

Projektszám: 98öu7		HUF 397000 EUR 5029
Pályázó neve: Dr. Ksenija Lopandic		Intézménye: Universität für Bodenkultur
Projektpartner neve: Dr. Pfliegler Valter Péter		Intézménye: Debreceni Egyetem
Pályázat címe: Az adaptáció genetikája patogén és kommenzalista <i>Saccharomyces</i> élesztők esetén		

A projekt jellege: (kérjük bejelölni)

- Workshop, konferencia
- Publikáció, tananyag
- Kutatási együttműködés
- Oktatási program

Beszámoló/Eredmények

A bennünk élő illetve az alkalmanként betegséget okozó gombák diverzitását, szerepét, származását még ma sem értjük kielégítő mértékben.

A *Saccharomyces cerevisiae* élesztőfaj (pék ill. borélesztő), mely a leginkább kutatott és a legjobban ismert rokonai között, egyre gyakrabban okoz megbetegedéseket, mikózisokat. Emellett a faj vélhetően a humán mikrobiom (állandó vagy átmeneti) tagja is. Közelmúltban publikált megfigyeléseink arra utalnak, hogy az embert az élelmiszer ill. probiotikum-eredetű törzsek kolonizálhatják, miközben maguk is megváltoznak geno- és fenotípusukat tekintve. Projektünk során célul tűztük ki, hogy betekintést nyerjünk az élelmiszeripari és probiotikus élesztők emberi gazdaszervezetben lezajló genotípusos változásaiba és mikroevolúciójába. A szegedi és debreceni klinikák együttműködésének köszönhetően meglepően magas számú *S. cerevisiae* izolátumhoz jutottunk hozzá, melyeket a közelmúltban gyűjtöttek. A legtöbb élesztőt eltérő korú és betegségű páciensekből gyűjtötték 2017-ben és 2018-ban, leggyakrabban gombafertőzéssel küzdő fiatal nők urogenitális traktusából. A gyűjteményünkben található klinikai élesztők száma így 62-re emelkedett az OMAA projekt megkezdésének idejére.

A következő kérdések megválaszolását terveztük: (1) genetikailag sokszínűek-e az élelmiszeripari élesztők, és vannak-e velük közeli rokon klinikai élesztők; (2) gyakrabban mutatnak-e a klinikai élesztők olyan genetikai változásokat, mint az aneuploidia vagy a kromoszóma-polimorfizmus, mint az élelmiszeripari élesztők; (3) a klinikai élesztők genomváltozásai irányítottak vagy véletlenszerűek; és (4) a klinikai *Saccharomyces*-élesztők képesek-e a meiotikus spóraképzését arra használni, hogy genetikai sokszínűségüket megnöveljék? Ezen kérdések megválaszolására ipari élesztőtörzsek és klinikai izolátumok különböző molekuláris módszerekkel történő vizsgálatát vittük véghez, összesen 94 mintát vizsgálva. Ezután a genomi változásokat és a kromoszomális polimorfizmusokat vizsgáltuk, hogy a klinikai élesztők evolúcióját és származását feltárjuk. A DNS-tartalom mérését, valamint a klasszikus genetika olyan eszközeit, mint a spóraizolálás és spóraanalízis is felhasználtuk. Eredményeink rávilágítottak arra, hogy az emberi szervezetben pék- és probiotikum élesztőkkel nagyon közeli rokon élesztők telepedhetnek meg.

Mindegyik probiotikum élesztő genetikailag egyezőnek mutatkozott. A probiotikumok és rokon klinikai izolátumaik nem mutattak nagy genetikai és genomstruktúra-változásokat. Mindkét csoport alacsony genomtartalmat mutatott, megközelítőleg diploidok voltak és a kariotípusuk változatlan volt. A génszekvenciák alacsony fokú heterozigotáságra utalnak, mitokondriális DNS-profiljuk változatlan volt és egyik ide tartozó minta sem tudott spórázni.

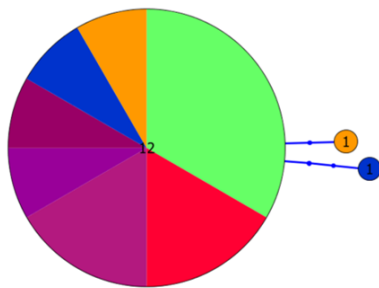
A probiotikus és velük rokon klinikai élesztőkkel szemben a pékélesztők genetikailag változatosabbak voltak. A komplex és heterozigóta genomjukat továbbörökítették klinikai leszármazottaiknak. Mind a pék-, mind a rokon klinikai élesztők képesek voltak evolúciójuk során genomstruktúra-változásokat generálni. A genetikai markerek elvesztése, a Loss-of-Heterozygosity és a kromoszómaváltozások mindkét csoportban kimutathatóak voltak. A genetikai és strukturális változásokat korábbi, *S. cerevisiae*-hibrid genomokban csoportunk már hasonló módon kimutatta. Ez azt mutatja, hogy az élesztők hasonló evolúciós

mechanizmusokon mennek át, mikor eltérő körülményekhez adaptálódnak (must, sör, emberi test). A genomi változások az emberi test kolonizálása során szinte mindig genetikai markerek, kromoszóma-fragmentek vagy teljes kromoszómák elvesztését jelentik. Eredményeink azt is megmutatták, hogy a klinikai izolátumok és a rokon élelmiszeripari törzsek komplex, diploidnál nagyobb ploiditásfokú genommal rendelkeznek.

Laborkörülmények között a meiózis lehetősége adott a pék- és rokon klinikai élesztők között, de minden eredmény arra utal, hogy a meiózishoz nincs szerepe a kolonizáció folyamatában. A spórázóképeség és a spóraéletképesség gyakran alacsony és a spóráklónok sokszor olyan fenotípusokat mutatnak, melyek nem figyelhetők meg egy klinikai izolátumnál sem.

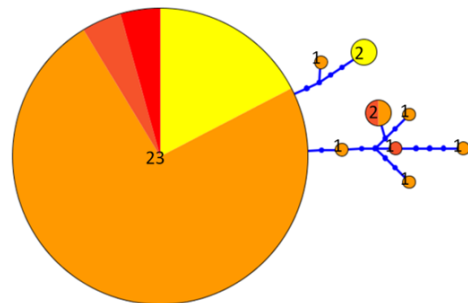
Eredményeink kiváló alapot szolgáltatnak arra, hogy további vizsgálatokra válasszunk ki törzseket. Jelenleg tervünk, hogy adatainkat az izolátumok részletes fenotípusos és patogenitási adataival egészítsük ki. Így teljes képet kapnánk arról, hogy a faj hogyan él túl az emberi gazdában, és hogyan okozhat egészségügyi kockázatot.

- péklesztő
- probiotikum
- széklet
- Légcső
- Torok
- Hörgő
- Hüvely
- Méhnyak
- Vér



Probiotikum és rokon klinikai élesztő

Alacsonyabb és állandó genomtartalom,
alacsony heterozigótaság, ritka LOH
Invariabilis kariotípus
Nincs spórázás



Péklesztő és rokon klinikai élesztő

Magas és variabilis genomtartalom, magas heterozigótaság,
gákoribb LOH, kariotípusváltozás
Sporuláció variabilis, gyakran nagyon alacsony
spóraéletképességgel

Projektnummer: 98öu7		HUF 397000 EUR 5029
Antragsteller: Dr. Ksenija Lopandic		Institut: Universität für Bodenkultur
Projektpartner: Dr. Valter Péter Pfliegler		Institut: Universität Debrecen
Titel: Die Genetik der Anpassung von pathogenen und kommensalen <i>Saccharomyces Hefen</i>		

Art der Förderung:

- Workshop, Konferenz
- Publikation, Lehrmaterial
- Forschungsprojekt
- Unterrichtsprojekt

Bericht

Über die Diversität, die Rolle und die Herkunft der in uns lebenden und manchmal Krankheiten verursachenden Pilzarten ist heutzutage noch wenig bekannt. *Saccharomyces cerevisiae* (Back-, Bier- oder Weinhefe) ist die am meisten erforschte und am besten bekannte Hefeart, die immer häufiger auch als Krankheitserreger identifiziert wird. Trotz einiger Veröffentlichungen, die auf die Pathogenität klar hinweisen, sind die Fragen der Herkunft von *S. cerevisiae* im menschlichen Körper und der Mechanismen der Anpassung noch immer nicht ganz geklärt. Unsere vor kurzem publizierte Beobachtungen wiesen darauf hin, dass der menschliche Wirt von Back- und Probiotikahefen kolonisiert werden kann und dass sich diese Hefen während der Kolonisierung genotypisch und phenotypisch verändern können.

Im aktuellen Forschungsprojekt haben wir die genotypischen Veränderungen und die Mikroevolution der Back- und Probiotikastämme sowie ihrer naheverwandten klinischen Hefeisolate studiert, um die Herkunft und die Evolution der klinischen *S. cerevisiae* Art zu verstehen. Durch Kooperationen mit den Universitätskliniken in Szeged und Debrecen konnten wir eine überraschend hohe Anzahl (62) von *S. cerevisiae* Isolaten untersuchen, welche alle in den letzten Jahren gesammelt wurden. Der Großteil der Hefen wurde aus Patienten verschiedener Altersgruppen mit verschiedenen Krankheiten in den Jahren 2017 und 2018 gesammelt. In den meisten Fällen stammten die Hefen aus dem Genitaltrakt von jungen weiblichen Patienten mit Hefeinfektion. Das Ziel des Projekts war, die folgenden Fragen zu beantworten: (1) sind die Lebensmittel- und Probiotikahefen genetisch heterogen und sind sie mit klinischen Isolaten verwandt; (2) zeigen die klinischen Hefen häufiger genetische und strukturelle Veränderungen wie Aneuploidie oder Chromosomen-Polymorphismus als Lebensmittel- und Probiotikastämme; (3) sind die Genomveränderungen der klinischen Hefen gerichtet oder ungeordnet und (4) können die klinischen *Saccharomyces*-Hefen die Bildung von meiotischen Sporen ausnutzen, um die genetische Vielfalt zu erhöhen? Um diese Fragen beantworten zu können, haben wir molekulargenetische Untersuchungen mit 94 Lebensmittelhefen und klinischen Isolaten durchgeführt. Wir prüften die Sequenzvariationen in unterschiedlichen Genen, die Variationen von Interdelta-, Microsatelliten- und RFLP-mtDNA-Profilen, den Chromosomen-Polymorphismus und die Sporulationsfähigkeit. Unsere Ergebnisse haben die frühere Ergebnisse bestätigt und gezeigt, dass Back- und Probiotikahefen den menschlichen Körper besiedeln können. Mehr als die Hälfte der klinischen Hefeisolate in unserer Sammlung zeigten eine nahe Verwandtschaft mit Probiotika- oder Backhefen. Die Ergebnisse, die in der Abbildung 1 zusammengefasst sind, ermöglichten nicht nur die Herkunft sondern auch die Mikroevolution der klinischen *Saccharomyces* Hefen zu erklären.

Alle Probiotikahefen sind genetisch identisch. Probiotikastämme und ihre verwandten klinischen Isolate zeigten keine großen genetischen und strukturellen Veränderungen. Die Stämme der beiden Gruppen zeigten einen niedrigen DNA-Gehalt (es handelt sich hauptsächlich um diploide Stämme) und der Karyotyp zeigte invariable chromosomale Profile. Die Gensequenzen wiesen auf eine niedrige Heterozygotität hin, die mitochondrialen DNA-Profile waren unverändert und die Hefen konnten nicht sporulieren.

Im Unterschied zu den Probiotikahefen und deren nahe verwandten klinischen Stämmen zeigten sich die Backhefen als genetisch vielfältig. Die den Menschen besiedelnden Hefen haben die komplexen und heterozygotischen Genome von den Backhefen geerbt. Sowohl die Backhefestämme als auch die verwandten klinischen Isolate können während der Evolution Genomstrukturveränderungen generieren. Der Verlust von genetischen Markern, Loss-of-Heterozygotie (LOH) und Chromosomen-Polymorphismen wurden in beiden Gruppen gefunden. Diese genetischen und strukturellen Veränderungen konnten wir auch in unseren früheren Untersuchungen von Hefe-Hybridgenomen von *S. cerevisiae* nachweisen. Das zeigt, dass die Hefen ähnliche evolutionäre Mechanismen benutzen, um sich an unterschiedliche Umgebungen (Wein, Bier, menschlicher Körper) anzupassen. Genomische Veränderungen im menschlichen Wirt beinhalten fast immer Verluste von genetischen Markern oder einem Chromosomenteil, oder sogar ganze Chromosomen gehen verloren. Diese Ergebnisse weisen auch darauf hin, dass ein Grossteil der klinischen Stämme und deren nahe verwandte Lebensmittelhefen ein komplexes Genom haben mit einem Ploidiegrad von >2 . Unter Laborbedingungen ist die Meiose für Backhefen und verwandte klinische Hefen möglich, aber alle Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Meiose während der Kolonisierung keine Rolle spielt. Der Sporulationsanteil und die Sporenkeimfähigkeit sind oft niedrig und die Sporenklone zeigen oft irreguläre Kolonieförmigkeiten, welche bei klinischen Stämmen nicht beobachtet werden konnten.

Die wesentlichen Unterschiede in der Genomstruktur zwischen den Probiotika- und Backhefen-Gruppen eröffnen neuen Fragen über deren phänotypische Eigenschaften und potentieller Virulenzeigenschaften, die wir in unseren weiteren Studien klären möchten. Damit könnten wir besser verstehen, wie diese Art im menschlichen Wirt überlebt und wie sie Gesundheitsgefahren verursachen kann.

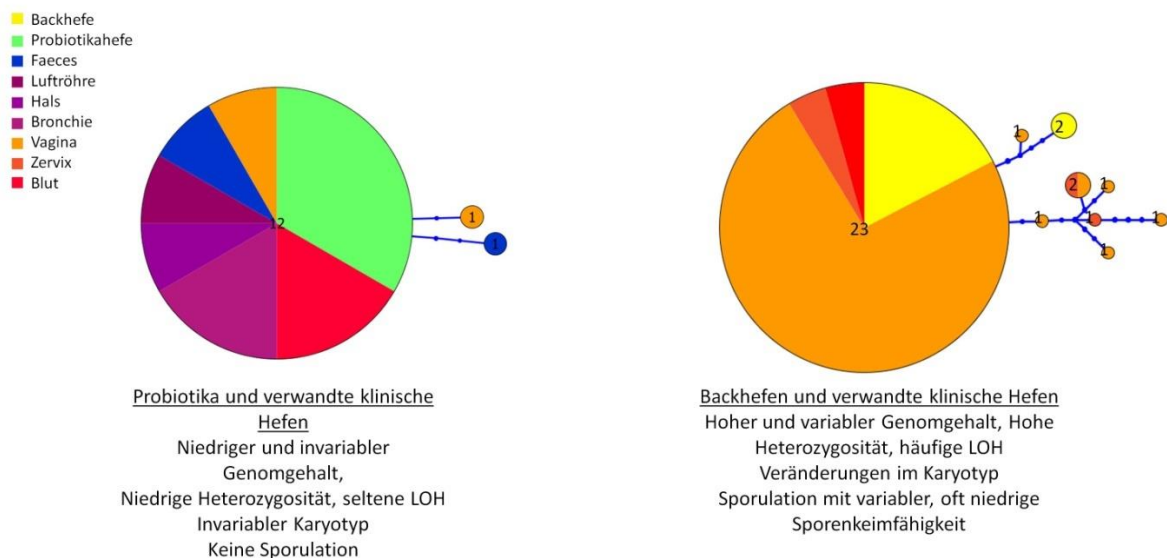


Abbildung 1. Eigenschaften von den kommerziellen und klinischen *S. cerevisiae* Hefen

Abschlußbericht

Weitere Fragen zu den Ergebnissen:

1. Nutzung und Verbreitung der Ergebnisse:

Welchen konkreten Nutzen konnten Sie und Ihr Kooperationspartner aus dem Projekt gewinnen. Bitte denken Sie insbesondere an Publikationen, Experimente, gemeinsame Seminare, Sommerschools und/oder an eine anderweitige Umsetzung in die Praxis.

Dieses Projekt hat grundlegendes Wissen in den Kernbereichen der Hefeevolution und der Hefepathogenität hervorgebracht. Die Antragstellerin (KL) und Projektpartner (VPP) konnten die schon 2012 begonnene Arbeit im Bereich der Evolution der Hybridhefen fortsetzen und diesmal selektierte Hefen verwenden, um deren genomischen Veränderungen mit anderen molekularen Merkmalen zu studieren. Die Projektmitarbeiterin (AI) hat viele Daten und Ergebnisse für die Fertigstellung ihrer Dissertation generiert. Zwei Seminare wurden an der BOKU gehalten; ein Seminar im Mai 2018, in dem wir über das Thema, die Projektziele und die Finanzierungsquelle informiert haben; und ein Seminar im Juli 2018, in dem wir die Ergebnisse präsentiert haben. Im September 2018 hat AI die Ergebnisse dieses Projekts zusammen mit vorherigen Ergebnissen an einer genetischen Konferenz in Szeged präsentiert (XVII. "Genetikai Műhelyek Magyarországon" Minikonferencia). Wir planen auch eine Präsentation der Ergebnisse in Peer-Review-Journalen und auf unterschiedlichen internationalen Tagungen/Kongressen, was zweifellos zur wahrgenommenen Kompetenz aller am Projekt beteiligten Wissenschaftler beitragen wird.

Konferenzvorträge (auf Ungarisch):

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 házasított mikrobánál. XVII. "Genetikai Műhelyek Magyarországon" Minikonferencia, 21.09.2018. Szeged, Ungarn.

2. Durchführung:

Welche konkrete Änderungen gegenüber der Planung ergaben sich hinsichtlich Inhalte und Mitarbeit/Anzahl der Teilnehmer während des Projektverlaufes?

Sehr wenige Änderungen waren nötig: unser Plan war, etwa 25-30 Hefestämme und Isolate zu untersuchen. Durch Kooperationen mit den Universitätskliniken in Szeged und Debrecen konnten wir aber eine überraschend hohe Anzahl von *S. cerevisiae* Isolate sammeln (62 klinische Isolate). Wir analysierten auch 32 kommerzielle Stämme. Da die Anzahl der Hefen sehr hoch war (94), fokussierten wir auf MLST (Multilocus Sequence Typing), Chromosomenänderungen und Mikrosatelliten bei nur zwei Teilgruppen (14 Probiotika und verwandte Isolate; 33 Backhefen und verwandte Isolate). Während des Projekts hat VPP mit einer Universitätsstudentin in Debrecen alle Hefen mit Mikrosatelliten analysiert.

3. Bewertung:

Bitte führen Sie besonders positive, aber auch negative Beobachtungen und Erfahrungen an. Ev. langfristige Auswirkungen Ihres Projektes?

Das vorliegende Projekt hat beiden Partnern ermöglicht, komplementäre Fähigkeiten zu kombinieren und neue Ansätze zu integrieren, um deren Expertise in der Hefegenomik zu stärken. Unsere Ergebnisse sind vor allem für die Bereiche der Untersuchung des menschlichen Mikrobioms und der Lebensmittelsicherheit wichtig. Es ist sehr wichtig zu wissen, warum die Anzahl von *Saccharomyces*-Hefeinfektionen heutzutage steigt. Mit den Ergebnissen unseres Projekts ist es klar geworden, dass in vielen Fällen Probiotika- oder Lebensmittelstämme den menschlichen Wirt kolonisieren können. Manchmal verursachen sie Mykosen (z.B. Vaginitis), manchmal sind sie scheinbar nur kommensale, unschädliche Bewohner. In beiden Fällen sind sie aber fähig, sich genetisch zu verändern. Obwohl *S. cerevisiae* generell nicht gefährlich ist, lässt diese Fähigkeit, durch Genomveränderungen zu evolvieren, Bedenken

aufkommen. Besonders mit Probiotika müssen wir möglicherweise sehr vorsichtig sein. In unserer Sammlung gab es sogar Blutisolate, die von Probiotika stammten. Aus diesen Gründen ist es wichtig, Probiotikahefen mit geringerem Risikopotential, welche viel seltener Probleme verursachen können, zu entwickeln. Alexandra Imre (AI) hat in diesem Forschungsgebiet bereits ein Projekt mit Unterstützung des Nationalexzellenzprogramms Ungarns im September begonnen.

4. Perspektiven:

Hat sich eine Fortführung der Kooperation ergeben?

a. Welche geplante Fortführung gibt es?

Dr. Valter Pfliegler plant ein Projekt beim Innovationsministerium in Ungarn Anfang 2019 einzureichen. Das geplante Projekt basiert auf den aktuellen Ergebnissen. Dr. Lopandic wird als externer Projektpartner teilnehmen und auch den Projektantrag unterstützen. Der Projektplan beabsichtigt, die gesamten Genome der in diesem Projekt selektierten Hefen zu sequenzieren und zu untersuchen, und auch den Genotyp, das Genom und den Phänotyp kombiniert zu analysieren.

b. Welche konkrete Fortführung gibt es?

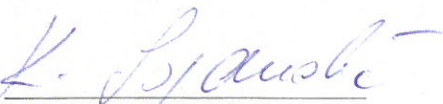
Alexandra Imre hat ihr eigenes Projekt mit Unterstützung des Nationalexzellenzprogramms Ungarns an der Universität Debrecen auf dem Gebiet der Stammentwicklung schon im September begonnen.

5. Verbesserungsvorschläge:


Nennen Sie uns bitte Verbesserungsvorschläge, wie Sie Ihre Arbeit oder wie wir unseren Service besser gestalten könnten?

Für uns gab es keine Probleme mit der Projektorganisation und wir haben keine Verbesserungsvorschläge. Wir bedanken uns bei der AÖU für die finanzielle Unterstützung.

Datum: 25.09.2018.



Dr. Ksenija Lopandic
Antragsteller (Unterschrift)



Dr. Valter Péter Pfliegler
Projektpartner (Unterschrift)

