dr. Pfliegler Valter Péter

DEBRECENI EGYETEM
Laki Kálmán Doktori Iskola

Debrecen, 2022

A *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* VAR. *'BOULARDII'* PROBIOTIKUS ÉLESZTŐ EREDETŰ FUNGÉMIA OKAINAK FELDERÍTÉSE A GOMBA VIRULENCIA FAKTORAINAK VIZSGÁLATÁN KERESZTÜL

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az elméleti orvostudományok tudományágban

Írta: Imre Alexandra okleveles biotechnológus

Készült a Debreceni Egyetem Laki Kálmán doktori iskolája
(Trombózis, Hemosztázis és Vaszkuláris Biológia programja programja) keretében

Témavezetők: Prof. Dr. Pócsi István, az MTA doktora

Dr. Pfliegler Valter Péter, PhD

Az értekezés bírálói: Dr. Péter Gábor, az MTA doktora

Dr. Kardos Gábor, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Balla György, akadémikus

tagok: Dr. Dinya Tamás Ákosné Prof. Dr. Papp Mára, az MTA doktora

Dr. Olasz Ferenc György, PhD

Dr. Péter Gábor, az MTA doktora

Dr. Kardos Gábor, PhD

Az értekezés védésének helyszíne és időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK, Szemészeti Tanszék Tanterme
2023. január 26., 11:00

1. BEVEZETÉS

Az 1950-es évek óta gyártják és forgalmazzák a *Saccharomyces 'boulardii'* élesztőgombát, mely valójában a *S. cerevisiae* faj egyik altípusa, a probiotikumoknál már megszokott emésztőrendszeri panaszok (antibiotikummal összefüggő, vagy egyéb eredetű hasmenés) ellen. Ezeken felül a probiotikus élesztő a *Clostridioides difficile* fertőzés megelőzése, az irritábilis bélszindróma (IBS) tüneteinek enyhítése, valamint *Helicobacter pylori* fertőzés fennállása esetén is sikerrel akalmazható. Az egészségre gyakorolt kedvező hatásait több, mint 80 randomizált klinikai tanulmány támasztja alá egy 2017-es összefoglaló metaanalízis alapján, ez a szám pedig azóta is folyamatosan nő. Alkalmazása azonban ellenjavallt az alapvetően legyengült immunrendszerű betegcsoportok (idősek, csecsemők, immunszuppresziós kezelésben részesülők, HIV fertőzöttek) számára a fungémia előfordulásának magas kockázata miatt. A kontraindikáció ellenére gyakran előfordul, hogy veszélyeztetett egészségügyi állapotban lévő páciens részesül élesztő probiotikumos kezelésben, így az utóbbi években megnőtt az élesztő probiotikum eredetű fungémiás megbetegedések száma. A szakirodalomban esettanulmányok formájában számoltak be az ilyen esetekről, azonban ezek a jelentések nagyrészt nem reprezentatívak a *S. 'boulardii'* altípus azonosításának gyakori hiánya miatt. Az altípus-szintű azonosítás elengedhetetlen ahhoz, hogy egyértelműen összefüggésbe lehessen hozni egy *Saccharomyces* fungémiát magával a probiotikus termékkel. Ezen felül elhanyagolható azoknak a tanulmányoknak a száma is, amik a fertőzés kialakulásának mechanizmusaival, illetve a probiotikus élesztő virulencia faktoraival foglalkoznak. Jelen dolgozat ezeket a hiányosságokat igyekszik a lehető legnagyobb tudományos körültekintéssel pótolni, illetve kiegészíteni.

Az eddigi kutatások felderítették, hogy a probiotikus élesztő a többi *S. cerevisiae*-hez hasonlóan viszonylag könnyen és megbízhatóan manipulálható molekuláris genetikai eszközökkel, így ígéretes jelölt a probiotikumok, illetve bioterapeutikumok új generációja számára. Várható, hogy ezeknek a molekuláris módszereknek a térnyerésével növekedni fog azoknak a kutatásoknak a száma, melyek a probiotikumok továbbfejlesztésével foglalkoznak, egészségügyi hatásuk fokozása vagy új kedvező tulajdonságok létrehozása céljából. Ezeket az úgynevezett "designer" probiotikumokat viszont mindenképpen szükséges lesz tesztelni biztonságosság szempontjából is, amihez nélkülözhetetlen az általuk okozott fertőzések lefolyásának és a probiotikumok potenciális virulencia faktorainak részletes ismerete, melyhez az itt leírt eredmények is nagyban hozzájárulhatnak.

2. CÉLKITŰZÉS

Munkánk fő célja a *S. 'boulardii'* probiotikus élesztő fungémia kialakulási mechanizmusának tanulmányozása volt, *in vitro* és *in vivo* modellek, valamint a CRISPR/Cas9 genom szerkesztési módszer alkalmazásával. A törzsgyűjteményünkben kereskedelmi és klinikai izolátumok (vérizolátumok is) egyaránt rendelkezésünkre álltak, így lehetőségünk volt összehasonlításokat végezni a különböző forrásból származó élesztők között.

Ezeket alapul véve az alábbi célkitűzéseket fogalmaztuk meg:

1. Egy olyan megbízható diagnosztikai módszer kifejlesztése és optimalizálása, mellyel egyértelműen el lehet különíteni a *S. 'boulardii'* probiotikum eredetű klinikai izolátumokat más *Saccharomyces* vagy akár más élesztő fajoktól.

2. A *S. 'boulardii* kereskedelmi és klinikai izolátumok virulencia faktorainak *in vitro* (alkalikus foszfatáz termelés, proteáz teremelés, hemolitikus aktivitás) és *in vivo* (*Galleria melonella* lárva, és immunszuppresszált BALB/c egér modell) vizsgálata az élesztő fertőzési képességének felmérése céljából.

3. A probiotikus élesztőizolátumok genomikai analízise az egyik kereskedelmi törzs long-read (Oxford Nanopore Technologies; MinION készülék) teljesgenom szekvenálását és genomjának összeállítását és annotálását követően.

4. A szakirodalom alapján a hipotézisünk az volt, hogy az élesztő hem oxigenáz génje (*HMX1*) virulencia faktor lehet, ami elősegíti az élesztő túlélését emlős gazdaszervezetben. Tervünk a *HMX1* gén szerepének felderítése volt az élesztő vérben való túlélésében és virulenciájában, CRISPR/Cas9 módszerrel történő géndeléción és a deléciós törzsek jellemzésén keresztül.

4. METODIKÁK

4.1 Felhasznált izolátumok és törzsek

A kísérletekben 14 magyarországi *S. 'boulardii'* izolátumot használtunk fel. Ezek közül négy izolátum kereskedelmi (*S. 'boulardii'* CNCM I-745), tíz izolátum pedig klinikai volt. A kereskedelmi izolátumok két magyarországon kapható termékből kerültek izolálásra Tanszékünkön. A klinikai izolátumok a Debreceni és a Szegedi Egyetem Klinikai Központjának gyűjteményéből származtak, és eredetükről részletes betegadatok álltak rendelkezésre. A betegek adatait az EU, az állami és a helyi előírásoknak megfelelően kezeltük, a Debreceni Regionális és Intézményi Kutatásetikai Tanács klinikai vizsgálati etikai jóváhagyásával (DE RKEB/IKEB 5194-2019). Hat izolátumból homozigóta hem oxigenáz-1 (*HMX1*) deléciós mutáns törzset hoztunk létre a CRISPR/Cas9 genom editálási technológia segítségével, ezeket egyedi törzsazonosítóval láttuk el.

4.2 Genetikai módszerek

A törzsek rokonságának vizsgálatát DNS izolálást követően "Multilocus Sequence Typing"-gal [MLST; *CUP1* (teljes), *HMX1* (teljes), *CCA1* (788 bp fragmentum), *NUP116* (427 bp fragmentum) génekre], PCR-fingerprinting módszerekkel ["Microsatellite-Primed PCR" (MSP-PCR), interdelta fingerprinting], és mikroszatellita tipizálással végeztük. Az eredmények alapján a probiotikum élesztő izolátumok azonosítására alkalmas multiplex PCR módszert fejlesztettünk ki. Röviden: A módszer az interdelta régiókat, két mikroszatellitát (*YLR177w*, *YOR267c*) és kontrollként az ITS régiót amplifikáló primerpárokat kombinálja egyetlen PCR-reakcióban, ami a probiotikus élesztőkre jellegzetes hosszúságú termékeket és sávmintázatot eredményez gélelektroforézist követően.

4.3 Genomikai módszerek

A felhasznált törzsek közül hatot választottunk ki a genomikai analízisekhez, melyeket Illumina NextSeq 500 rendszerrel, ~50× lefedettséggel megszekvenáltunk. Továbbá a PY0001 esetében a törzs könyvtárát 400× lefedettséggel is megszekvenáltattuk egy külön futtatás során. Ez utóbbi törzs esetében long-read szekvenálást is alkalmaztunk (MinION készülék, R9.4.1 Flow Cell; Oxford Nanopore, Oxford, UK). A kapott .FAST5 szekvenálási fájlokat felhasználva összeraktuk és annotáltuk a genomot az LRSDAY pipeline segítségével. Ezt az összerakott genomot használtuk referenciaként a térképezéshez. SNP/INDEL analízist végeztünk, amik alapján fel is derítettük a magas, illetve közepes hatású mutációkat a fehérjekódoló génekben. A variánsok alapján az allél arányokat is meg tudtuk

határozni, melyekből meghatároztuk a törzsek ploidiáját és a kromoszómaszám változásokat (CCNV) a lefedettségi adatok figyelembevételével. A multiplex PCR alapján kapott eredmények és az izolátumok közeli rokonságának megerősítésére, filogenomikai analízist végeztünk (Maximum Likelihood filogenetika, Neighbor Net típusú genomhálózat). Ezután térképezést végeztünk a teljes *S. cerevisiae* pángenom ORF .FASTA gyűjtemény referenciaként való felhasználásával, hogy meghatározzuk a haploid genomra vonatkoztatott mitokondriális DNS, Ty transzpozon, rDNS és 2µ plazmid kópiaszámokat. A nukleáris ORF-ek kópiaszámát a PY0001 referenciára való térképezés lefedettségi adatait használva állapítottuk meg.

4.4 Fenotipizálási kísérletek

A fenotipizálási kísérletekbe valamennyi probiotikum izolátumot bevontuk. Vizsgáltuk a törzsek telepmorfológiáját, invazivitását, öregedését, ”killer” aktivitását és érzékenységét, valamint a petite telepek gyakoriságát. Elvégeztük az izolátumok MAT lókusz tipizálását és teszteltük a spórázási képességüket is. *In vitro* módszerekkel vizsgáltuk a törzsek virulencia faktorait (szaporodás magas hőmérsékleten, pszeudohifa növekedés, extracelluláris proteáz és lipáz aktivitás, hemolitikus aktivitás). Végezetül meghatároztuk az izolátumok antifungális szerekkel (flukonazol, amfotericin B, kaspofungin) szembeni érzékenységét is.

4.5 Humán epitélium modell interakciók vizsgálata

Vizsgáltuk az izolátumok humán epittéliummal való kölcsönhatásait, melyhez Caco-2 (vastagbél adenokarcinóma) sejtvonalat használtunk, és meghatároztuk az izlátumok adhézióját, és átjutását az epitélium modellen, valamint ”damage” assay-t is végeztünk. Pozitív kontrollként a *Candida albicans* SC5314 típustörzset használtuk.

4.6 Immunológiai vizsgálatok

A Debreceni Regionális Vérellátó Központban levett perifériás vérminták mononukleáris sejtjeit (PBMC) Ficoll-Paque (GE Healthcare, Uppsala, Svédország) sűrűséggradiens centrifugálással izolálták a Debreceni Egyetem Immunológiai Intézetében egészséges donorok heparinizált, leukocita-dúsított ún. centrifugálási határrétegeiből („buffy coat”). Az izolálás az Országos Vérellátó Szolgálat igazgatója, valamint a Debreceni Egyetem Általános Orvostudományi Kar Regionális és Intézményetikai Bizottsága (Debrecen, Magyarország) írásbeli jóváhagyásával történt. A monocitákat a PBMC-kből tisztították pozitív szelekcióval anti-CD14-hez konjugált mikrogyöngyökkel (Miltenyi Biotec, Bergish

Gladbach, Németország), a gyártó utasításai szerint. Ezután a dendritikus sejtek (DC) differenciáltatását 5 napig végeztük a DE Immunológiai Intézetében. A donorok allogén CD3+ pán-T sejtjeit PBMC-ből izoláltuk anti-CD3 mikrogyöngyökkel (Miltenyi Biotec) a gyártó utasításai szerint, és a moDC-T sejt kokultúrás kísérletekhez használtuk fel. A kísérletek során a *S. 'boulardii'* izolátumokkal koinkubált monocita eredetű dentritikus sejtek (moDC) fagocitózis vizsgálatát, valamint fenotípusos és funkcionális elemzését végeztük el (CD40, CD80, CD83, CD86, HLA-DQ sejtfelszíni fehérjék expressziójának és IL-6, IL-8, IL-12, IL-1β, TNFα citokin/kemokin szekréciós profil vizsgálata). Ezeken felül immunospot (ELISPOT) próbával vizsgáltuk az élesztőkkel koinkubált moDC-k T-sejt-aktiváló képességét is.

4.7 *In vivo* vizsgálatok

Az izolátumok virulenciáját *in vivo* állatmodellek [*Galleria mellonella* (viaszmoly) lárva, immunszuppresszált BALB/c egér] alkalmazásával is vizsgáltuk. A lárvák fertőzését 10^6 élesztőssejttel (egy éjszakán át inkubált, majd PBS-ben háromszor mosott és szuszpendált sejtek) végeztük. A kísérletek megkezdése előtt a lárvákat 24 órán át, 30°C-on éheztettük, hogy a hősokk általi immunaktivációt elkerüljük az oltás előtt. A beoltás után a lárvák túlélését 96 órán keresztül követtük nyomon, 37°C-on. Az egérkísérleteket a Debreceni Egyetem Állatgondozói Bizottsága hagyta jóvá (DEMÁB engedély: 12/2014), és a Debreceni Egyetem Orvosi Mikrobiológiai Intézetében végeztük. Az immunszuppressziót ciklofoszfamid többszöri [150 mg/testtömeg kilogramm (ttkg) 4 nappal a fertőzés előtt, 100 mg/ttkg 1 nappal a fertőzés előtt, valamint 100 mg/ttkg 2 és 5 nappal a fertőzés után] intraperitoneális beadásával idézték elő az Orvosi Mikrobiológiai Intézet munkatársai. Az állatokat intravénásan fertőztük az élesztőkkel az oldalsó farokvénán keresztül. A fertőzéseket $1–1{,}5\times10^7$ élesztősejttel végeztük, melyek 0,2 ml fiziológiás sóoldatban voltak szuszpendálva. Az inokulumban lévő sejtszámot Sabouraud dextróz agaron végzett sorozathígításokkal igazoltuk. A fertőzés után 6 napon keresztül követtük az egerek halálozását, majd a még élő egereket előírás szerint leöltük, veséiket eltávolítottuk és aszeptikusan homogenizáltuk. A homogenizálás után fizsóval sorozathígításokat készítettünk, melyeket YPD agarlemezekre szélesztettük, és a telepeket 2 nap, 37°C-os inkubáció után megszámoltuk, hogy meghatározzuk a vesékben található élő sejtek számát [CFU/vesetömeg (g)]. Az egerek fertőzését a vad típusú izolátumokkal és a *HMX1* deléciós mutáns *S. 'boulardii'* törzsekkel is elvégeztük.

4.8 A hem oxigenáz-1 gén (*HMX1*) funkciójának vizsgálata

A hem oxigenáz-1 gén (*HMX1*) funkciójának vizsgálatára 6 élesztőizolátumot választottunk ki (2 kereskedelmi és 4 klinikai izolátum). *S. 'boulardii'* izolátumokból a homozigóta *HMX1* nullmutáns törzseket a CRISPR/Cas9 rendszer segítségével hoztuk létre. A génkiütéshez szükséges ”repair” DNS-t (rDNS) és a Cas9/guide RNS (gRNS) expresszáló plazmidot a Benchling online szofverrel terveztük meg és a MoClo Yeast Toolkit plazmidjaiból (YTK, Addgene kit, Addgene, katalógusszám: 1000000061) állítottuk össze. A mutánsokat YPD táptalajon tenyésztettük tovább, hogy elveszítsék a plazmidon kódolt antimikotikum rezisztencia gént (illetve magát a plazmidot), így a deléciós törzsek nem tartalmaztak markert. Valamennyi klónozási reakcióhoz ultrakompetens *Escherichia coli* DH5α sejteket használtunk, amelyeket transzformáció után a megfelelő antibiotikumokat (ampicillint, kloramfenikolt vagy kanamicint) tartalmazó Lysogeny Broth (LB, Miller) agarlemezeken szelektáltunk.

Vizsgáltuk a vaséhezés hatását hat probiotikum izolátum és a belőlük létrehozott *HMX1* deléciós törzsek szaporodására ”spot plate” assay alkalmazásával. A vashiány előidézésére ”synthetic defined” (SD) agar táptalajt (6,7 g/l élesztő nitrogén bázis aminosavak nélkül, 2,2% glükóz, 2% agar) 40, 80 és 120 μM vaskelátképző batofenantrolindiszulfonsav-dinátrium-sóval (BPS) egészítettük ki. A *HMX1* deléciós törzsek hemolitikus aktivitását is meghatároztuk. A deléciós törzsek virulenciáját immunszuppresszált BALB/c egérmodellben vizsgáltuk.

4.9 Statisztika és adatvizualizáció

Az élesztő izolátum csoportoknál (C: kereskedelmi, M: mikózist okozó, és NM: mikózist nem okozó csoportok, valamint a ΔΔC: kereskedelmi, ΔΔM: mikózist okozó, és ΔΔNM: mikózist nem okozó csoportok), ill. az élesztő törzseknél kapott eredmények összehasonlításához a VassartStats (http://vassarstats.net/), Astatsa (https://astatsa.com/) és Statistics Kingdom (https://www.statskingdom.com/) online statisztikai alkalmazásokat használtuk. Két adathalmaz összehasonlításakor két mintás T-próbát (egyenlő varianciák esetén) vagy Welch-tesztet (nem egyenlő varianciák esetén) alkalmaztunk, ha az adatsorok normál eloszlást követtek. Nem normál eloszlás esetén Mann-Whitney tesztet alkalmaztunk. Több mint két, normál eloszlású adatsor összehasonlításhoz ANOVA-t használtunk, majd Tukey HSD teszttel határoztuk meg, hogy mely adatsorok térnek el szignifikánsan a többitől. Több mint két, nem normál eloszlású adatsor esetén Kruskal-Wallis tesztet alkalmaztunk, majd Dunn post-teszttel (Benjamini-Hochberg FDR-rel korrigált) határoztuk meg az adatsorok közötti különbségeket. Az egér és lárva túlélés elemzéséhez Log-rank (Mantel-Cox) tesztet végeztünk, és Kaplan-Meier túlélési görbével illusztráltuk az eredményeket. A spot plate assay statisztikai értékeléséhez az ImageJ ”gray-value” mérés funkcióját használtuk.

5. EREDMÉNYEK

5.1 Fajidentifikálás és MLST

A DE Orvosi Mikrobiológiai Intézetében összesen 16 élesztőizolátumot azonosítottak MALDI-TOF módszerrel *S. cerevisiae*-ként, melyek mindegyikét a Debreceni Egyetem Klinikai Központjában izolálták. Ezek közül az egyik izolátumról (DE22293) az ITS analízist követően kiderült, hogy tévesen azonosították *S. cerevisiae*-ként, mert valójában ez egy *P. kudriavzevii* izolátum volt. Ezért a további analízisekből ezt az izolátumot kizártuk. A felhasznált törzsek listájában említett szegedi klinikai izolátumok ehhez a kísérlethez még nem álltak rendelkezésre, így azokat nem elemeztük.

Az ITS régión kívül négy, különböző kromoszómán elhelyezkedő, sejtmagban található gén szekvenálását végeztük el, és kereskedelmi izolátumokat is bevontunk a vizsgálatba. Három izolátum esetében a *HMX1* gén olvashatatlan volt, vagy csak részben volt olvasható, hat izolátum esetében pedig az ITS régió volt olvashatatlan az egymástól eltérő, INDEL-eket tartalmazó allélok miatt. A többi izolátumnál mind a négy gén és az ITS régió szekvenálásakor is olvasható szekvenciákat kaptunk, melyekben számos egynukleotid polimorfizmust (SNP) találtunk. A szekvenciákat törzsenként konkatenáltuk (összesen 3854 nukleotid), majd filogenetikai analízist végeztünk, ami alapján nyolc kládot tudtunk azonosítani. Nyolc izolátum a kereskedelmi élesztőkkel együtt egy egységes kládot alkotott. Azonban a DE10397 izolátumban heterozigóta SNP-ket találtunk a *CCA1, CYT1, HMX1* és *NUP116* gének esetében (az ITS szekvencia olvashatatlan volt), melyeket vektorba klónozással elkülönítettünk. A szekvenálást követően kiderült, hogy ez az izolátum a probiotikumokkal megegyező, és 1–7 SNP-ben eltérő haplotípusokat egyaránt hordoz. A kládban található maradék hét izolátum (DE6507, DE27020, DE35762, DE3912, DE42533, DE42807, DE45866) génszekvenciái nem mutattak különbséget a probiotikumokhoz képest, sőt egy közös heterozigóta pozíció is megtalálható bennük az ITS1 régión belül (A/G, 121. pozíció). A többi szekvenált régió homozigóta volt ezeknél a kereskedelmi probiotikumokkal egyező izolátumoknál.

5.2 PCR-fingerprinting és mikroszatellita tipizálás

Az MSP-PCR módszer felbontó képessége alacsony volt, csak két csoportot tudtunk megkülönböztetni az izolátumok analízisekor. A kereskedelmi probiotikumok és a fentebb említett hét probiotikum eredetű izolátum egységes volt, de egyúttal megkülönböztethetetlenek voltak a többi izolátumtól. Az interdelta fingerprinting módszer kilenc csoportba tudta sorolni az izolátumokat. A kereskedelmi probiotikumok, valamint a hét potenciálisan probiotikum eredetű klinikai izolátum ezzel a módszerrel is egységes kládott alkotott. A mikroszatellita tipizálás, melyet a többi módszertől eltérően a

Molekuláris Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszéken munkatársaim végeztek [Társszerzői eredmény (mikroszatellita tipizálás): Lovászné Rácz Hanna Viktória, Dr. Pfliegler Valter Péter, Molekuláris Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszék], az összes probiotikum és klinikai élesztő esetében homozigóta allélokat azonosított az *YLR177w* (XII. kromoszóma) esetében, melyben 4–12 db CAG ismétlés volt. A *YOR267c* mikroszatellita homo-, di- és trizigóta volt, 11–41 db CAA ismétléssel. Az összes kereskedelmi probiotikum és a feltételezhetően probiotikum eredű klinikai izolátumok egyértelműen elkülönültek a többi izolátumtól ezzel a módszerrel, és mindegyik homozigóta volt a két mikroszatellitára nézve. Ezen 11 izolátum közeli rokonságát erősíti, hogy egyik sem volt képes spórázni a kísérleteink során.

5.3 Új multiplex PCR protokoll a *S. 'boulardii'* azonosítására

A PCR alapú módszerek kombinálásával létrehoztunk és optimalizáltunk egy törzs szintű identifikálásra alkalmas, nagy diagnosztikai értékű, gyorsan elvégezhető multiplex PCR módszert, ami nem igényel nagyfokú mintaelőkészítést. Az MLST, MSP-PCR, interdelta és mikroszatellita tipizálási eredmények, valamint más interdelta és mikroszatellita tipizálásról szóló munkák alapján kombináltunk az interdelta, *YLR177w*, *YOR267c*, és ITS régiók amplifikálásához szükséges primereket egyetlen multiplex PCR reakcióban. A primer koncentrációkat optimalizáltuk annak érdekében, hogy a gélelektroforézist követően elkerüljük a nagymértékű intenzitáskülönbségeket a sávok között. A kereskedelmi probiotikumoknál és probiotikum eredetű klinikai izolátumoknál ez a módszer egy jól felismerhető, három csoportban elhelyezkedő (600–850 bp, 210–270 bp, és 100–140 bp), és 7+1 (<75 bp) sávból álló mintázatot adott. A megfelelő felbontáshoz a gélelektroforézis során 2% TBE agaróz gélt és 100 V feszültséget alkalmaztunk 1 órán keresztül. A többi, nem probiotikum eredetű klinikai izolátumnál eltérő sávmintázatot figyeltünk meg, ami alapján hét csoportot tudtunk megkülönböztetni. Ezek a mintázatok egyértelműen elkülönültek a probiotikum és probiotikum eredetű izolátumok sávmintázatától.

Ezen felül a kontrollként használt *P. kudriavzevii* izolátum esetében *Saccharomyces* specifikus szekvencia nem volt jelen, ITS sáv viszont volt. A módszert tisztított és telepből izolált DNS-el, és egy másik enzimmel (DreamTaq; Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) is leteszteltük. Dream taq polimeráz alkalmazásával is alapvetően ugyanazt az eredményt kaptuk, mint a GoTaq használatakor. Két sáv mérete megváltozott, valamint a sávintenzitások eltértek a GoTaq és DreamTaq enzimekkel kapott eredmények összehasonlításakor, de ez nem befolyásolta a mintázatok kiértékelését. Ezen felül pedig *S. cerevisiae* bor, élelmiszer, bioetanol és labor törzset is vizsgáltunk a multiplex módszerrel. A kapott sávmintázatok ezeknél a törzseknél nagymértékben különböztek a probiotikumoknál kapott mintázattól, tehát a módszer megbízhatóan alkalmazható a *S. 'boulardii'* altípus azonosítására. A

vizsgált izolátumokat a multiplex PCR alapján a *S. cerevisae* fajba, illetve a *S. 'boulardii'* altípusba soroltuk.

5.4 Genomikai eredmények: teljesgenom-összeállítás és -annotálás

A hosszú, illetve rövid szekvenciaolvasatok felhasználásával az LRSDAY pipeline alkalmazásával 16 nukleáris kromoszómából, valamint két mitokondriális kontigból álló, gyakorlatilag teljes genomot állítottunk össze a PY0001 kereskedelmi izolátum (*S. 'boulardii'* CNCM I-745) esetén. A mitokondriális genomot Peter és munkatársai (2018) genom összeillesztéseit felhasználva, a CIM nevű *S. 'boulardii'* izolátummal pótoltuk ki, mely a rövid olvasatok alapján mindössze egy SNP-t tartalmazott a PY0001-hez képest. Az alkalmazott pipeline nem kis méretű, cirkuláris genomalkotók összerakására volt optimalizálva, így a 2µ plazmid összerakásától eltekintettünk. Az összeállított genom nagymértékben szinténikus volt a *S. cerevisiae* S288C referencia genommal, és a teljes genomméret a mitokondriummal együtt 11 868 337 bp-nak adódott, szemben az S288c referencia 12 157 105 nukleotidjával. A gének, a telomerikus régiók és a centromerek annotációja alapján a két törzs közötti különbség leginkább egyes S288c gének hiányából, valamint a Ty1-3-4 retrotranszpozonok hiányából fakad. Ugyanakkor a PY0001 genomja tartalmaz az S288c-ben meg nem lévő ORF-eket is. Megjegyzendő, hogy a CIM törzs mitokondriális genomja hosszabb, mint az S288c referencia mitokondriális genomja (87 321 bp, illetve 85 779 bp).

A gének identifikálása során 3 ETS-szekvencia („external transcribed spacer", külső átírt elválasztó szekvencia) is tévesen ORF-ként került meghatározásra, ezeket a SGD BLAST szolgáltatásával identifikáltuk, majd az annotációs listából (.GFF3 fájl) töröltük. Így mindösszesen 5717 magi proteinkódoló gént identifikáltunk a PY0001-ben. Később ezt az összeállított genomot használtuk referenciaként a *HMX1* génkiütéshez használt hat izolátum genomikai elemzéséhez.

A nyolc ismert *Saccharomyces* fajra történő térképezés alapján a probiotikus élesztők genomja nem tartalmazott semmilyen jelentős introgressziót, így ezek további analízisétől eltekintettünk.

5.5 Fenotípusos különbségek a kereskedelmi, mikózist okozó és mikózist nem okozó *S. 'boulardii'* izolátumok között

A probiotikum izolátumok közötti fenotípusos eltérések megállapításához, először a telepmorfológiát vizsgáltuk. Tíz napos inkubációt követően a telepek sima felszínűek és fehérek voltak az összes izolátumnál. Azonban a telepek öregedésének vizsgálatakor eltérő fenotípusok jelentek meg, a fungémiát okozó izolátumoknál pedig komplex telepmorfológiát figyeltünk meg. A mitokondriális "petite" mutánsok aránya jellemzően kicsi volt: 0–1,22% között mozgott, és az izolátum csoportok

között nem volt szignifikáns eltérés. Egyik izolátum sem spórázott a vizsgált hőmérsékleteken (25°C és 37°C), de a MAT lókusz tipizálás megerősítette, hogy mindegyik izolátum homotallikus. Továbbá mindegyik izolátum ”non-killer” és szenzitív volt az 1 és 2 típusú killer toxinokra [Társszerzői eredmények (petite-teszt, MAT lókusz tipizálás, killer teszt): Dr. Pfliegler Valter Péter, Molekuláris Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszék]. A telepek egyik esetben sem voltak invazívak függetlenül a táptalaj típusától vagy az inkubáció során alkalmazott hőmérséklettől, valamint flokkuláció sem volt megfigyelhető, a pszeudohifás növekedés pedig táptalaj függő volt. A spot-plate módszer eredményei alapján az izolátumok telepeinek növekedése azonos volt, 37 °C és 39 °C-on, 42 °C-on viszont a PY0001 és PY0002 izolátumok esetében a telepek intenzívebb növekedést mutattak a többi izolátumhoz képest, a 2251/2018 izolátum pedig nem mutatott növekedést.

5.6 A kereskedelmi, mikózist okozó, és mikózist nem okozó *S. ‘boulardii’* izolátumok extracelluláris virulencia faktorai (extracelluláris foszfolipáz és aszpartát proteáz termelés, hemolitikus aktivitás)

Fenotípusos klaszterezés alapján két fő csoportot tudtunk megkülönböztetni: Az egyikben kisebb volt a proteáz termelés és a β-hemolízis mértéke, valamint nagyobb volt a foszfolipáz termelés, a másikban ezek ellenkezője volt jellemző. Azonban, ha a virulencia faktorokat külön értékeltük, statisztikailag szignifikáns eltéréseket találtunk az egyes csoportok között. A Tukey HSD teszt alapján a mikózist nem okozó klinikai izolátumok szignifikánsan ($p < 0,05$) kisebb *Prz* (proteáz zóna) értékekkel rendelkeztek, mint a kereskedelmi izolátumok, tehát nagyobb volt a proteáz termelésük. Ugyanezeknél az izolátumoknál a *Pz* (foszfolipáz zóna) értékek átlaga szignifikánsan nagyobb volt ($p < 0,01$), ami azt jelenti, hogy ennél a csoportnál volt a legkisebb a lipáz termelés mértéke. A csoportok között nem volt szignifikáns eltérés az α-hemolízis esetében, de a β-hemolitikus aktivitás a mikózist okozó klinikai izolátumoknál szignifikánsan nagyobb volt ($p < 0,01$) a kereskedelmi és mikózist nem okozó izolátumokkal összehasonlítva.

5.7 Antifungális szerekkel szembeni érzékenység

Az antifungális szerekkel szembeni érzékenység tesztelésekor a kereskedelmi izolátumok nagyobb kaszpofungin MIC értékeket mutattak a mikózist nem okozó izolátumokhoz képest. Az MIC értékek alapján a minták két klaszterbe sorolhatóak. Az amfotericin B-nél kapott értékek 0,125–0,25 µg/mL között voltak (a nagyobb érték a PY0003 kivételével az összes izolátumra igaz volt). A flukonazol esetében az értékek 2–8 µg/mL között változtak (az izolátumok felénél az MIC érték 8 µg/mL volt), míg a kaszpofunginnál kapott értékek 0,25 vagy 0,5 voltak [Társszerzői eredmény (érzékenység tesztelése antifungális szerekre): Dr. Kovács Renató, Orvosi Mikrobiológiai Intézet].

5.8 Interakció az epitéliummal (adhézió, károsítás, transzmigráció), morfológia

A vizsgálatok során azt találtuk, hogy egyik izolátum sem tapadt az epitélium modellhez [Társszerzői eredmény (adhéziós vizsgálatok): Dr. Pfliegler Valter Péter, Molekuláris Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszék], valamint az MTT assay egyik esetben sem mutatott 17%-nál nagyobb károsodást a Caco2-sejteken [Társszerzői eredmény (MTT assay): Dr. Nemes Dániel, Gyógyszertechnológiai Tanszék]. Transzmigráció szintén nem volt jellemző a *S. 'boulardii'* izolátumokra, a DE3912 és 551/2018 mikózist nem okozó izolátumokat kivéve, amik négy, illetve hat nap elteltével átjutottak az epitéliumon. Biofilm képzés hat nap elteltével sem volt megfigyelhető. A kísérletekben DMEM táptalajt használtunk, melyben az izolátumok élesztő morfológiát mutattak, illetve rövid pszeudohifákat képeztek. A pozitív kontrollként használt *C. albicans,* szemben a probiotikus élesztőkkel, adhéziót, károsodást és gyors transzmigrációt (mely hifa növekedéssel is társult) is mutatott ennél a modellnél.

5.9 Immunológiai interakciók (moDC-k fagocitózisának és sejtfelszíni molekuláinak, a citokin/kemokin szint, valamint a T-sejt aktiváció vizsgálata)

A moDC-k fagocitózis aktivitásának vizsgálatakor szignifikáns donor-függő különbségek nem voltak, illetve a kereskedelmi és mikózist okozó izolátumok között sem volt szignifikáns különbség a moDC-k fagocitózis aktivitás mérésekor (Immunológiai Intézet munkatársaival közösen kapott eredmények).

Az élesztőkkel való együttinkubálást követően a következő sejtfelszíni molekulák változását vizsgáltuk a moDC-k felszínén: kostimulációs fehérjék (CD40, CD80, CD86), CD83 érési marker, és a HLA-DQ antigén prezentáló fehérje. Ebben az esetben is vizsgáltuk a donorfüggő különbségeket, valamint összehasonlítottuk a kereskedelmi és mikózist okozó izolátumoknál kapott fluoreszcencia változásokat [Immunológiai Intézet munkatársaival (Dr. Pázmándi Kitti, Dr. Fekete Tünde) közösen kapott eredmények]. A HLA-DQ kivételével azt találtuk, hogy a különböző donorokból származó DC-k eltérően reagáltak az élesztőkkel történő együttinkubálásra, tehát a sejtfelszíni molekulák mennyisége nagyban függött a donortól. A két izolátumcsoport összehasonlításakor nem találtunk szignifikáns különbséget egyik DC sejtfelszíni marker esetében sem. Meghatároztuk a proinflammatorikus citokinek (IL-6, IL-12, IL-1β, TNF-α) és az IL-8 kemokin koncentráció változásait is a sejtek felülúszójában. A különböző donoroktól származó DC-k között szignifikáns eltérések voltak, azonban a kereskedelmi és mikózist okozó izolátumcsoportok összehasonlításakor nem találtunk szignifikáns eltérést.

A T-sejt aktivációs és polarizációs tesztek nem csak szignifikáns donor dependens különbségeket tártak fel, hanem azt is, hogy a mikózist okozó izolátumok szignifikánsan indukálták

(kétmintás T-próba, $p < 0,05$) az IL-17 termelést a kereskedelmi izolátumokkal összehasonlítva [Társszerzői eredmények (citokinek és T-sejt aktiváció vizsgálata): Dr. Pázmándi Kitti, Dr. Fekete Tünde, Immunológiai Intézet].

Az immunológiai vizsgálatok alapján a fenotípusos klaszterezés egyértelműen megkülönböztette a kontroll *C. albicans*-t a *S. 'boulardii'* izolátumoktól, utóbbit pedig két klaszterre bontotta. A magasabb immun aktivációt kiváltó klaszterbe két kereskedelmi és a két mikózist okozó izolátum tartozott.

5.10 *G. mellonella* lárva infekciók

A *G. mellonella* lárvamodellt használva összehasonlítottuk a 14 probiotikum izolátum, és az izolátumcsoportok (kereskedelmi, mikózist nem okozó, mikózist okozó) patogenitását a PBS és patogén *C. albicans* kontrollokkal. A mikózist nem okozó izolátumok szignifikánsan alacsonyabb patogenitást mutattak, mint a mikózist okozó vagy a kereskedelmi izolátumok. Ezen csoporton belül az izolátumok között két esetben volt statisztikailag jelentős különbség. Minkét ilyen eset során az egyik szignifikánsan eltérő izolátum a mikózist nem okozó 2251/2018 volt, melynél nagyon jelentős volt a lárvatúlélés.

5.11 Virulencia és túlélés immunszuppresszált BALB/c egérmodellben

Az egérkísérleteknél kereskedelmi izolátumok között nem volt szignifikáns a különbség ($p > 0,05$), a klinikai izolátumokat egymással összehasonlítva viszont szignifikáns különbségeket találtunk ($p < 0,01$). Egyes izolátumok kifejezetten magas virulenciával rendelkeztek: 465/2018 (28% túlélés), DE45866, DE42533, 2251/2018 (42% túlélés).

A vesék gombaterhelése nem különbözött szignifikánsan a kereskedelmi izolátumok esetében ($p > 0,05$), a klinikai izolátumok közül viszont a DE27020, DE6507 és a DE35762 izolátumok esetében a CFU értékek szignifikánsan [$p < 0,01$ (DE27020); $p < 0,01$ (DE6507); $p < 0,01$ (DE35762)] alacsonyabbak voltak, mint a 2251/2018 izolátum esetében. A kereskedelmi és klinikai törzsek nem különböztek statisztikailag szignifikánsan egymástól, azonban az egyes izolátumcsoportok már igen. A mikózist nem okozó izolátumok esetében szignifikánsan [$p < 0,01$ (C); $p < 0,001$ (M)] nagyobb CFU értékek voltak megfigyelhetőek a kereskedelmi és mikózist okozó izolátumokhoz képest [Társszerzői eredmény (egérfertőzések): Dr. Kovács Renató, Orvosi Mikrobiológiai Intézet].

5.12 A génkiütéses kísérletekben vizsgált probiotikus élesztők genomi hátterének összehasonlítása

A filogenomikai dendrogram és SNP-hálózat egyaránt megmutatta, hogy a *S. 'boulardii'* izolátumok nagymértékben hasonlóak egymáshoz, valamint Peter és mtsai. (2018) *S. 'boulardii'* CIM törzséhez. Az izolátumok a PY0001 referenciához képest nagyjából 3000 variáns pozíciót tartalmaznak a több mint 11 millió bp-t kitevő genomban, melyek nagy része heterozigóta SNP volt. Megjegyzendő, hogy a PY0001 rövid olvasatainak elemzése is mutatott ki SNP-ket a PY0001 referenciára való térképezéskor, ezek gyakorlatilag minden esetben heterozigóta pozíciók voltak (melyek a haploid genomösszeillesztés használata miatt SNP-kként jelentkeztek a valójában diploid élesztő térképezése után). A két kereskedelmi izolátum mutatkozott a leghasonlóbbnak az izolátumok közül [Társszerzői eredmény (Maximum Likelihood filogénia): Dr. Pfliegler Valter Péter, Molekuláris Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszék].

A térképezési fájlokból létrehozott lefedettségi ábrák, illetve a kromoszómákra ábrázolt allélarányok alapján megállapítottuk, hogy mind a hat izolátum diploid, euploid genommal rendelkezik, és nem mutatnak szegmentális duplikációkat vagy nagy deléciókat. Az egyes PY0001 referenciában megtalálható gének, illetve a környezetükben megtalálható gének medián lefedettsége alapján meghatároztuk mind a 6 izolátumban a gének kópiaszámát. Mindössze 10 génben találtunk kópiaszám-eltéréseket (1 vagy 2 kópia haploid genomonként), melyek nyolc különböző kromoszómán helyezkedtek el, és izolátumonként 1–5 ilyen gén volt jelen a genomban. A CNV-ben érintett gének közül hét kétséges ORF, illetve nem jellemzett gén volt. Emellett a *YDL069C* (*CBS*; mitokondriális légzési lánc III. komplex összeszerelése), a *YLR211C* (*ATG38*; makroautofágiával kapcsolatos gén) és a *YPR166C* (*MRP2*; mitokondriális transzlációban szerepet játszó) géneknél voltak kópiaszámbeli különbségek. A *HMX1* egykópiás gén volt (haploid genomra nézve) mindegyik élesztőben.

Peter és mtsai. (2018) munkája alapján a teljes pángenom ORF-gyűjteményre való térképezésből megállapítottuk a sejtenként, haploid genomra kalkulált mitokondrium DNS, 2μ plazmid, rDNS és transzpozon kópiaszámot. Az izolátumokban 17–25 mitokondriális genom jelenlétét kalkuláltuk haploid genomonként, a plazmidszám nagyobb skálán, 31 db és 58 db között változott. Az rDNS kópiái a legtöbb esetben 60–90 közé estek. A Ty2 retrotranszpozonokból 15–16 kópiát állapítottunk meg, a Ty5-ből egységesen 2-t minden izolátumban. A 6 izolátum tehát a gének és egyéb jellemzők kópiaszámát tekintve is nagyfokú hasonlóságot mutatott.

A variánsanalízis során meghatározott allélek AD értékei, valamint a szoftver által identifikált genotípusok alapján ábrázoltuk az allél lefedettségi arányok változásait a kromoszómákon. Valamennyi esetben a heterozigóta pozíciók csoportosulása volt megfigyelhető elsősorban a I–VI kromoszómákon, illetve a X, XII, XIII. kromoszómán. A VIII. és XIV. kromoszómák viszont gyakorlatilag teljesen homozigóták voltak.

A genotípus értékek alapján meghatároztuk, hogy hol vannak a PY0001 izolátumhoz képest olyan helyek az 5 másik törzs genomjában, melyek hosszabb LOH vagy GOH eseményekre utalnak. A megszekvenált és összeállított PY0001 izolátum heterozigóta pozíciói nagyrészt az I-VI (a IV. kromoszóma esetében csak a kromoszóma bal karján), X, XII és XIII kromoszómán csoportosultak. Összességében nézve a kromoszómákon csekély volt a heterozigóta pozíciók aránya és nagyméretű homozigóta régiók voltak alapvetően jellemzőek a genomra (például a VIII és XIV kromoszómák majdnem teljesen homozigóták voltak). A többi 5 izolátum mindegyikénél találtunk GOH, illetve LOH régiókat 7 különböző kromoszómán. A PY0002 esetében ez mindössze egy rövid régiót jelentett, a többi négy, klinikai izolátumnál ennél jelentősen több, illetve hosszabb allélarány-változásokat találtunk. Összességében a heterozigótaságra vonatkozó eredmények különböztek a 6 izolátum között [Társszerzői eredmény (allélarány-változások vizsgálata): Dr. Pfliegler Valter Péter, Molekuláris Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszék].

Végül mind a hat szekvenált törzs esetén meghatároztuk, hogy mely variánsok okoznak a proteinkódoló génekben jelentős változásokat (pl. korai stop kodon, stop kodon elvesztése, leolvasási keret eltolódása) homo- vagy heterozigóta formában. A nagy hatású mutációk összesen 90 gént érintettek, az összes izolátumot figyelembe véve. A PY0001-ben az érintett gének azok voltak, amelyek heterozigóta mutációkat tartalmaztak (megjegyzendő, hogy a térképezéshez használt referenciagenom a PY0001 sajátja volt, ezért ennél az élesztőgenomnál csak heterozigóta variánsok várhatók). Ebből a 90 génből 43 nem volt érintett mind a hat izolátumban egyszerre, és így a genetikai háttér különbségeit mutatja. Ezek közül összesen 30-hoz rendelhető jól körülhatárolt funkció az S288c referencia szekvenciával való homológia alapján. Az érintett gének közül a *GLT1* és az *SLX5* kölcsönhatásba lépnek a *HMX1*-gyel *Saccharoymces* Genome Database (SGD) alapján. Az előbbi génben a mutáció minden izolátumban heterozigóta formában volt, míg az *SLX5* nem volt érintett a PY0001-ben, és homozigóta volt a másik öt genomban.

A génfunkciót befolyásoló mutációs hatások elemzésekor 497 gént azonosítottunk (ebből 30 kétes ORF volt), melyek mérsékelt mutációkat (pl. egyetlen aminosav szubsztitúció) tartalmaztak. A nagy hatású mutációkhoz hasonlóan az azonosított variánsok többsége minden izolátumban megtalálható volt (a PY0001 esetében kizárólag heterozigóta, a többi izolátumnál pedig leggyakrabban heterozigóta formában). Összesen 73 olyan gén volt, ami csak egyes, de nem minden izolátumban volt érintve. A közepes hatású mutációkkal rendelkező gének közé tartozik a *CHK1, ESS1, GLT1, IME1, KCH1, LGE1, MXR1, PPR1, SPB4* és *CST6,* melyek kölcsönhatásba lépnek a *HMX1*-gyel az SGD alapján. A közepes hatású mutációkat tartalmazó gének heterozigóta formában voltak meg az izolátumok többségében, de a DE35762 homozigóta volt a *CHK1* a DE6507 pedig az *LGE1* mutációra. A *HMX1*-et és annak közvetlen upstream régióját nem befolyásolta semmilyen módosító, közepes vagy nagy hatású mutáció a variáns annotáció szerint egyik izolátumban sem.

A *HMX1*-el kölcsönhatásban lévő, nagy, vagy közepes mutációk által érintett 11 gén esetében a GO Term analízis a sejtmagban található fehérjék feldúsulását ($p < 0,05$) mutatta ki. Ezen felül a *HMX1*-gyel kölcsönhatásba lépő géneket nem érintik szignifikánsan nagyobb vagy kevesebb eséllyel mutációk, mint a vele nem kölcsönhatásban lévő géneket (Fischer-egzakt teszt, $p > 0,05$).

5.13 A *HMX1* sikeres, CRISPR/Cas9-rendszeren alapuló deléciója

Az Anyagok és Módszerek fejezetben ismertetett előkészületek és transzformálás után telepeket izoláltunk a kísérletbe bevont, transzformált élesztőkből, majd a *HMX1* géndeléció sikerességét PCR-rel ellenőriztük, mely során egyrészt a teljes ORF amplifikálását elvégeztük (a géndeléció tényének igazolására), másrészt a ”repair” DNS kazetta (rDNS) helyes beépülését is igazoltuk, egy kazettára specifikus primer használatával. Gélelektroforézissel igazoltuk, hogy a *HMX1* gén csak a vad típusú izolátumokban található meg, amit egy 1553 bp méretű sáv jelzett. A deléciós mutánsok esetében egy sokkal rövidebb, 682 bp hosszú sáv volt látható. Ennek az az oka, hogy az ellenőrzéshez használt primerek a *HMX1* ORF-től ”upstream” és „downstream” helyezkednek el, így a deléciós törzseknél is lesz PCR termék, viszont a gélelektroforézisnél kapott sáv rövidebb mérete jelzi a géndeléció sikerességét. A rDNS beépülésének ellenőrzésére olyan primereket használtunk, melyek a kazetta ”upstream” régióját amplifikálták (a ”forward” primer az inzerciós kazettától –417 bp távolságra, a ”reverse” primer pedig a kazettához kötődött). Ennek a primerpárnak az alkalmazásakor a vad típusú izolátumok esetében nem jelent meg sáv a gélen, szemben a deléciós törzsekkel, amiknél egy 437 bp méretű sáv volt látható. Tehát, a gélelektroforézis igazolta, hogy a gén kiütése mind a hat izolátumban sikeres volt.

5.14 A *HMX1* deléciója csökkentette a *S. ‘boulardii’* izolátumok szaporodási képességét vashiányos körülmények között

Korábbi tanulmányok kimutatták, hogy a *HMX1* deléciója zavart okoz a *S. cerevisiae* vasmetabolizmusában, emiatt vaséhezés esetén a sejtek nem képesek a sejten belüli hem tartalmú molekulákat vasforrásként használni. Ezért megvizsgáltuk a deléciós mutánsok szaporodását vaséhezés közben. Az alább ismertetett eredmények a ”spot-plate” második, 5×10^3 db sejtet tartalmazó telepeire vonatkoznak.

40 µM BPS alkalmazásakor a legtöbb mutáns törzs (AI0001, AI0003, AI0005 és AI0009) szignifikánsan ($p < 0,001$; $p < 0,001$; $p < 0,05$ és $p < 0,001$; ebben a sorrendben) kisebbek voltak a vad típusú izolátumokkal összehasonlítva. Az AI0007 törzs telepei szintén kisebbek voltak, mint a 2251/2018 izolátumé, azonban ez a különbség nem volt szignifikáns ($p > 0,05$). Érdekes módon az

AI0011 deléciós mutáns szaporodása szignifikánsan nagyobb volt, mint a DE35762 vad típusú izolátumé, amiből származott. A mutáns törzsek közül az AI0001, AI0003, AI0005 és AI0007 szaporodása szignifikánsan ($p < 0,01$; $p < 0,01$; $p < 0,001$; $p < 0,001$) gyengébb volt a vad típusú izolátumokhoz képest 80 µM BPS hozzáadása esetén. A telepek növekedésbeli különbsége nem volt szignifiáns ($p > 0,05$) a DE6507 és AI0009 törzsek között, de utóbbi növekedése gyengébb volt. Az előző körülményekhez hasonlóan az AI0011 szaporodása jelentősen ($p < 0,001$) nagyobb volt az eredeti törzzsel (DE35762) összehasonlítva. 120 µM BPS alkalmazásakor a legtöbb törzs nem szaporodott, vagy szaporodásuk elhanyagolható volt. A 465/2018 izolátum kivétel volt, mivel szaporodóképes volt. Az ebből az izolátumból származó *HMX1* deléciós mutáns (AI0005) nem volt képes szaporodni, így a telepek növekedése szignifikánsan különbözött ($p < 0,05$) a 465/2018 izolátumétól. Az eredmények alapján a vaséhezés a deléciós törzsek többségénél gyengébb szaporodással társult. Az AI0011 törzs esetében ez nem volt igaz, mivel szaporodási képessége szignifikánsan nagyobb volt, mint a vad típusú DE35762 izolátumé. Ennek oka feltételezhetően az eltérő genetikai háttér lehet.

Mindezen felül az izolátumcsoportokat is összehasonlítottuk. A vad típusú izolátumok összehasonlításakor azt találtuk, hogy a mikózist nem okozó izolátumok jelentősen jobban nőttek a kereskedelmi és mikózist okozó csoportokhoz képest, mindegyik BPS koncentráció alkalmazásakor (40 µM: $p < 0.01$; 80 µM: $p < 0.01$; 120 µM: $p < 0.05$). A ΔΔ*HMX1* mutáns törzseknél szignifikáns ($p < 0,05$; ΔΔC < ΔΔNM) különbségeket találtunk a ΔΔkereskedelmi és ΔΔmikózist nem okozó csoportok között 40 µM BPS koncentráción. Amikor 80 vagy 120 µM BPS-t használtunk, nem volt szignifikáns eltérés a deléciós csoportok között.

A vad típusú izolátum csoportokat összehasonlítottuk a hozzájuk tartozó deléciós csoportokkal, és a szaporodásukra ugyanaz volt a jellemző, mint amikor a törzseket páronként hasonlítottuk össze: a deléciós csoportok szaporodóképessége kisebb volt a vad típusú izolátum csoportokhoz képest. Szignifikáns eltéréseket találtunk az összehasonlítások során az összes alkalmazott BPS koncentráción, melyek a következők voltak: <u>40 µM BPS</u>: $p < 0,001$, C > ΔΔC; $p < 0,01$, NM > ΔΔNM; <u>80 µM BPS</u>: $p < 0,001$, C > ΔΔC; $p < 0,01$, NM > ΔΔNM; és <u>120 µM BPS</u>: $p < 0,05$, NM > ΔΔNM. Hasonlóképpen, amikor az összes vad típusú izolátumot hasonlítottuk össze az összes deléciós mutánssal, az utóbbi csoport gyengébb szaporodást mutatott, és ez a különbség 80 µM ($p < 0,001$) és 120 µM ($p < 0,001$) BPS mellett volt szignifikáns. Tehát, az izolátum csoportok öszehasonlítása alapján a *HMX1* gén kiütése a legtöbb esetben gyengítette a törzsek szaporodási képességét vaséhezés esetén, habár ezek a különbségek nem mindig voltak szignifikánsak.

A BPS mellett a vad típusú és *HMX1* deléciós mutánsok szaporodását 50% RPMI-1640-et és 50% humán szérumot tartalmazó folyékony tápközegben is összevetettük, amely az élesztő által felhasználható szabad vasat nem tartalmazott. Szignifikáns különbség volt megfigyelhető a PY0001, PY0002, 465/2018 és DE35762 izolátumok szaporodási képességében, összehasonlítva őket a

génkiütött mutáns párjaikkal ($p < 0{,}001$, $p < 0{,}01$, $p < 0{,}05$, ill. $p < 0{,}0001$). Érdekes módon ezen izolátumok közül háromban (465/2018, 2251/2018 és DE35762) a mutáns törzsek szaporodása nagyobb volt 24 óra elteltével, míg a többi esetben a deléciós törzs szaporodási képessége gyengébb volt. A 2251/2018-as izolátum is gyengébb szaporodást mutatott, viszont a különbség statisztikailag nem volt szignifikáns az AI0007 mutáns törzshöz képest. Az AI0009 szaporodása minden ismétlésben kisebb volt, mint a DE6507 izolátumé, azonban a különbség nem volt szignifikáns [Társszerzői eredmény (szaporodás vizsgálata szérumban): Tóth Zoltán, Orvosi Mikrobiológiai Intézet].

5.15 A hemolitikus aktivitást nem befolyásolta *HMX1* deléciója

A hemolitikus aktivitás mérésével azt kívántuk megvizsgálni, hogy az α- és β-hemolitikus indexek alapján elkülöníthetőek-e, illetve azonosíthatóak-e virulens izolátumok, másrészt pedig a *HMX1* gén hiányának a hemolitikus aktivitásra gyakorolt hatását kívántuk felmérni. Amikor a deléciós mutáns törzseket a vad típusúakkal páronként hasonlítottuk össze, akkor a mikózist nem okozó 2251/2018 ($p < 0{,}01$; 2251/2018 > AI0007; α-hemolízis), a mikózist okozó DE6507 ($p < 0{,}05$; DE6507 < AI0009; α-hemolízis), és a kereskedelmi PY0001 ($p < 0{,}01$; PY0001 > AI0001; β-hemolízis) izolátumok esetében találtunk szignifikáns különbséget a hemolitikus aktivitásban. Így a törzsszintű összehasonlítások nem tártak fel egyértelmű hatást, amit a *HMX1* hiánya okozott volna. Az izolátumcsoportok összehasonlításakor sem az α- sem a β-hemolízis értékekben nem volt szignifikáns különbség.

5.16 A *HMX1* deléciója szignifikánsan magasabb gombaterhelést eredményezett immunszuppresszált BALB/c egerek veséjében

A vad típusú izolátumok az egérkísérletek során eltérő virulenciát mutattak, ami szignifikáns volt ($p < 0{,}0001$). A legnagyobb halálozás (28% túlélés) a 465/2018 izolátum esetében volt megfigyelhető, de a 2251/2018 izolátum is kiemelkedő halálozást (<45% túlélés) okozott. Érdekes módon a *HMX1* kiütése a törzsek közötti szignifikáns különbségeket eltüntette ($p > 0{,}05$). A vad típusú és deléciós törzsek páronkénti összehasonlításakor azt találtuk, hogy a génkiütés csak két izolátum (PY0001, DE35762) esetében okozott szignifikáns változást (mindkét esetben növekedést) a virulenciában (PY0001: $p < 0{,}05$; DE35762: $p < 0{,}01$).

A vesékben lévő élő élesztő sejtek számát [vesék gombaterhelése, CFU/vesetömeg (g)] szintén meghatároztuk. A statisztikai analízis alapján a 465/2018 izolátumot kivéve, az összes vad típusú izolátum esetében a CFU értékek szignifikánsan kisebbek voltak, mint a deléciós mutánsok esetében. A mutáns törzsek közül az AI0003 törzs esetében voltak a legnagyobbak a CFU értékek [Társszerzői

eredmény (fertőzés vadtípusú izolátumokkal): Dr. Kovács Renató, Orvosi Mikrobiológiai Intézet]. A deléciós törzsekkel való fertőzést, illetve az egerek boncolását pedig az Orvosi Mikrobiológiai Intézet munkatársaival (Dr. Kovács Renató, Dr. Nagy Fruzsina, Tóth Zoltán, Forgács Lajos) együtt végeztem.

6. DISZKUSSZIÓ

6.1 A *S. 'boulardii'* kimutatása egy új PCR alapú módszerrel

A PCR alapú fajazonosítási módszerek, valamint a szubtipizálásra használt PCR-fingerprinting módszerek egyaránt alkalmazhatóak az élelmiszer és klinikai mikrobiológiában az időigényes diagnosztikai tesztek helyettesítésére vagy kiegészítésére. Az élelmiszer és klinikai izolátumok fajon belüli diverzitása az utóbbi időben nagy figyelmet kapott. A *S. cerevisiae* széleskörben használt mikróba az élelmiszeriparban, azonban opportunista patogénként is számontartják. A klinikai mikológiai diagnosztikában ritkán alkalmaznak szubtipizálási módszereket, pedig ez előfeltétele lenne annak, hogy megértsük, hogyan és miért okoznak fertőzéseket az élesztő tartalmú probiotikumok.

Az általunk leírt új multiplex PCR módszer alkalmas a fertőzést okozó probiotikum (*S. 'boulardii'*) élesztők pontos és gyors azonosítására, így akár a mindennapi diagnosztikában is alkalmazható lehet. A különböző genotipizálási módszerek alkalmazása eltérő eredményekhez vezethet, ezért a pontosabb eredmény érdekében érdemes az egyes módszerek kombinálása egyetlen, multiplex reakcióban. A módszerünket a Debreceni Egyetem Klinika Központja izolátum gyűjteményének felhasználásával optimalizáltuk öt, *S. cerevisiae* sejtmagban megtalálható gén szekvenálásával, az interdelta régiók elemzésével, MSP fingerprintinggel és mikroszatellita tipizálással. Ezek közül az általunk publikált módszerben az interdelta, két mikroszatellita, valamint az ITS régiót amplifikáltuk egyetlen multiplex PCR reakcióban. Az interdelta primerek a Ty1 és Ty2 transzpozonok LTR régióira (hosszú terminális ismétlődés) nézve specifikusak. Előbbi transzpozoncsoport hiányzik a probiotikus élesztőből irodalmi adatok és az általunk végzett genomannotáció alapján is, ami egyedi sávmintázatot eredményez a fingerprinting során. A vizsgálatainkban használt mikroszatellita allélok pedig specifikusak a *S. 'boulardii'* -ra. Érdemes megjegyezni, hogy az MLST, ami egyébként egy időigényes módszer, kis felbontású és heterozigóta INDEL mutációk esetén csak korlátozottan alkalmazható. A probiotikus élesztőkről ismert, hogy bár a MAT lókuszra heterozigóták, nem képesek spórázni, és ez a mi *S. 'boulardii'* izolátumainkra is igaz volt.

A multiplex módszerünk használatával a probiotikum izolátumok esetében jellegzetes sávmintázat jelenik meg gélelektroforézist követően, ami gyors vizuális kiértékelést tesz lehetővé automatizált gélanalízis pipeline alkalmazása nélkül is. A módszer pedig gyorsan alkalmazható, ha a fertőzést okozó mintákról már megállapításra került, hogy a *Saccharomyces* nemzetséghez tartozó élesztők. A MALDI-TOF a legelterjedtebb fajidentifikációs módszer a klinikai mikrobiológiai diagnosztikában. Mivel ehhez a módszerhez is élő mikroba telepeket használnak, a mi multiplex módszerünket közvetlenül lehet fajmeghatározásra, illetve szubtipizálásra alkalmazni a MALDI-TOF analízist követően egy kolónia PCR, majd egy gélelektroforézis elvégzésével. Úgy becsüljük, hogy a

teljes munkafolyamat 3 órán belül megvalósítható, miután a MALDI-TOF eljárás *S. cerevisae*-ként azonosította az adott mintát. A gomba ITS specifikus primerek pozitív kontrollként szolgálnak a multiplex PCR-ben, arra az esetre, ha a mintát előzőleg hibásan identifikálták *Saccharomyces*-ként.

Az általunk optimalizált multiplex PCR segítségével kimutattuk, hogy probiotikum eredetű klinikai élesztők gyakran előfordulnak a *S. cerevisiae* izolátumok között. Ezek az izolátumok különböző humán testtájakról és több betegből származtak: 16 páciensből izolált 16 élesztőt azonosítottak (DE342, DE722, DE3912, DE6507, DE10397, DE11595, DE22293, DE27020, DE27290, DE29607, DE35762, DE42533, DE42651, DE42807, DE43763, DE45866) *S. cerevisiae*-ként MALDI-TOF-al a Debreceni Egyetem Klinikai Központjában az általunk vizsgált időszakban, melyek közül az egyiket rosszul határozta meg a kiértékelő szoftver. A hét probiotikum eredetű izolátum három női és négy férfi pácienstől származott. A páciensek kora jelentősen eltért, a csecsemőtől az időskorúig terjedt. A projekt időtartama alatt mindössze három fungémia fordult elő, ebből kettő probiotikum eredetű volt, a többi probiotikum eredetű izolátum pedig valószínűleg kolonizáló volt.

A probiotikumok hatását és biztonságosságát célzó kutatások még mindig elmaradnak a felhasználásuk mértékétől. A mi multiplex PCR módszerünkkel rövid időn belül és egyszerűen kideríthető, hogy egy élesztő fertőzés probiotikum eredetű-e vagy sem. Ez általánosságban véve elősegítheti az élesztő probiotikumok értékelését biztonságosság szempontjából. A módszer alkalmazásával megállapítottuk, hogy a mikózist okozó, illetve nem okozó *Saccharomyces* izolátumok jelentős része probiotikum eredetű. Ez a megfigyelés nemcsak a klinikai mikológusok számára lehet jelentős, hanem azon kutatók számára is, akik kórházban kezelt betegek mikobiomjának vizsgálatával, a mikrobiális diszbiózis jelenségével foglalkoznak, vagy éppen a probiotikus élesztők új terápiás alkalmazásait, felhasználási lehetőségeit kutatják, illetve fejlesztik.

6.2 A probiotikus élesztő interakciói a humán gazdaszervezettel

A probiotikum eredetű fertőzések előfordulásának ténye arra ösztönzött minket, hogy megvizsgáljuk a *S 'boulardii"* virulencia faktorait és gazda-mikroba interakcióit az Anoop és munkatársai (2015) által javasolt komplex módszertannal. A kísérletekben a klasszikus virulencia faktorokat (foszfolipáz szekréció, aszpartát proteáz szekréció, és hemolitikus aktivitás), a magas hőmérséklet tűrését, az immunaktivációt, illetve az élesztők Caco-2 epitélium modellel való interakcióit (adhézió, károsítás, transzmigráció), vizsgáltuk. Ezeken kívül más fenotípusos tulajdonságokat is vizsgáltunk, illetve a *G. mellonella* lárva fertőzési modellt és immunszupresszált egér fertőzési modellt használtuk a patogenitás *in vivo* felmérésére. A vizsgálatokhoz 14 izolátumot (kereskedelmi és klinikai izolátumokat egyaránt) használtunk, ami hasonló tanulmányokkal összehasonlítva kiemelkedően soknak számít. Utóbbiakban 1–2 probiotikum izolátum vizsgálata a jellemző. A célunk az volt, hogy

potenciális adaptációkat keressünk, mely elősegítheti a *S. 'boulardii'* túlélését, virulenciáját, és így patogén viselkedését az emberi szervezetben. Ennek az élesztőnek a fenotípusát, interakcióit humán epitélium-, illetve immunsejtekkel, patogén baktériumokkal és élesztőkkel, valamint kísérleti állatokkal korábbi tanulmányokban már részletesen vizsgálták. Ezen felül több tucat esettanulmány született, amik úgy írnak a probiotikus élesztőről, mint patogén ágensről. Azonban legjobb tudomásunk szerint ezidáig még nem volt olyan tanulmány, ami nemcsak probiotikumként forgalmazott törzset jellemzi, hanem összehasonlítja azt más izolátumokkal, melyek a humán szervezetben potenciálisan evolválódtak (az egyik korábbi tanszéki munkát leszámítva, melyben egy probiotikum izolátum jellemzésre került). A gombák fenotípusos tulajdonságai nem csak a kolonizációs és fertőzési képességet határozzák meg, hanem szelekció alá is kerülnek a gazdaszervezet egyes anatómiai niche-eiben. Kevés olyan kutatást végeztek, amelyben a *S. cerevisiae*-t ilyen tekintetben vizsgálták volna.

Az általunk felhasznált kereskedelmi és klinikai izolátumok egyetlen geográfiai régióból, Kelet-Magyarországról származtak. Ezekben a vizsgálatokban a multiplex módszerfejlesztésbe bevont élesztőkön kívül három további, szegedi klinikai izolátumot is fel tudtunk használni, így összesen tíz klinikai és négy kereskedelmi élesztőt vizsgáltunk. A törzsek fenntartásánál minimalizáltuk az átoltások számát (a kísérletek előtt csupán két átoltásra került sor) annak érdekében, hogy elkerüljük a mutációk és genom struktúra variációk akkumulációját a tenyésztés során. Továbbá, mivel a klonális heterogenitás jelen lehet akár egy adott sarzson belül is (kereskedelmi élesztő), mindkét, Magyarországon kapható kereskedelmi probiotikus élesztőből két szubklón izolátumot használtunk. A részletes adatok a páciensekről és az izolátumokról lehetővé tették számunkra a mikózist okozó és nem okozó izolátumok összehasonlítását. Az eredmények alapján tett megállapításokat az alábbi fejezetekben részletesen kifejtjük.

6.2.1 Nincs jelentős különbség az *in vitro* virulencia faktorok termelésében a *S. 'boulardii'* izolátumok csoportjai között

A 14 izolátum variabilitást mutatott egyes fenotípusos tulajdonságokban, valamint az opportunista patogén *C. albicans* esetében ismert extracelluláris virulencia faktorok esetében is. Az α-hemolízis esetében a kereskedelmi izolátumok az első nap elteltével nagyobb hemolitikus aktivitást mutattak, mint a másik két csoport izolátumai. A mikózist okozó izolátumok csak a β-hemolízisben mutattak nagyobb aktivitást a kísérlet 3 napján. Ezen felül a kereskedelmi izolátumok szignifikánsan több foszfolipázt termeltek, mint a mikózist nem okozó izolátumok, amik viszont aktívabb extracelluláris proteáz termelést mutattak. Az eredmények alapján tehát a mikózist okozó izolátumok általánosságban véve nem voltak kiemelkedőek az extracelluláris virulencia faktorok termelésében annak ellenére, hogy ezeket a tulajdonságokat fontosnak tartják az élesztő fertőzések kialakulásakor. Ez

igaz volt a többi virulenciával öszefüggésbe hozható tulajdonságra is, mint például a pszeudohifa képzés, valamint a magas hőmérséklet tűrése, mely utóbbi két kereskedelmi izolátumra (PY0001, PY0002) volt jellemző. Érdemes megjegyezni, hogy a 2251/2018 mikózist nem okozó izolátum eltért a többi vizsgált élesztőtől: kicsi pszeudohifa képző képesség, és közepes termotolerancia jellemezte.

6.2.2 A *S. 'boulardii'* kiemelkedően rezisztens rendelkezik a flukonazollal szemben

Az antimikotikum rezisztencia vizsgálatok alapján az izolátumok többsége azonos érzékenységet mutatott az amfotericin B-vel és a kaszpofunginnal szemben. A *Candida* fajokra az amfotericin B CLSI MIC küszöbérték 1 µg/mL fölött van, ami egy négyszer nagyobb érték, mint a legnagyobb, amit a mi izolátumainknál mértünk. A kaszpofungin rezisztencia küszöbértékek a *Candida* fajoknál nagymértékben variábilisak, ami megnehezíti az összehasonlítást az általunk mért értékekkel. A flukonazol esetében a legtöbb *Candida* fajnál ≥8 µg/mL MIC érték mérésekor beszélhetünk rezisztenciáról. A mi esetünkben hét *Saccharomyces* izolátum érte el ezt a határértéket, melyek között mindkét vérizolátum is szerepelt.

6.2.3 Az élesztő és bélepitélium sejtek között kimutatható kölcsönhatás elhanyagolható

Korábbi tanulmányokban *in vitro* Caco-2 epitélium modell segítségével demonstrálták, hogy sem a kereskedelmi, sem a klinikai *S. cerevisiae* izolátumok (beleértve egy *S. 'boulardii'* probiotikum mintát is) nem képesek áthatolni a bélepitéliumon 48 óra elteltével. Ez összhangban van az általunk kapott eredményekkel, mivel még 6 nap elteltével sem tapasztaltuk az élesztő sejtek átjutását az alkalmazott epitélium modellen. Két izolátum (DE3912, 551/2018) átjutott ugyan, de ennek mértéke elenyészően kicsi volt. Egy másik kutatás során azt találták, hogy kis mértékben bár, de a *S. cerevisiae* képes az epitéliumon való átjutásra, de itt nem használtak *S. 'boulardii'* izolátumokat. Fontos megjegyezni, hogy Klingberg és munkatársai azt figyelték meg, hogy a polarizált, egyrétegű Caco-2 sejtrétegek TEER értéke nőtt a *S. cerevisiae* epitéliumra leoltását követően, ami az epitélium "barrier" funkció megerősödését jelentheti és ezt fontos probiotikus tulajdonságként tartják számon. Azonban ugyanilyen kísérleti körülmények között mi azt találtuk, hogy a TEER érték növekedése pusztán az akkumulálódó, nem adherens élesztősejttömeg miatt történik, ami egy tápoldat cserénél könnyen leválik az epitéliumról. Emiatt a probiotikus élesztőnek valószínüleg nincs hatása az epitélium elhatároló képességére *in vivo* körülmények között. Izolátumaink nem károsították az általunk alkalmazott epitélium modellt. Összességében tehát, az általunk tesztelt izolátumok patogén jellegű interakciói az epitéliummal elhanyagolhatóak voltak.

6.2.4 A *S. 'boulardii'* izolátumok hasonló immunaktivizáló hatással rendelkeznek

Teszteltük azt is, hogy az élesztők milyen hatással vannak a differenciált humán DC sejtek, és T-sejtek működésére. A vizsgálatba bevont egyes élesztő izolátumok hatása az immunválaszra, vagy a DC-k általi fagocitózis mértéke nem különbözött jelentősen, viszont korábbi tanulmányunkhoz hasonlóan a különbségek sokszor donorfüggőek voltak. Az élesztő probiotikum interakciói a veleszületett és adaptív immunrendszerrel nem csak fertőzés esetén lehetnek fontosak, hanem amiatt is, hogy a probiotikus termékek képesek a gazdaszervezet immunrendszerének működését előnyösen befolyásolni, modulálni, ezáltal kifejtve a szervezetre jótékony hatásukat. Például számos tanulmány beszámolt már a *S. 'boulardii'* gyulladáscsökkentő hatásáról a bélrendszerben, amelyet a DC-k funkcióinak modulálásán keresztül ér el. Az élesztők akár törzsenként eltérő hatást gyakorolhatnak a bélrendszer inflammatorikus vagy proinflammatorikus válaszaira. Az élesztők immunogenitása összefügg a törzsek sejtfal-összetételével, azonban az, hogy az immun modulációs képesség hogyan változik a kommenzalista-patogén tranzíció során még nem teljesen tisztázott a *Saccharomyces* fajok esetében. Specifikus sejtfal struktúrák, mint például a mannánok felismerése szerepet játszik a káros (pl. *C. albicans*) és alapvetően ártalmatlan (pl. *S. 'boulardii'*) élesztők megkülönböztetésében és felismerésében. Hatékony evolúciós stratégia lehet ezek alapján az, ha egy kommenzalista vagy egy probiotikum törzs úgy folytat patogén életmódot, hogy közben megtartja azokat a tulajdonságokat, amik alapján az immunrendszer "ártalmatlan"-ként ismeri fel. Lehetséges, hogy a kutatásunkban használt fungémiát okozó probiotikus izolátumok számára részben ez teszi lehetővé az életbenmaradást a véráramban. A többi vizsgált faktorral ellentétben azonban a két mikózis izolátum a kereskedelmi izolátumokkal összehasonlítva jelentős Th-17 polarizációt idézett elő, ami nagyobb gyulladásos immunaktivációt jelezhet.

6.2.5 Variábilis virulencia *in vivo* lárva és egérmodellben

A legtöbb tanulmányban a probiotikus élesztő virulenciáját nagyrészt *in vitro* vizsgálatok alapján mérik fel, azonban ez a megközelítés pontatlan és félrevezető lehet. Ezért, hogy meghatározzuk a virulencia mértékét az egyes törzsek esetében, rovar és emlős állatmodellt is alkalmaztunk.

A *G. mellonella* lárva fertőzési kísérletekben meglepő módon a probiotikum termékekből származó izolátumok mutatták a legnagyobb patogenitást, nem pedig a klinikai minták. Bár a *Galleria* lárvák fertőzése általánosan használt módszer a patogén gombák jellemzésekor, vizsgálatainkba a humán szempontból sokkal relevánsabb emlős modellt is bevontunk, és a 14 *S. 'boulardii'* élesztőizolátummal immunszupresszált egereket is fertőztünk. Ennek során az egerek életbenmaradását és az élesztők általi kolonizációt is vizsgáltuk a vesék gombaterhelésének meghatározásával. A

kereskedelmi izolátumok esetében nagy volt az egerek túlélési aránya, a klinikai izolátumok között viszont már voltak nagy virulenciával jellemezhető izolátumok: 465/2018 (28% túlélés), DE45866, DE42533, 2251/2018 (42% túlélés). A várakozásokkal ellentétben tehát nem a vérizolátumok (DE6507, DE35762) mutattak nagy virulenciát egérben, hanem néhány, a mikózist nem okozó csoportba tartozó izolátum. Mindezek alapján a lárva és egérmodellben kapott eredmények nem adtak hasonló eredményt. Fontos megjegyezni, hogy a *Saccharomyces* élesztőket vizsgáló tanulmányokban nem jellemző a lárva és az egérmodell együttes alkalmazása és tárgyalása. Nem tudunk olyan publikációról, ami a két *in vivo* modell egymásnak való megfeleltethetőségét vizsgálta volna *Saccharomyces* élesztők esetében, így egy ilyen, a két állatmodellt összehasonlító tanulmány mindenképpen hasznos lenne a későbbiekben. Ennek hiányában az egérmodell esetében kapott eredményeket sokkal relevánsabbnak tartjuk humán szemszögből.

6.2.6 A *S. 'boulardii'* fungémia kialakulásának hátterében valószínűsíthetően a betegek egészségügyi állapota fontos tényező

Az egyik legérdekesebb eredményünk az volt, hogy azoknak a probiotikus izolátumoknak, amik mikózist okoztak, nem volt olyan fenotípusuk, ami elősegítette volna, hogy aktívan behatoljanak a vaszkuláris rendszerbe. Így a véráramba való behatolás és a szisztémás fertőzés kialakulásának folyamata még mindig nem teljesen tisztázott. Mindazonáltal korábbi kutatások több mechanizmust is valószínűnek tartanak. A probiotikus élesztő a normál orális úton kívül bejuthat levegőből is az emberi szervezetbe, vagy terjedhet emberről emberre. Fungémia kialakulhat katéter használata, szándékos injektálás, vagy a gasztrointesztinális traktus betegsége miatt, illetve műtéti beavatkozás következtében kialakult sérüléseken keresztül. Az immunszuppresszív kezelések szintén hajlamosítanak a gombás fertőzésekre, és a fentebb említett állapotokkal kombinálva növelik a fungémia kialakulásának kockázatát. Így az élesztő probiotikumok használata ellenjavallt súlyos egészségügyi állapotban lévő betegek számára. Mindezek ellenére sok esetben mégis részesülnek olyanok is *S. 'boulardii'* kezelésben, akiknek egészsége súlyosan kompromittált. Ezeknél a betegeknél a legtöbb esetben például gasztrointesztinális diszbiózis esetén alkalmaznak probiotikus élesztőt. Ez további fertőzések melegágya lehet, mivel ilyen esetekben a bél "barrier" funkciója is valószínüleg károsodott. Az a tény, hogy az élesztőt tartalmazó probiotikus termékek bizonyos esetekben veszélyesek lehetnek, a közelmúltban egyenesen arra késztetett egy kórházat, hogy eltávolítsa a gyógyszertárából a *S. 'boulardii'* termékeket.

A szakirodalomban publikált kutatások és a mi eredményeink is arra utalnak, hogy az élesztő probiotikumok bejutása a vérbe nem az élesztő saját virulencia faktorai révén következik be, hanem a szervezet aktuális állapotától függ. Így a probiotikum törzsek túlélése és reprodukciója a véráramban és

a szervezet más részein az élesztő más tulajdonságainak, nem a penetrációt elősegítő virulencia faktorainak tulajdonítható. További kutatások és lehetőleg több, virulenciában eltérő izolátum lenne szükséges ahhoz, hogy feltárjuk a probiotikus élesztők patogénné válásának molekuláris folyamatait és okait.

6.3 *HMX1* gén potenciális szerepe a probiotikus élesztő patogenitásában

Számos publikáció leírja, hogy a probiotikus élesztőgombák mikózist okozhatnak, ami életveszélyes egészségügyi állapotokat idézhet elő. Azonban sokkal kevesebb adat áll rendelkezésre arról, hogy az élesztő genetikai tulajdonságai hogyan járulnak hozzá az ilyen fertőzések kialakulásához. Így az egyik célunk az volt, hogy felfedjük ezeket, első körben az élesztő *HMX1* gén funkcióvesztése miatt bekövetkező változások vizsgálatával. A gén már a multiplex PCR fejlesztési tanulmányunk MLST adatai alapján is invariábilisnak bizonyult a probiotikus élesztőink között, a teljesgenom-összeállítást követően pedig a gén környezetét is megvizsgáltuk, lehetővé téve a CRISPR/Cas9 alapú génkiütés megtervezését. A *HMX1* központi szerepet tölt be a *S. cerevisiae*, így a *S. 'boulardii'* vasmetabolizmusában is, amikor a sejtek környezetében kicsi a hasznosítható vas koncentrációja. A vashiányos környezet kialakítása és fenntartása a patogén mikroorganizmusok körül általános védekezési stratégia az emberi szervezetben. A *HMX1* gén ilyen körülmények között fontos szerepet játszhat az élesztő túlélésében a hem lebontása miatt miatt, így az volt a hipotézisünk, hogy a *HMX1* hozzájárulhat a probiotikus élesztő patogenitásának kialakításához és a vérben való túléléshez. Teszteltük a gén deléciójának hatását különböző genetikai háttérrel rendelkező *S. 'boulardii'* izolátumok esetében. A gén sikeres delécióját követően vashiányos körülmények (szintetikus BPS vaskelátort tartalmazó táptalaj, illetve 50% humán szérum) között teszteltük a törzsek és izolátumok szaporodását, és felmértük α- és β-hemolitikus aktivitásukat. Ezen felül állatkísérleteket végeztünk, hogy meghatározzuk az élesztők virulenciáját és a túlélését immunszuppresszált egérmodellben.

6.3.1 A génkiütéshez kiválasztott izolátumok genetikai különbségei

Az egyik kereskedelmi izolátum újonnan összeállított és annotált genomját referenciaként használva megállapítottuk, hogy az izolátumok valóban közeli rokonok, de egyedi mutációkat tartalmaznak, és így különböző genetikai hátteret képviselnek. Nagymértékű genomszerkezeti eltéréseket nem találtunk, azonban többszáz mutáció befolyásolta a fehérjefunkciókat az izolátumokban, és nagy méretű heterozigótaságvesztés is megfigyelhető volt. A *HMX1*-gyel interakcióba lépő gének közül 11 olyan volt, melyben nagy (két gén) vagy közepes (tíz gén) hatású, fehérjefunkciót is befolyásoló mutációk voltak. Ezen felül számos más génben is találtunk hasonló

mutációkat (43 génben nagy hatású, 73 génben közepes hatású mutációkat), melyek azonban nem mindegyik izolátumban voltak megtalálhatóak. A mutációkban érintett gének ez utóbbi, nagyobb csoportja rávilágít arra, hogy a genetikai háttér mennyire eltérő lehet még a közeli rokon probiotikus élesztőgombák között is. Ezek az eredmények hasonlóak a McCullough és munkatársai (1998) által bemutatott virulencia adatokra, akik kimutatták, hogy a virulencia (betegségokozó képesség) eltérő lehet ugyanazon termék két különböző sarzsa esetében. A genetikai háttér ilyen eltérései magyarázhatják a vaséhezési és az egérfertőzési kísérletek eltérő kimenetelét, hasonlóan ahhoz, ahogy egy nemrégiben végzett tanulmány kimutatta, hogy a *S. cerevisiae* genetikai hátterének eltérései lényegesen befolyásolják a funkcióvesztéssel járó mutációk hatásait az élesztő fitnesszére. Például a hem oxigenáz gén deléciójának más hatása volt egyes törzseknél [általánosságban véve csökkentette az adott izolátum fitneszét vaséhezés során, azonban egy esetben (DE35762) előnyös mutációnak bizonyult].

Megvizsgáltuk a génkiütéses kísérletekben vizsgált probiotikus élesztők egyéb genomi jellemzőit is (SNP analízis, ploidia, CNV analízis, mitokondriális DNS, 2µ plazmid, rDNS, Ty2 és Ty5 transzpozonok kópiaszáma, LOH és GOH események). Az izolátumok egyes tulajdonságokban eltértek egymástól, például génkópiaszámváltozás 10 gén esetében fordult elő.

Összességében, a genomikai analízis során a klinikai törzsekre, vagy az állatmodellben magas virulenciát mutató törzsekre specifikusan jellemző adaptációkat és eltéréseket nem találtunk. Az eredmények szemléltették, hogy bár minden, génkiütésre kiválasztott izolátum kifejezetten közeli rokon *S. 'boulardii'*, mégis eltérő genetikai hátteret képviselnek.

6.3.2 A vaséhezéssel szembeni tolerancia lehetséges virulencia faktor a *S. 'boulardii'* esetében

Az izolátumok és mutáns törzsek vaséhezéssel szembeni toleranciája változékony volt a BPS vaskelátort tartalmazó táptalajon és 50% humán szérum, 50% RPMI-1640-t tartalmazó folyékony tápközegben. A kapott CFU értékek az 50%-os humán szérumban az AI0001, AI0003 és AI0009 deléciós törzsek esetében kisebbek voltak, mint a vad típusú izolátumoknál (bár az AI0009 esetében a különbség nem volt szignifikáns). Érdekes módon az AI0011 törzs szaporodási képessége szignifikánsan nagyobb volt a DE35762 izolátummal összehasonlítva. Ezek az eredmények nagyon hasonlóak voltak a BPS-sel végzett "spot-plate" kísérlet eredményeihez. Az AI0005 és AI0007 törzsnél ellentétes eredményeket kaptunk, mivel a "spot-plate" kísérletnél gyengébb, szérumban viszont erősebb szaporodást mutattak a 465/2018 és 2251/2018 izolátumokkal összehasonlítva. Utóbbi esetében nem volt szignifikáns a különbség.

Ezen felül szignifikáns különbséget találtunk a három vizsgált csoport (kereskedelmi, mikózist okozó, mikózist nem okozó) között a spot-plate kísérlet esetében. A mikózist nem okozó csoport mutatta

a legmagasabb toleranciát a másik két csoporttal összehasonlítva függetlenül attól, hogy ki volt-e ütve a *HMX1* vagy sem. Érdemes megjegyezni, hogy a mikózist nem okozó csoport tagjai magas egérhalálozást okoztak, miközben a hemolitikus aktivitás alapján nem lehetett megkülönböztetni a törzseket annak ellenére, hogy ez utóbbi módszert gyakran használják a patogén élesztők virulenciájának és probiotikus élesztők biztonságosságának felmérésére. Az eredményeink alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a vaséhezéssel szembeni tolerancia tesztelése jobb módszer lehet a virulencia felmérésére, mint a hemolitikus aktivitás agarlemezes tesztelése, mivel utóbbi nem volt alkalmas a virulens, egérben magas halálozást okozó izolátumok azonosítására, elkülönítésére.

6.3.3 A *S. 'boulardii'* hem oxigenáz-1 (*HMX1*) gén, mint lehetséges antivirulencia faktor

A vad típusú törzsek közül a 465/2018 és a 2251/2018 szignifikánsan ($p < 0,0001$) csökkentették az egerek túlélését, így a vizsgált izolátumok közül ezek voltak a legvirulensebbek. A PY0001, PY0002 és DE35762 avirulensnek bizonyultak, míg a DE6507 mérsékelt virulenciát mutatott. A feltételezésünk az volt, hogy ha deletáljuk a *HMX1* gént az egerek túlélési százaléka jelentősen nőni fog, amiatt, hogy az élesztősejtek nem lesznek képesek a sejten belül található vas tartalmú hem hasznosítására. Ezzel ellentétben, amikor a *HMX1* deléciós törzseket oltottuk az egerekbe, a túlélés változása az adott törzstől függött, annak ellenére, hogy a törzsek genetikailag nagyon közeli rokonok (probiotikum eredetű törzsek melyek feltételezhetően csak gazdaszervezeten belüli mikroevolúción mentek keresztül). A virulencia csökkent az AI0005 és AI0007 törzseknél, de ez a változás nem volt szignifikáns az eredeti vad típusú törzsekkel (465/2251 és 2251/2018) összehasonlítva. Az AI0001, AI0009 és AI0011 virulenciája magasabb volt a vad típusú törzsekhez képest, viszont az AI0009 esetében ez nem volt szignifikáns. Az AI0003 törzsnél az egerek túlélési százaléka nem változott a vad típusú PY0002 törzshöz képest. Azonban a *HMX1* elvesztése a CFU-értékek szignifikáns növekedését eredményezte a vesék gombaterhelésének felmérésekor a vizsgálatban használt összes törzs esetében az AI0005 törzs kivételével. Érdekes módon ennek a törzsnek a vad típusú izolátuma okozta a legnagyobb mértékű egérhalálozást. Az adatok alapján az is megfigyelhető volt, hogy a CFU értékek törzsenként erősen szórtak. Ennek ellenére a CFU értékek és a túlélési adatok statisztikai összehasonlítása azt az eredményt adta, hogy a *HMX1* deléciója szignifikánsan növelte probiotikum törzsek életképes sejtszámát a vesében.

A virulencia faktorok a gomba patogének olyan tulajdonságai, amelyek károsítják a gazdaszervezetet (közvetlenül, vagy a gazdaszervezet válaszán keresztül), vagy elősegítik a gomba szaporodását és túlélését a fertőzés közben. Utóbbiakat virulencia determinánsoknak is nevezik. Az eredményeink azt mutatják, hogy a *C. albicans* homológjával ellentétben a *Saccharomyces*-ekben lévő *HMX1* nem tekinthető virulencia faktor génnek. A deléciós törzsek megnövekedett fitnesze a fertőzött

egerek veséjében arra enged következtetni, hogy az élesztő hem oxigenáza potenciális antivirulencia faktornak tekinthető. Ezt a jelenséget a közelmúltban definiálták humán patogén gombák esetében. Az ilyen gének elvesztése vagy deléciója megnövekedett virulenciához vezet, vagy a gazdaszervezet válaszának befolyásolása követeztében, vagy akár a gombasejt kompenzáló stresszválaszai miatt, ami túlkompenzálja a génvesztés káros hatását, és fitnesz növekedéshez vezet a stresszt jelentő környezetben, amit a gazda szervezete jelent.

Az itt bemutatott eredmények az első bizonyítékai egy lehetséges antivirulencia gén jelenlétének a *S. 'boulardii'*-ban, ami arra utal, hogy nem kizárólag egy virulencia faktor megszerzése, hanem egy funkcióvesztéssel járó mutáció is hozzájárulhat a probiotikus élesztő életképességének növekedéséhez emlős gazdaszervezetben. Ehhez hasonló eredményeket csak a sejtfal összetétel és nagyobb virulencia (*SSD1* gén), valamint a sejtfal összetétel és magasabb *in vitro* immunaktiváció (*MCD4* gén) kontextusában figyeltek meg korábban a *S. cerevisiae* esetében. Ez felhívja a figyelmet arra a tényre, hogy egy gén deléciója váratlan adaptív előnyökkel járhat, amelyek potenciálisan elősegítik a patogenitást. A vizsgálataink során az általunk alkalmazott emlős patogenitási modell esetében ezt a hatást a vesék szignifikánsan nagyobb gombaterhelése mutatta. Az *in vitro* kísérletek, beleértve a szérumos szaporodási teszteket is, nem mutattak korrelációt ezzel az eredménnyel, rávilágítva arra, hogy az emlősmodellek alkalmazása mindenképpen javasolt a *Saccharomyces* törzsek potenciális patogenitásának vizsgálatakor. A *S. 'boulardii'* probiotikus élesztő ”genetic engineering”-jét és törzsfejlesztését tehát körültekintéssel kell végezni szem előtt tartva azt, hogy a jövőben ezek a fejlesztések egészségügyi problémák forrásai lehetnek. Ezért erősen ajánlott az új, módosított probiotikus törzsek virulenciájának tesztelése *in vivo* állatmodellek alkalmazásával.

ÖSSZEFOGLALÁS

A *S. 'boulardii'* (*S. 'boulardii'* CNCM I-745) az egyik legkeresettebb probiotikum, melynek tulajdonságait több mint 80 randomizált klinikai vizsgálatban igazolták. Vitathatatlan egészségügyi előnyei ellenére fennáll a fungémia veszélye immunhiányos vagy súlyosan beteg pácienseknél, csecsemők és idősek körében. Az elmúlt években növekedett az ilyen fertőzéses esetek száma.

A szakirodalom tanulmányozása során felderítettük, hogy *Saccharomyces* fungémia esetén ritkán, mindössze a leírt esetek felénél végeztek tipizálási módszert annak érdekében, hogy kiderítsék probiotikum eredetű volt-e a fertőzés, és még ezekben az esetekben is az időigényesebb, módszerek kerültek alkalmazásra. A már létező tipizálási módszerek (ITS, mikroszatellita és interdelta analízisek) kombinálásával egy multiplex PCR módszert fejlesztettünk ki, amivel rövid időn belül (3 óra), megbízhatóan kideríthető, hogy egy élesztő fertőzést a *S. 'boulardii'* probiotikum okozott-e vagy sem. Ez elősegítheti az élesztő probiotikumok biztonságosságának felmérését, valamint egyszerű kivitelezhetősége miatt a klinikai diagnosztikában is alkalmazható. Ezen felül törzsgyűjteményünk és a multiplex PCR alkalmazásával megállapítottuk, hogy a klinikai *Saccharomyces* izolátumok jelentős része probiotikum eredetű.

Analizáltuk az izolátumok fenotípusát, a bélepitélium modellel való interakciókat, és az immunaktivációban bekövetkező változásokat 14 *S. 'boulardii'* izolátum vonatkozásában. Az egyes élesztő izolátumoknak különböző fenotípusuk volt, de egyértelműen nem lehetett különbséget tenni a kereskedelmi és klinikai vagy a klinikai mikózist nem okozó és klinikai mikózist okozó minták között. Ez azt mutatja, hogy a *S. 'boulardii'* képes túlélni az emberi gazdaszervezetben hosszabb ideig anélkül, hogy olyan tulajdonságokra tenne szert, amelyeket a korábbi tanulmányok a patogenitással kapcsoltak össze. Érdemes még megjegyezni a probiotikum termékek flukonazollal szembeni jelentős rezisztenciáját.

CRISPR/Cas9 géndelécióval megvizsgáltuk, hogy a *HMX1* gén szerepet játszik-e a probiotikus élesztő patogenitásának kialakításában és a vérben való túlélésben. Az adatok alapján a *HMX1* gén lehet az első leírt potenciális antivirulencia gén a *S. 'boulardii'*-ban. Tehát, nem csak egy virulenciafaktor kialakulása, hanem egy funkcióvesztéssel járó mutáció is hozzájárulhat a patogenitáshoz. Ez felhívja a figyelmet arra, hogy egy gén deléciója és az ezt követő metabolikus változások váratlan adaptációs előnyöket okozhatnak, amelyek potenciálisan elősegítik a patogenitást. Emiatt a *S. 'boulardii'* probiotikus élesztő "genetic engineering"-jét és törzsfejlesztését körültekintéssel kell végezni, azt is szem előtt tartva, hogy a jövőben egészségügyi problémák forrása lehet. Ezért a törzsfejlesztésen átesett probiotikumok biztonságosságának és virulenciájának ellenőrzése erősen ajánlott, mégpedig *in vivo* állatmodellek alkalmazásával.

AZ ÉRTEKEZÉSBEN SZEREPLŐ ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

Az értekezésben szereplő adatok alátámasztják, hogy:

- Interdelta, mikroszatellita (*YLR177w*, *YOR267c*), valamint ITS primerek multiplex PCR-ben való használata lehetővé teszi a *S. 'boulardii'* izolátumok diagnosztikai azonosítását *S. cerevisiae* vagy más eredetű fungémia, ill. gombás fertőzés esetén.

- A *S. 'boulardii'* izolátumok a gazdán belüli mikroevolúció jeleit mutatják, fenotípusukban különbségek tapasztalhatók, de az *in vitro* vizsgálatok alapján az izolátumok eredete (kereskedelmi, mikózist okozó klinikai, mikózist nem okozó klinikai izolátumok) nem meghatározható.

- Az *in vivo* vizsgálatok azt mutatták, hogy a klinikai probiotikus élesztőizolátumok virulenciája és veseterheltsége egérben magasabb, mint a kereskedelmi izolátumoké, habár változékonyságot mutat.

- A *HMX1* deléciós kísérletekhez kiválasztott törzsek genomikai analízise megmutatta, hogy az izolátumok valóban közeli rokonok, de egyedi mutációkat és heterozigótaság-vesztéseket tartalmaznak, így különböző genetikai hátteret jelentettek a géndeléció során. Az egyedi mutációk a gazdán belüli mikroevolúció jeleinek tekinthetők.

- A *S. 'boulardii' HMX1* génje potenciális antivirulencia faktorként viselkedik immunszuppresszált egerek veséjéinek gombaterhelés eredményei alapján.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőimnek Prof. Dr. Pócsi Istvánnak és Dr. Pfliegler Valter Péternek a doktori értekezésem elkészüléséhez nyújtott segítségért. Szeretném továbbá megköszönni nekik, hogy töretlenül hittek bennem és szakmailag támogattak az elmúlt 5 évben, mely jelentősen hozzájárult a PhD munkám során elért eredményekhez és sikerekhez.

Szeretném megköszönni az együttműködést a doktori értekezésem alapjául szolgáló publikációk társszerzőinek (Prof. Dr. Bácskay Ildikó, Prof. Dr. Gácser Attila, Dr. Antunovics Zsuzsa, Dr. Benkő Zsigmond, Dr. Dóczi Ilona, Dr. Farkas Zoltán, Dr. Fekete Tünde, Dr. Jakab Ágnes, Dr. Kovács Károly, Dr. Kovács Renátó László, Dr. Ksenija Lopandic, Dr. Majoros László, Dr. Nemes Dániel, Dr. Pázmándi Kitti Lilla, Dr. Rádai Zoltán, Lovászné Rácz Hanna Viktória, Tóth Zoltán) is, munkájukkal és szakmai tanácsaikkal jelentősen emelték a dolgozatom színvonalát.

Köszönöm a Molekuláris Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszék munkatársainak, hogy kérdéseimmel mindig bizalommal fordulhattam hozzájuk.

A kutatást támogatta a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal Fiatal Kutatói Pályázata (NKFIH FK 138910), az Innovációs és Technológiai Minisztérium Tématerületi Kiválóság Program Pályázata (TKP2021-EGA-20), az Új Nemzeti Kiválóság Program (ÚNKP-18-3-I-DE-4, ÚNKP-19-3-I-DE-234, ÚNKP-20-3-II-DE-103), valamint az Osztrák-Magyar Akció Alapítvány Pályázata (98öu7).

DEBRECENI EGYETEM

DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/261/2022.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Imre Alexandra
Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10062509

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Imre, A.**, Kovács, R. L., Tóth, Z., Majoros, L., Benkő, Z., Pfliegler, V. P., Pócsi, I.: Heme Oxygenase-1 (HMX1) Loss of Function Increases the In-Host Fitness of the Saccharomyces 'boulardii' Probiotic Yeast in a Mouse Fungemia Model.
   J. Fungi. 8 (5), 522, 2022.
   DOI: http://dx.doi.org/10.3390/jof8050522
   IF: 5.816 (2020)

2. **Imre, A.**, Kovács, R. L., Pázmándi, K. L., Nemes, D., Jakab, Á., Fekete, T., Rácz, H. V., Dóczi, I., Bácskay, I., Gácser, A., Kovács, K., Majoros, L., Farkas, Z., Pócsi, I., Pfliegler, V. P.: Virulence Factors and in-Host Selection on Phenotypes in Infectious Probiotic Yeast Isolates (Saccharomyces 'boulardii').
   J. Fungi. 7 (9), 1-29, 2021.
   DOI: http://dx.doi.org/10.3390/jof7090746
   IF: 5.816 (2020)

3. **Imre, A.**, Rácz, H. V., Antunovics, Z., Rádai, Z., Kovács, R. L., Lopandic, K., Pócsi, I., Pfliegler, V. P.: A new, rapid multiplex PCR method identifies frequent probiotic origin among clinical Saccharomyces isolates.
   Microbiol. Res. 227, 1-7, 2019.
   DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2019.126298
   IF: 3.97

További közlemények

DEBRECENI EGYETEM Egyetemi és Nemzeti Könyvtár

4. Rácz, H. V., Mukhtar, F., **Imre, A.**, Rádai, Z., Gombert, A. K., Rátonyi, T., Nagy, J., Pócsi, I., Pfliegler, V. P.: How to characterize a strain? Clonal heterogeneity in industrial influences both phenotypes and heterogeneity in phenotypes.
   Yeast. 38 (8), 453-470, 2021.
   DOI: http://dx.doi.org/10.1002/yea.3562
   IF: 3.239 (2020)

5. Hyde, K. D., Dong, Y., Phookamsak, R., Jeewon, R., Bhat, D. J., Jones, E. B. G., Liu, N. G., Abeywickrama, P. D., Mapook, A., Wei, D., Perera, R. H., Manawasinghe, I. S., Pem, D., Bundhun, D., Karunarathna, A., Ekanayaka, A. H., Bao, D. F., Li, J., Samarakoon, M. C., Chaiwan, N., Lin, C. G., Phutthacharoen, K., Zhang, S. N., Senanayake, I. C., Goonasekara, I. D., Thambugala, K. M., Phukhamsakda, C., Tennakoon, D. S., Jiang, H. B., Yang, J., Zeng, M., Huanraluek, N., Liu, J. K. (., Wijesinghe, S. N., Tian, Q., Tibpromma, S., Brahmanage, R. S., Boonmee, S., Huang, S. K., Thiyagaraja, V., Lu, Y. Z., Jayawardena, R. S., Dong, W., Yang, E. F., Singh, S. K., Singh, S. M., Rana, S., Lad, S. S., Anand, G., Devadatha, B., Niranjan, M., Sarma, V. V., Liimatainen, K., Aguirre-Hudson, B., Niskanen, T., Overall, A., Alvarenga, R. L. M., Gibertoni, T. B., Pfliegler, V. P., Horváth, E., **Imre, A.**, Alves, A. L., da Silva, S. A. C., Tiago, P. V., Bulgakov, T. S., Wanasinghe, D. N., Bahkali, A. H., Doilom, M., Elgorban, A. M., Maharachchikumbura, S. S. N., Rajeshkumar, K. C., Haelewaters, D., Mortimer, P. E., Zhao, Q., Lumyong, S., Xu, J., Sheng, J.: Fungal diversity notes 1151-1276: taxonomic and phylogenetic contributions on genera and species of fungal taxa.
Fungal Divers. 100 (1), 5-277, 2020.
DOI: http://dx.doi.org/10.1007/s13225-020-00439-5
IF: 20.372

6. Jakab, Á., Antal, K., Emri, T., Boczonádi, I., **Imre, A.**, Gebri, E. Z., Majoros, L., Pfliegler, V. P., Szarka, M., Balla, G., Balla, J., Pócsi, I.: Effects of hemin, CO2, and pH on the branching of Candida albicans filamentous forms.
Acta Microbiol. Immunol. Hung. 63 (4), 387-403, 2016.
DOI: http://dx.doi.org/10.1556/030.63.2016.023
IF: 0.921

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 40,134
A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 15,602

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2022.05.25.

DEBRECENI EGYETEM Egyetemi és Nemzeti Könyvtár

Konferenciakiadványok, előadások és poszter prezentációk:

Konferenciakiadványok:

Imre, A.; Rácz, H. V.; Oláh, P.; Antunovics, Zs.; Dóczi, I.; Kovács, R.; Majoros, L.; Pócsi, I.; Lopandic, K.; Bendixsen, D.; Stelkens, R.; Pfliegler, W. P. (2021): Tuning genomics for highly heteorzygous and polyploid *Saccharomyces* genomes: Where did our commercial and clinical yeasts come from? Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica 68 (Suppl. 1): 73.

Imre, A.; Kovács, R.; Pázmándi, K.; Nemes, D.; Jakab, Á.; Fekete, T.; Rácz, H. V.; Dóczi, I.; Bácskay, I.; Gácser, A.; Kovács, K.; Majoros, L.; Farkas, Z.; Pócsi, I.; Pfliegler, P. W. (2021): Virulence factors and in-host selection of phenotypes in infectious probiotic yeast isolates. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 68 (Suppl. 1): 73.

Imre, A.; Fruzsina, N.; Renátó, K.; Benkő, Zs.; Pfliegler, W. P.; Pócsi, I. (2021): Possible development strategies of yeast probiotics using CRISPR/Cas9 system. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 68 (Suppl. 1): 16.

Rácz, H. V.; **Imre, A.**; Oláh, P.; Antunovics, Zs.; Pócsi, I.; Bendixsen, D.; Stelkens, R.; Pfliegler, W. P. (2021): Allopolyploid problems: Phylogenomic „trees" and beyond with the yeast *Saccharomyces*. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 68 (Suppl. 1): 35.

Pfliegler, V.P.; **Imre, A.**; Rácz, H. V.; Oláh, P.; Antunovics, Zs.; Szilágyi, N.; Dóczi, I.; Majoros, L.; Kovács, R.; Pócsi, I.; Lopandic, K. (2019) The surprising effect of the domestication-driven genome evolution of *S. cerevisiae* on its potential to colonize and infect us. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 66 (Suppl. 1): 180.

Imre, A.; Rácz, H.V.; Antunovics, Zs.; Rádai, Z.; Kovács, R.; Lopandic, K.; Pócsi, I.; Pfliegler, W.P. (2019) Application of genetic fingerprinting and a new, rapid multiplex PCR shows that clinical *Saccharomyces* isolates frequently originate from probitic supplements. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 66 (Suppl. 1): 145-146.

Konferencia-előadások:

Pfliegler, W.P.; **Imre, A.;** Rácz, H.V. (2022) Applying long read sequencing to study clinical isolates of *Saccharomyces cerevisiae* and their microevolution. 23rd Annual Scientific Meeting and 2nd Virtual Symposium of the Mycological Society of the Philippines, 2022.06.24-25. Virtuális.

Rácz, H. V.; **Imre, A.**; Pócsi, I.; Pfliegler, V. P. (2021) Élelmiszeripari és probiotikum élesztők evolúciós genomikája és törzsfejlesztési története. Biotechnológia a Debreceni Egyetemen 2021 – Fókuszban az agrár- és élelmiszerbiotechnológia tudományos szimpózium. Debrecen, 2021.12.02.

Imre, A.; Kovács, R.; Majoros. L.; Benkő, Zs.; Pfliegler, W. P.; Pócsi, I. A hem oxigenáz-1 funkcióvesztése növeli a *Saccharomyces 'boulardii'* probiotikus élesztő virulenciáját immunszuppresszált BALB/c egerekben. Biotechnológia a Debreceni Egyetemen 2021 – Fókuszban az agrár- és élelmiszerbiotechnológia tudományos szimpózium. Debrecen, 2021.12.02.

Pfliegler, W. P.; **Imre, A.**; Rácz, H. V.; Oláh, P.; Antunovics, Zs., Dóczi, I.; Kovács, R.; Majoros, L.; Pócsi, I.; Lopandic, K.; Bendixsen, D.; Stelkens, R. (2021) Domestication history determines the genome evolution of *S. cerevisiae* upon colonizing and infecting the human host. International Congress on Yeasts 15 (ICY15). 2021.08.23-27. Bécs, Ausztria (virtuális)

Imre, A.; Kovács, R.; Benkő, Zs.; Nagy, F.; Pócsi, I.; Pfliegler, W. P. (2021) In-host evolution of opportunistic pathogenic yeast probiotics. Evolution, 2021.06.21-25. Virtuális.

Imre, A.; Rácz, H.; Oláh, P.; Antunovics, Z.; Dóczi, I.; Kovács, R.; Majoros, L.; Pócsi, I.; Lopandic, K.; Bendixsen, D.; Stelkens, D.; Pfliegler, W. (2020) Human isolates of *S. cerevisiae*: colonization, pathogenicity, and in-host microevolution viewed through domestication history. The Allied Genetics Conference, 2020.04.22-25 Washington, D.C., USA.

Imre, A.; Rácz, H. V.; Péter, O.; Antunovics, Zs.; Kovács, R.; Dóczi, I.; Majoros, L.; Pócsi, I.; Lopandic, K.; Pfliegler, W. (2019): Domesztikáció, törzsnemesítés és kolonizáció: az embert fertőző és kommenzalista *Saccharomyces* élesztők története. XVIII. "Genetikai Műhelyek Magyarországon" Minikonferencia, 2019.09.13. Szeged, Magyarország.

Pfliegler, V. P.; **Imre, A.**; Antunovics, Z.; Pázmándi, K.; Jakab, Á.; Nemes, D.; Bácskay, I.; Rácz, H. V.; Kovács, R.; Majoros, L.; Dóczi, I.; Oláh, P.; Lopandic, K.; Pócsi, I. (2018): *Saccharomyces cerevisiae* az emberi mikrobiomban és kórokozóként: igény és lehetőség a törzsfejlesztésre. Biotechnológia a Debreceni Egyetemen Szimpózium, 2018.11.22., Debrecen.

Imre, A.; Antunovics, Z.; Pázmándi, K; Jakab, Á.; Nemes, D.; Bácskay, I.; Rácz, H. V.; Kovács, R.; Majoros, L.; Dóczi, I.; Pócsi, I.; Lopandic, K., Pfliegler, V. P. (2018): *Saccharomyces cerevisiae* klinikai izolátumok: kolonizáció, mikroevolúció és patogenitás egy háziasított mikrobánál. XVII. "Genetikai Műhelyek Magyarországon" Minikonferencia, 2018.09.21. Szeged, Magyarország.

Pfliegler, V. P.; **Imre, A.**; Antunovics, Z; Kovács, R.; Majoros, L.; Dóczi, I.; Pócsi, I. (2018): Food and probiotic *Saccharomyces* yeasts: Colonizers and pathogens? 3rd Food Structure & Design Conference, 2018.09.20-22., Debrecen, Magyarország.

<u>Konferenciaposzterek:</u>

Rácz, H. V.; **Imre, A.;** Bazarragchaa, A.; Pfliegler, W. P. (2022) Fine-tuning phylogenomics for admixed Saccharomyces cerevisiae: problems and possible methodological solutions with short- and long-read sequencing. Yeast Genetics Meeting 2022, 2022.08.17-21. Los Angeles, CA, USA.

Imre, A.; Kovács, R.; Tóth, Z.; Majoros, L.; Benkő, Zs.; Pócsi, I.; Pfliegler, W. P. (2022) Variability of the probiotic yeast *Saccharomyces cerevisiae* var. 'boulardii' in genome, phenotype, and virulence. Yeast Genetics Meeting 2022, 2022.08.17-21. Los Angeles, CA, USA.

Imre, A.; Kovács, R.; Majoros, L.; Benkő, Zs.; Pócsi, I.; Pfliegler, W. P. (2022) *Saccharomyces cerevisiae* var.*'boulardii'* host interactions and the virulence related gene heme oxygenase-1 (*HMX1*). 31st Fungal Genetics Conference, 2022.03.15-20. Asilomar Conference Grounds, CA, USA.

Pfliegler, W. P.; **Imre, A.**; Rácz. H. V.; Oláh, P.; Antunovics, Zs; Dóczi, I.; Kovács, R.; Majoros, L.; Lopandic, K.; Bendixsen, D.; Stelkens, R.; Pócsi, I. (2022) Domestication history and its relation to

clonal heterogeneity and microevolution of *Saccharomyces cerevisiae* in the human host. 31st Fungal Genetics Conference, 2022.03.15-20. Asilomar Conference Grounds, CA, USA.

Imre, A.; Rácz, H.; Oláh, P.; Antunovics, Z.; Dóczi, I.; Majoros, L.; Kovács, R.; Lopandic, K.; Benkő, Z.; Pócsi, I.; Pfliegler, W. (2020) *Saccharomyces cerevisiae* var. *'boulardii'* infections: from diagnosis to in-host microevolution. The Allied Genetics Conference, 2020.04.22-25. Washington, D.C., USA.

Pfliegler, W. P.; **Imre, A.**; Makó, R.; Haelewaters, D. (2018) Gut-inhabiting and ectosymbiotic arthropod-associated fungi from a neotropical rainforest, including two new species of yeasts. 11th International Mycological Congress, 2018.07.16-21. San Juan, PR, USA.