

DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**ANTIMIKROBIÁLIS PEPTIDEK PATOGÉN
ÉLESZTŐGOMBÁKRA GYAKOROLT HATÁSA**

SZERENCSÉS BETTINA

TÉMAVEZETŐ: DR. PFEIFFER ILONA

BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA



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

SZEGED

2024

Irodalmi áttekintés

A humán patogén gombák többsége opportunistá patogén, egészséges egyénekben nem vált ki kórfolyamatot. Az elmúlt évtizedekben jelentősen megemelkedett a gombák okozta megbetegedések száma azon betegek körében, akik esetében bizonyos betegségek vagy a betegség kezelése során alkalmazott terápia az immunrendszer gyengülését okozzák. A gombaellenes szerek korlátozott száma, ezek hosszan tartó alkalmazása során fellépő káros mellékhatások, valamint a rezisztens törzsek növekvő száma miatt jelentős igény van új, hatékony gombaellenes szerek kifejlesztésére. Ezek a vegyületek származhatnak természetes forrásból, illetve lehetnek mesterséges úton előállított vegyületek.

Az antimikrobiális peptidok (AMP) ígéretes jelöltek széles hatásspektrumuk, alacsony toxicitásuk, mérsékelt immunogenitásuk, jó penetrációs képességük, változatos hatásmechanizmusuk, valamint azon megfigyelés okán, hogy rezisztencia kisebb gyakorisággal alakul ki ellenük.

A növények sokféle antimikrobiális peptidet termelnek, melyek többsége a defenzinek csoportjába tartozik. A pillangósvirágú növényekben található egy gúncsalád, mely több száz, a defenzinek csoportjába tartozó, gümő-specifikus ciszteinben gazdag (nodule-specific cysteine-rich, NCR) peptidet kódol. Ezen NCR peptidok közül számos rendelkezik *in vitro* antibakteriális és/vagy antifungális hatással anélkül, hogy jelentős toxicitást mutatna humán sejtekre nézve. Az NCR-ek gyökérgümőkötől történő izolálása nehézkes a gümők kis mérete miatt, továbbá az egy gümőben termelődő hasonló méretű és fizikai-kémiai tulajdonságú peptidok nem teszik lehetővé egyedi peptidok izolálását.

Így szintetikus úton történő előállításuk a legegyszerűbb mód arra, hogy tiszta formában kinyerjék őket, ami azonban a nagy peptidek esetében igen költséges lehet. Szakirodalmi adatok szerint az AMP-ek szintetikus analógjai jellemzően hatékonyabbak, mint a természetben előforduló peptidek és nem rendelkeznek a természetes AMP-ek stabilitási, toxicitási és aktivitási problémáival.

Célkitűzések

Munkánk során célul tűztük ki szintetikus úton előállított NCR peptidek és peptidszármazékok:

1. gombaellenes hatásának és hatásmechanizmusának vizsgálatát, különös tekintettel a klinikai relevanciával rendelkező *Candida* és *Cryptococcus* élesztőgombákra
2. minimális gátló koncentráció meghatározását és élő csíraszámra gyakorolt hatásának vizsgálatát
3. sejtmembrán permeabilitásra gyakorolt hatásának vizsgálatát
4. citotoxicitásának vizsgálatát emlős sejtekre
5. különböző gombaellenes szerekekkel történő kölcsönhatásuk vizsgálatát
6. makrofágok fagocitáló képességére tett hatásuk vizsgálatát
7. *C. albicans* és *C. tropicalis* biofilm képződésére és az élesztő-hifa morfológiai váltásra gyakorolt hatásuk vizsgálatát
8. protoplasztokra gyakorolt hatásának vizsgálatát
9. sejtméretre gyakorolt hatásuk vizsgálatát
10. sejten belüli lokalizációjának vizsgálatát

Alkalmazott módszerek

Mikrobiológiai módszerek

- mikrohígítási módszer minimális gátló koncentráció meghatározására
- protoplasztképzés
- élőcsíraszám meghatározás
- „sakktabla titrálási” módszer peptidok és flukonazol *in vitro* kölcsönhatásának vizsgálatára

Mikroszkópia (fény- és fluoreszcens mikroszkópia, pásztázó elektronmikroszkópia):

- peptidok hatása a hifa és biofilm képződésre, valamint *Cryptococcus neoformans* sejtek méretére
- FITC-jelölt peptid sejten belüli lokalizációjának meghatározása

Áramlási citometria:

- Calcein sejten belül történő felhalmozódásának mérése
- J774.2 egér makrofág sejtek és Alexa Fluor 488 fluoreszcens festékkel jelölt *Cr. neoformans* sejtek kölcsönhatásának vizsgálata

Molekuláris módszerek:

- Élesztőgomba sejtek életképességének vizsgálata XTT redukciós módszerrel (biofilmképzés)
- Humán keratinocita és J774.2 egér makrofág sejtek életképességének vizsgálata MTT redukciós módszerrel
- Peptidok DNS-hez való affinitásának vizsgálata gélelektroforézissel
- Affinitás kromatográfiai vizsgálatok

Elért eredmények

Munkánk során 27 peptid hatását vizsgáltuk öt különböző *Candida* faj és *Cr. neoformans* ellen. A peptidek közül 19 mutatott antifungális aktivitást. Az NCR335 peptidnek mind az N-terminális (NCR335N₁₋₃₁), mind a C-terminális (NCR335C₁₋₃₃) régiója, valamint e régiók származékai, az NCR335N₇₋₂₁, NCR335N₁₋₁₉, NCR335N₁₋₁₅, NCR335C₁₇₋₃₃ és NCR335C₁₃₋₃₃ továbbá az NCR169 peptid C-terminális régiója (NCR169C₁₇₋₃₈) és ennek 2 származéka (NCR169C₁₇₋₃₈W_{10,20}/A és NCR169C₁₇₋₃₈OX) egyaránt hatásosnak bizonyult a vizsgált fajokkal szemben. Az AMP1, AMP2 és AMP2b peptidek mindegyike *Cryptococcus*-ellenes aktivitást mutatott, és e peptidek esetében mértük a legalacsonyabb minimális gátló koncentráció (MIC) értékeket, YNB tápoldatban hatékonyabbnak bizonyultak, mint a cryptococcosis kezelése során alkalmazott flukonazol és amfotericin B. Az AMP2b minimális gátló koncentrációja még X-VIVO tápoldatban is alacsonyabbnak bizonyult a flukonazol MIC értékénél. Ezen peptideken kívül az NCR044, az NCR247 és ennek 2 származéka (NCR247C és NCR247C/S) valamint a TP10 is gombaellenes hatással rendelkezett. A 12 aminosavnál rövidebb és +5 töltés alatti peptidek esetében nem tudtunk antifungális hatást kimutatni. Az általunk vizsgált, gátlóaktivitást mutató peptidek és peptid-származékok cidikus hatásúnak bizonyultak.

Eredményeink bizonyították a peptidek sejtmembrán permeabilitásra gyakorolt hatását, melyet a fluoreszcens calcein *Cr. neoformans* sejtekben történő felhalmozódásán keresztül igazoltunk. A peptidek sejten belüli lokalizációját fluoreszcens mikroszkópban tanulmányoztuk. Megállapítottuk,

hogy a FITC-jelölt NCR335 jelen volt a sejtmembránban, de nagyobb koncentrációban a citoplazmában volt kimutatható, ahol nem tudtuk specifikusan lokalizálni egyik sejt szervecskéhez sem. Kimutattuk, hogy a protoplasztok és az intakt sejtek eltérő érzékenységet mutatnak a vizsgált peptidekkel szemben. A peptidek szignifikánsan hatékonyabban csökkentették az intakt sejt populáció telepképzőegységeinek számát, mint a sejt faluktól megfosztott sejtek populációjáét. Ez alapján feltételezzük, hogy a sejt falnak, illetve a *Cr. neoformans* sejteket körülvevő tokanyagnak szerepe lehet a peptidek sejt felszínhez való kötődésében és ezáltal a sejtekbe történő bejutásukban.

NCR044 peptiddel történt kezeléssel, valamint proteináz K és DNáz enzimek használatával vizsgáltuk a peptidek DNS-sel való kölcsönhatását. Ezen eredmények arra utaltak, hogy a pozitív töltésű peptid az inkubáció során a negatív töltésű DNS-hez kötődve semlegesítette annak töltését, azonban a peptid fehérjebontó enzimmel történt eltávolítása után a DNS visszanyerte a negatív töltését. A peptidek kötődése nem biztosít olyan szoros „burkot”, ami megvédené a DNS-t a DNáz kezelés hatásától.

Vizsgálataink során az NCR169C₁₇₋₃₈, NCR169C₁₇₋₃₈OX és NCR335C₁₇₋₃₃ peptidek egymással és flukonazollal történő kölcsönhatásában három kombináció esetében szinergizmust figyeltünk meg *C. auris* ellen.

Az általunk vizsgált NCR peptidek alacsony koncentrációban nem mutattak jelentős citotoxicitást, azonban az alkalmazott legmagasabb (25 µM) koncentrációjú peptid-kezelés során a humán keratinocita sejtek életképességének csökkenése volt megfigyelhető négy peptid esetében. Egér

makrofág sejtekre nézve a TP10, NCR247 és NCR335C₁₇₋₃₃ peptidek citotoxikusnak bizonyultak.

Megállapítottuk, hogy az AMP1; AMP2b és NCR169C₁₇₋₃₈ peptidekkel kezelt *Cr. neoformans* sejteket szignifikánsan nagyobb arányban fagocitálták a makrofágok, mint a kezeletlen sejteket.

A vizsgált peptidek eltérő hatást gyakoroltak a *Cr. neoformans* sejtek méretére. Míg két peptid (NCR044 és NCR335C₁₇₋₃₃) esetében a sejtek méretének csökkenése volt megfigyelhető, addig a többi peptiddel végzett kezelés után szignifikáns sejt méret növekedést tapasztaltunk.

A széles hatásspektrummal rendelkező NCR335C₁₇₋₃₃, NCR169C₁₇₋₃₈ és az NCR169C₁₇₋₃₈OX peptidek szubletális koncentrációban gátolták a dimorf *C. albicans* és *C. tropicalis* fajok esetében az élesztő-hifa átalakulást. Kimutattuk, hogy az összes aktív peptid gátolta mindkét faj biofilm képződését.

Eredményeink azt bizonyítják, hogy az általunk vizsgált peptidek többsége széles spektrumú gombaellenes hatással rendelkezik. Gátolják az élesztő-hifa átalakulást, továbbá a biofilm képződését. Gombaellenes szereklle való szinergikus kölcsönhatásaik és humán sejtekre gyakorolt alacsony toxicitásuk miatt ígéretes terápiás gyógyszerjelöltek lehetnek patogén élesztőgombák ellen. Hatásmechanizmusuk pontos feltárása további kísérleteket igényel, azonban eredményeink alapján pozitív töltésük miatt képesek a negatív töltésű makromolekulákhoz, így a nukleinsavakhoz történő kötődésre, ilyen módon feltételezhetően sokrétű hatást gyakorolhatnak a sejt működésére.

Summary

Millions of individuals are affected by serious fungal infections annually, resulting in over 1.3 million deaths. The primary cause of treatment failure often derives from inaccurate or delayed diagnoses. Despite the notable attention given to the development of antifungal agents in recent years, these agents remain limited to a few specific compound families. Consequently, my research focused on examining the characteristics of antimicrobial peptides as potential alternatives to the currently utilized polyenes, azoles, and echinocandins for treating fungal diseases. The objective of my study was to elucidate the impact and mechanism of action of certain nodule-specific cysteine-rich peptides (NCR) and their shorter derivatives on human pathogenic yeasts. Our findings verify that a majority of the tested peptides possess a broad-spectrum antifungal effect. Notably, we successfully identified peptides with lower minimum inhibitory concentration (MIC) values compared to currently available antifungal agents such as fluconazole and amphotericin B. Through my results, it is evident that the concurrent use of certain peptides can reduce the MIC value of fluconazole, thereby mitigating its adverse effects. Additionally, these peptides inhibit yeast-to-hyphae transformation and biofilm formation. Due to their synergistic interactions with antifungal agents and minimal toxicity to human cells, they hold promise as potential therapeutic drug candidates against pathogenic yeasts. However, further experiments are necessary to ascertain their precise mode of action. Our investigation indicates that peptides possessing a positive charge can bind to negatively charged macromolecules (such as nucleic acids), enabling them to exert a broad range of effects on various cellular processes.

A FOKOZATSZERZÉS ALAPJÁT KÉPEZŐ PUBLIKÁCIÓK:

Disszertációban felhasznált publikációk

Szerencsés Bettina; Gácsér Attila; Endre Gabriella; Domonkos Ildikó; Tiricz Hilda; Vágvölgyi Csaba; Szolomajer János; Howan Dian H. O.; Tóth Gábor K.; Pfeiffer Ilona; Kondorosi Éva (2021) *Symbiotic NCR Peptide Fragments Affect the Viability, Morphology and Biofilm Formation of Candida Species.* INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES 22: 7 Paper: 3666, 20 p. **IF (2021): 6,208**

Szerencsés Bettina; Igaz Nóra*; Tóbiás Ákos; Prucsi Zsombor; Rónavári Andrea; Bélteky Péter; Madarász Dániel; Papp Csaba; Makra Ildikó; Vágvölgyi Csaba; Kónya Zoltán; Pfeiffer Ilona; Kiricsi Mónika (2020) *Size-dependent activity of silver nanoparticles on the morphological switch and biofilm formation of opportunistic pathogenic yeasts* BMC MICROBIOLOGY 20: 1 Paper: 176, 13 p. **IF (2020): 3,605**

Konferencia előadás

János Szolomajer, **Bettina Szerencsés,** Dian H.O. Howan, Ilona Pfeiffer, Éva Kondorosi, Gábor K. Tóth (2021) *Növényi eredetű peptidek antifungális hatása.* Peptidkémiai Munkabizottság Tudományos Ülése, 11-13 October 2021, Hungary (előadás)

Egyéb publikációk

Rónavári Andrea; Ochirkhuyag Altantuya; Igaz Nóra; **Szerencsés Bettina;** Ballai Gerg; Huliák Ildikó; Bocz Csenge; Kovács Ákos; Pfeiffer Ilona; Kiricsi Mónika; Kónya Zoltán (2024) *Preparation, characterization and in vitro evaluation of the antimicrobial and antitumor activity of MnOx nanoparticles* COLLOIDS AND SURFACES A: PHYSICOCHEMICAL AND ENGINEERING ASPECTS p. 133528 Paper: 133528 **IF (2024): 5,2**

Szerencsés Bettina; Vörös Mónika*; Bagi Kristóf; Háznagy Márton B.; Hunyadi Attila; Vágvölgyi Csaba; Pfeiffer Ilona; Vágvölgyi Máté (2022) *Semi-*

Synthetic Ecdysteroid 6-Oxime Derivatives of 20-Hydroxyecdysone Possess Anti-Cryptococcal Activity. MICROBIOLOGY RESEARCH 13: 4 pp. 985-994., 10 p. **IF (2022): 1,5**

Bélteky Péter; Rónavári Andrea*; Zakupszky Dalma; Boka Eszter; Igaz Nóra; **Szerencsés Bettina**; Pfeiffer Ilona; Vágvölgyi Csaba; Kiricsi Mónika; Kónya Zoltán (2021) *Are Smaller Nanoparticles Always Better? Understanding the Biological Effect of Size-Dependent Silver Nanoparticle Aggregation Under Biorelevant Conditions* INTERNATIONAL JOURNAL OF NANOMEDICINE 16 pp. 3021-3040., 20 p. **IF (2021): 7,033**

Rónavári Andrea; Bélteky Péter*; Boka Eszter; Zakupszky Dalma; Igaz Nóra; **Szerencsés Bettina**; Pfeiffer Ilona; Kónya Zoltán; Kiricsi Mónika (2021) *Polyvinyl-Pyrrolidone-Coated Silver Nanoparticles—The Colloidal, Chemical, and Biological Consequences of Steric Stabilization under Biorelevant Conditions* INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES 22: 16 Paper: 8673, 21 p. **IF (2021): 6,208**

Rónavári Andrea; Igaz Nóra; Adamecz Dóra I.; **Szerencsés Bettina**; Molnar Csaba; Kónya Zoltán; Pfeiffer Ilona; Kiricsi Monika (2021) *Green Silver and Gold Nanoparticles: Biological Synthesis Approaches and Potentials for Biomedical Applications* MOLECULES 26: 4 Paper: 844, 39 p. **IF (2021): 4,927**

Bélteky Péter; Rónavári Andrea; Igaz Nóra; **Szerencsés Bettina**; Tóth Ildikó Y; Pfeiffer Ilona; Kiricsi Mónika; Kónya Zoltán (2019) *Silver nanoparticles: aggregation behavior in biorelevant conditions and its impact on biological activity* INTERNATIONAL JOURNAL OF NANOMEDICINE 14 pp. 667-687., 21 p. **IF (2019): 5,115**

Szerencsés Bettina; Mülbacher Anna; Vágvölgyi Csaba; Pfeiffer Ilona (2019) *In vitro interactions of amphotericin B and non-antifungal compounds against opportunistic human pathogen Cryptococcus neoformans* ACTA BIOLOGICA SZEGEDIENSIS 63: 2 pp. 181-184., 4 p. **IF (2019): 0,15**

Rónavári Andrea; Igaz Nóra; Gopisetty Mohana Krishna; **Szerencsés Bettina**; Kovács Dávid; Papp Csaba; Vágvölgyi Csaba; Boros Imre Miklós; Kónya Zoltán; Kiricsi Mónika; Pfeiffer Ilona (2018) *Biosynthesized silver and gold nanoparticles are potent antimycotics against opportunistic pathogenic yeasts and dermatophytes* INTERNATIONAL JOURNAL OF NANOMEDICINE 13 pp. 695-703., 9 p. **IF (2018): 4,471**

Rónavári Andrea; Nóra Igaz; Mohana Krishna Gopisetty; **Szerencsés Bettina**; Kovács Dávid; Vágvölgyi Csaba; Boros Imre Miklós; Kónya Zoltán; Kiricsi Mónika; Pfeiffer Ilona (2017) *Biological activity of silver and gold nanoparticles prepared by cell-free extract of Phaffia rhodozyma* ACTA MICROBIOLOGICA ET IMMUNOLOGICA HUNGARICA 64: Suppl. 1 pp. 163-163., 1 p. **IF (2017): 1,23**

Összesített impakt faktor: 45,647

Konferencia összefoglalók

Bélteky Péter; Rónavári Andrea; Boka Eszter; Zakupszky Dalma; Igaz Nóra; **Szerencsés Bettina**; Tóth Ildikó; Pfeiffer Ilona; Kiricsi Mónika; Kónya Zoltán (2020) *The effect of biological conditions on silver nanoparticle toxicity: just how important nanoparticle aggregation really is?* In: Csiszár, B; Hankó, Cs; Kajos, L F; Kovács, O B; Mező, E; Szabó, R; Szabó-Guth, K (szerk.) IX. INTERDISZCIPLINÁRIS DOKTORANDUSZ KONFERENCIA 2020 ABSZTRAKTKÖTET: 9th INTERDISCIPLINARY DOCTORAL CONFERENCE 2020 BOOK OF ABSTRACTS Pécs, Magyarország: Pécsi Tudományegyetem Doktorandusz Önkormányzat 384 p. pp. 311-311., 1 p.

Szerencsés Bettina; Szekeres András; Vágvölgyi Csaba; Demjén András; Kanizsai Iván; Puskás László; Pfeiffer Ilona (2017) *Study of the anti-Candida activity of new synthetic compounds* In: Hapala, I; Breierová, E (szerk.) 44th Annual Conference on Yeasts: Program and Abstracts pp. 69-69., 1 p.

Szerencsés Bettina; Sedjal Salsabil; Szekeres András; Puskás László; Makra Zsófia; Demjén András; Kanizsai Iván; Vágvölgyi Csaba; Pfeiffer Ilona (2017) *Új szintetikus vegyületek szelektív antimikrobiális hatása (Selective*

antimicrobial activity of new synthetic compounds) MIKOLÓGIAI
KÖZLEMÉNYEK-CLUSIANA 56: 1 pp. 138-139., 2 p.

Szerencsés Bettina; Sedjal Salsabil; Szekeres András; Puskás László; Makra Zsófia; Kanizsai Iván; Pfeiffer Ilona; Vágvölgyi Csaba (2017) *Selective toxicity of new synthetic anionophores* In: Department of Public Health Faculty of Medicine University of Szeged (szerk.) 19th DKMT Euroregional Conference on Environment and Health: Program and abstracts Szeged, Magyarország: University of Szeged, Faculty of Medicine 65 p. pp. 53-53., 1 p.

MTMT azonosító: **10060643**

Témavezetői nyilatkozat

Alulírott, Dr. Pfeiffer Ilona igazolom, hogy Szerencsés Bettina szerepe meghatározó jelentőségű volt a

Szerencsés Bettina; Gácser Attila; Endre Gabriella; Domonkos Ildikó; Tiricz Hilda; Vágvölgyi Csaba; Szolomajer János; Howan Dian H. O.; Tóth Gábor K.; Pfeiffer Ilona; Kondorosi Éva (2021) *Symbiotic NCR Peptide Fragments Affect the Viability, Morphology and Biofilm Formation of Candida Species*. INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES 22: 7 Paper: 3666, 20 p.

Szerencsés Bettina; Igaz Nóra*; Tóbiás Ákos; Prucsi Zsombor; Rónavári Andrea; Bélteky Péter; Madarász Dániel; Papp Csaba; Makra Ildikó; Vágvölgyi Csaba; Kónya Zoltán; Pfeiffer Ilona; Kiricsi Mónika (2020) *Size-dependent activity of silver nanoparticles on the morphological switch and biofilm formation of opportunistic pathogenic yeasts* BMC MICROBIOLOGY 20: 1 Paper: 176, 13 p. **IF (2020): 3,605**

címmel megjelent közleményekben. A publikációkban közölt eredményeket tudományos fokozat (PhD) megszerzésére a társszerzők nem használták fel és ezt a jövőben sem teszik.

Szeged, 2024. március 19.

Dr. Pfeiffer Ilona