

DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**KATALÁZ AKTIVITÁS VIZSGÁLATA A *RHIZOPUS ORYZAE*
OPPORTUNISTA PATOGÉN JÁROMSPÓRÁS GOMBÁBAN**

LINKA BEÁTA

TÉMAVEZETŐ:
DR. PAPP TAMÁS
EGYETEMI DOCENS

BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA



SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS INFORMATIKAI KAR
MIKROBIOLÓGIAI TANSZÉK

SZEGED
2012

Bevezetés

A járomspórás gombák többsége a *Mucorales* rend tagja, elsősorban növényi és állati eredetű bomló szerves anyagokon előforduló, talajból izolálható szaprofita szervezetek. Gyakran vizsgált modellorganizmusok, különböző szabályzó mechanizmusok, sajátos szexuális folyamataik, vagy a morfogenezis tanulmányozása során. Gyakorlati jelentőségük ipari, biotechnológiai, mezőgazdasági és orvosi területen kiemelkedő. Orvosi szempontból egyes fajok, mint zigomikózist okozó opportunistáknak számítanak, ezért érdemelnek figyelmet.

Napjainkra elsősorban a fejlett orvosi technikák (pl. csontvelő- és szervátültetés, kemoterápia, szteroid kezelés) hatására többszörösére emelkedett az immunszuppresszált betegek száma, így az opportunistáknak számának növekedése a fertőzésekre fogékony immunszuppresszált betegek számával párhuzamosan növekszik. Ritkán egészséges immunrendszer mellett is előfordul megbetegedés, pl. tartós antibiotikum használat, illetve szöveti sérülés esetén. A zigomikózis kialakulásának kockázata elsősorban cukorbetegség (különösen az ezzel összefüggésben fellépő ketoacidózis), továbbá fertőzéshez, vagy orvosi beavatkozáshoz (pl. transzplantáció) kapcsolódó immunszuppresszió esetén nő meg. A járomspórás gombafertőzések bár viszonylag ritkán fordulnak elő, de erősen progresszív és nehezen kezelhető jellegük miatt igen veszélyesek. A zigomikózisok gyakorisága folyamatosan és erőteljesen emelkedik, valamint e szervezetek sajátosan nagyfokú rezisztenciát mutatnak a legtöbb gombaellenes szerrel (pl. azolok) szemben. Zigomikózisok kialakulása esetén magas a mortalitási ráta (75-95%), a terápiás lehetőségek korlátozottak, ezért rendkívül fontos a járomspórás gombák által kiváltott fertőzésekben szerepet játszó

virulencia faktorok genetikai hátterének feltárása, melyek új diagnosztikai és terápiás módszerek kidolgozását segíthetik elő.

A járomspórás gombák esetében a gazdaszervezet oldaláról alapvetően két tényező járul hozzá a zigomikózis megnövekedett kockázatához: egyrészt a spóracsírázás gátlásának elmaradása, másrészt az intenzív növekedésnek indult micélium elleni védekező reakció elégtelensége. Egészséges szervezetben, az első fázisban a makrofágok fagocitózisa és a spórák oxidatív elpusztítása biztosítja a védelmet (ezen kívül, a spórák csírázását mérsékelten gátló hatással a normál szérum is rendelkezik). A védekezés második szakaszában a neutrofil granulociták szerepe a döntő, amelyek kemotaxis révén a növekvő gombafonalakhoz jutva és annak felszínén megtapadva, oxidatív citotoxikus folyamatok révén képesek a hifát károsítani, illetve fagocitózis nélkül is elpusztítani. A korábban felsorolt fontosabb kockázati csoportokba tartozó betegeknek általában mindkét védekezési lépés elégtelen. Az invazív gombafertőzésekkel szembeni védekező mechanizmusok közt fontos szerepe van az oxidatív pusztító mechanizmusoknak. A fagociták által termelt oxidatív termékek egy irányított folyamatban elárasztják és elpusztítják a mikroorganizmusokat. A neutrofil sejtek által termelt hidrogén-peroxid hatékonyan pusztítja el a gomba hifákat, ugyanakkor ez a hatás katalázal blokkolható. Mindezek alapján a mikrobiális kataláztermelést lehetséges virulenciafaktornak gondolják, különösen olyan betegeknek, akiknél a neutrofil sejtek funkciója károsodott.

A katalázok (EC 1.11.1.6., hidrogén-peroxid oxidoreduktáz) a metalloenzimek egyik leggyakrabban előforduló csoportja. Széles körben elterjedtek az élővilágban. Az aerob baktériumoktól kezdve a magasabbrendű növényekig és állatokig minden élőlényben megtalálhatók. A katalázok a hidrogén-peroxid dizmutációval történő közömbösítését végzik.

Célkitűzések

Jelen munka célja a zigomikózisokból leggyakrabban izolált gomba, a *Rhizopus oryzae* kataláz génjeinek vizsgálata és az általuk kódolt fehérjék szerkezeti jellemzése. A négy katalázt kódoló gén (*cat1*, *cat2*, *cat3*, *cat4*) azonosítására és részletes molekuláris jellemzésére, illetve a kódolt fehérjék szerkezeti modelljének megalkotására a következő konkrét célokat tűztük ki:

- 1. A *R. oryzae* oxidatív stresszel szembeni érzékenységének vizsgálata különböző tenyésztési feltételek mellett, a gomba eltérő életállapotaiban.**
- 2. A kataláz gének szekvencia és filogenetikai elemzése.**
- 3. A *R. oryzae* kataláz fehérjék 3D molekulamodelljének megalkotása.**
- 4. Az izolált gének kifejeződésének vizsgálata:**
 - A kataláz gének transzkripciójának elemzése eltérő oxidatív viszonyok esetén és a gomba különböző fejlődési állapotaiban kvantitatív PCR (qPCR) analízissel.
 - A katalázok kifejeződésének vizsgálata izoenzim analízissel.
- 5. *R. oryzae* és *R. microsporus* által kialakított szisztémás fertőzések vizsgálata egészséges és immunszuppresszált állati modellben.**
- 6. Kataláz deléciós törzsek létrehozása.**

Alkalmazott módszerek

DNS és RNS alapú technikák:

- DNS tisztítása
- RNS tisztítása, cDNS szintézise
- Polimeráz láncreakció, valós idejű PCR (qPCR)

- DNS fragmentumok klónozása,
- DNS szekvenálás
- Plazmid konstrukciók létrehozása
- Baktériumok transzformációja
- Plazmid DNS tisztítása

Nukleotid és aminosav szekvencia adatok elemzése:

- DNS szekvenciák ellenőrzése
- Nukleotid szekvenciák elemzése (BLAST, FASTA)
- Nukleotid szekvenciákból származtatott aminosav szekvenciák meghatározása és összehasonlítása
- Nukleotid és aminosav szekvenciák illesztése
- Aminosav szekvenciák elemzése
- Filogenetikai elemzés

Elektroforetikus technikák:

- Agaróz gélelektroforézis
- Poliakrilamid gélelektroforézis

Fehérje alapú technikák:

- Fehérje aktivitás mérése
- Izoenzim analízis

Fehérjék háromdimenziós szerkezetmodellezése:

- Homológia modellezés (MODELLER program csomag)

Állatkísérlet:

- Immunszuppresszió
- Infekció
- Infekció vizsgálata

Gombák genetikai transzformációja:

- Protoplasztok képzése
- Integratív transzformálás polietilén-glikol (PEG) segítségével

Eredmények

- Munkánk során célul tűztük ki *in vitro* körülmények között szilárd és folyadék tápoldatban a hidrogén-peroxid által kiváltott oxidatív stressz *R.*

oryzae és *R. microsporus* növekedésére gyakorolt hatásának vizsgálatát, különböző tenyésztési feltételek mellett a gomba eltérő életállapotaiban. Megállapítottuk, hogy 1,5 mM bemérési koncentrációjú hidrogén-peroxid által kifejtett oxidatív stressz hatása mindkét törzs esetén 50% körüli növekedés gátlást eredményez. Ennél kisebb koncentrációjú hidrogén-peroxid hatására csak kis mértékben gátlódott a gomba törzsek növekedése. Ennél nagyobb koncentrációban alkalmazott hidrogén-peroxid hatására a *R. oryzae* törzshöz képest mind minimál (YNB), mind komplett (YEG) a *R. microsporus* törzs bizonyult érzékenyebbnek. A *R. oryzae* törzs esetén, YNB tápoldatban 2,5 mM felett, YEG tápoldatban 5 mM felett teljes növekedés gátlás volt megfigyelhető. További kísérleteinkben az oxidatív stressz kiváltására 1,5 mM hidrogén-peroxid koncentrációt használtunk.

- A kataláz gének funkcionális jellemzésének kezdetén nem rendelkezünk információval a spórák csírázásának dinamikájáról. Meghatároztuk a spórák csírázásának idejét *R. oryzae* uracil auxotróf törzs esetén, hidrogén-peroxid jelenlétében és hiányában. Optimális körülmények között történő tenyésztés esetén a sporangiospóra a leoltástól számított 4. órában, míg oxidatív stressz hatás alatt a 6. órában kezdett csírázni. Ez a kísérlet fontos támpontot adott a további vizsgálataink során történő mintavételi időpontok meghatározásában.
- Catalase Assay Kit segítségével, eltérő fejlődési szakaszokban megmértük a *R. oryzae* és a *R. microsporus* össz-kataláz aktivitásának változását.
- A *R. oryzae* genomadatbázisban négy kataláz homológ szakaszt találtunk. Kataláz kódoló géneket más humánpatogén élesztő és fonalas gombákból már azonosítottak, klónoztak és jellemezték. A fehérjék aminosav szekvenciáját más mikrobákból származó katalázok aminosav sorrendjével összehasonlítottuk. Az aminosav szekvenciá filogenetikai elemzésével törzsfát

készítettünk. A *R. oryzae* genomadatbázisában található kataláz fehérjék szekvenciái a filogenetikai törzsfá analízis alapján a KLOTZ és munkatársai által 2003-ban készített kataláz törzsfá hem tartalmú monofunkcionális katalázainak 2-es és 3-as kládjába sorolhatóak be. A *cat1* gén a 3-as kládban foglal helyet, a peroxiszómális katalázokkal mutat nagy hasonlóságot. A *cat2*, *cat3*, *cat4* gének a monofunkcionális katalázok 2-es kládjába illeszkednek be, mindhárom fehérje a törzsfán egymáshoz közel helyezkedik el.

- A *R. oryzae* katalázok háromdimenziós molekulamodelljezése a más élőlényekből meghatározott kataláz fehérjék háromdimenziós molekulamodelljének homológiamodelljezése által valósult meg. Az NCBI adatbázisában lévő háromdimenziós molekulamodellezett katalázok és a *R. oryzae* katalázok aminosav sorrendjének illesztése után kapott rangsort alapul véve először a monomerek molekulaszervezetének illesztését végeztük el. Közismert, hogy a katalázok polimer, főképpen homotetramer formában aktívak, monomerenként aktív centrumukban egy-egy hem-et tartalmazva. A monomerek illesztését heteroatomok (hem) nélkül, majd heteroatomokkal végeztük, az így kapott szerkezetet loop modellezéssel finomítottuk. A létrehozott monomereket négy láncból álló homotetramerek fölépítésére használtuk fel, amelyek vizsgálatával megállapítható volt, hogy a modellezett katalázok aktív centruma nagymértékben konzervált. Az így kapott modellek aktív centrumában egyformán jelen volt az a hisztidin, amelynek mutációjával a fehérjék funkcióképtelenné válnak.

- Ezek az eredmények lehetővé teszik, a teljes kataláz gének izolálása után, olyan mutáns kataláz gének létrehozását, amelyek a modellezés által meghatározott aminosav cseréjével a leírt kísérleti körülmények között csökkent védekező képességű gombatörzset eredményeznek. Ennek teljes kísérleti megerősítése sejtes rendszerben nagy mennyiségű fehérje termeltetése,

és kristályosítás után röntgendiffrakciós szerkezet meghatározással lehetséges.

- Kvantitatív PCR segítségével megállapítottuk egy - egy gén aktivitásának változását a fejlődés előrehaladtával, oxidatív stressz jelenlétében és hiányában. Optimális körülmények között történő tenyésztés során a *cat1* gén aktivitás, oxidatív stressz hatására a *cat2* és *cat4* gének aktivitása volt jelentős. A spórát ért oxidatív stressz esetén a *cat4* gén mutatott erőteljes aktivitást.
- Izoenzim analízis által képet kaptunk arról, hogy a gomba eltérő életállapotaiban változás áll be a különböző katalázok kifejeződésének intenzitásában. Vizsgálatainkban világossá vált, hogy H₂O₂ által keltett oxidatív stressz hatására erőteljes enzimaktivitás növekedés következik be.
- Állatkísérletek során *R. oryzae* és *R. microsporus* fertőzőképességét vizsgáltuk, egészséges és immunszuppresszált egyedekben egyaránt. Olyan egérmodellről nem találtunk irodalmi adatot, ahol a *R. oryzae* mikózis ciklofoszfamiddal indukált immunszuppresszió esetében következett be. Kísérleteinkből kiderült, hogy a *R. oryzae* immunszuppresszált egyedekben erőteljesebb fertőzést képes kiváltani, a mikózis fő megjelenési formája a rhinocerebrális zigomikózis, amely gyors lefolyású, és a fertőzött egyedek 90%-os elhullását okozza a fertőzést követő 3 napon belül. *R. microsporus* esetén a fertőzés lassabb lefolyású, főképpen a gasztrointesztinális területeket érinti. A fertőzést követő túlélés 50%-os a fertőzést követő 7,5 nap elteltével.
- A *R. oryzae* genomadatbázisban található négy kataláz homológ szakasz elejére és végére specifikus primereket terveztünk, PCR-el felszaporítottuk, izoláltuk és plazmidba klónoztuk. A kataláz enzimek patogenításban betöltött szerepének vizsgálatához mind a négy gén esetén gének elrontását lehetővé tevő transzformáló vektorokat készítettünk, melyek a

kataláz génekbe inszertálva tartalmazták a szelekciót biztosító *pyrG* marker gént.

- A patogenitás hátterének és a katalázok virulenciában betöltött szerepének vizsgálatához szelekciós és transzformációs rendszerre van szükség. Rendelkezésünkre állt a *R. oryzae* zigomikózisból izolált, uracil auxotróf *pyrG*⁻ mutáns törzse, így nem kellett külön a transzformációhoz szükséges mutánst előállítani. Az általunk készített deléciós vektorokkal jelenleg transzformációs kísérletek folynak.

Összefoglalás

Eredményeinket az alábbiakban foglalhatjuk össze:

1. *In vitro* körülmények között meghatároztuk, hogy 1,5 mM bemérési koncentrációjú hidrogén-peroxid által kifejtett oxidatív stressz hatására 50% körüli növekedés gátlás lép fel a *R. oryzae* és *R. microsporus* törzs esetén. Ennél nagyobb hidrogén-peroxid koncentráció hatására a *R. microsporus* a *R. oryzae* törzshöz képest érzékenyebbnek bizonyult komplett és minimál tápoldatban egyaránt.
2. Meghatároztuk a spórák csírázásának dinamikáját hidrogén-peroxid jelenlétében és hiányában.
3. Össz kataláz aktivitást mértünk *R. oryzae* és *R. microsporus* különböző életállapotaiban, valamint oxidatív stressz hatása mellett. Minden esetben a *R. oryzae* kataláz aktivitása volt nagyobb.
4. Filogenetikai törzsfát készítettünk. Megállapítottuk, hogy a CAT1 fehérje a monofunkcionális kis alegység katalázok 3-as kládjában, a peroxiszómális katalázok között foglal helyet. A CAT2, CAT3, CAT4 fehérjék a monofunkcionális nagy alegység katalázok 2-es kládjába illeszkednek be, a törzsfán egymáshoz közel.
5. Kataláz fehérjék szekvenciaelemzése során beazonosítottuk a hem és NADPH kötéséhez szükséges konzervált pozíciójú aminosavakat.
6. Homológiamodellezést végeztünk:
 - Monomer egységek modellezése során modellezési stratégiát dolgoztunk ki. A prosztetikus csoport jelenléte és loopmodellezés javította a modellt. A modell minőségét a modell és a megfelelő templát fehérje százalékos szerkezet átfedés értékével számszerűsítettük.
 - Tetramerek modellezésekor több lánc együttes modellezése és a szimmetria feltétel tovább javították a modellt. Ez különösen nagymértékben érvényesült hosszú láncú fehérjének rövid láncú templáttal való modellezésénél, mintha a tetramer láncai egymást igazítanák helyre.
 - 1008 egy templáton alapuló homológiamodellt alkottunk meg

- Végző tetramer modell több templáttal egyidejűleg, hem jelenlétében, loopmodellezéssel, szimmetria feltétel alkalmazásával valósult meg.
 - A konzervált pozíciójú aminosavak a homológiamodellekben azonos módon megtalálhatók.
 - Az így kapott modellek aktív centrumában megtalálható az a kulcsfontosságú hisztidint, amelynek cseréje által a kataláz fehérjék funkcióképtelenné tehetők.
7. A homológiamodellekkel filogenetikai viszonyokat határoztunk meg: a homológiamodellezéssel kapott katalázok és a templátok háromdimenziós szerkezeti hasonlósága (`iterative_structural_align`) abban az esetben volt a legnagyobb, amikor a templát és a modellezett fehérje a kataláz törzsfa azonos helyén volt.
 8. Kvantitatív PCR segítségével detektáltuk a gének transzkripció szintjeinek változását a fejlődés előrehaladtával, oxidatív stressz meglétében és hiányában.
 9. Izoenzim analízis által képet kaptunk a gomba eltérő életállapotaiban a kataláz fehérjék enzimatis aktivitásáról.
 10. A *R. oryzae* és *R. microsporus* fertőzőképességét egészséges és immunszuppresszált egyedekben vizsgáltuk. Egér modellben az immunszuppressziót ciklofoszfamiddal indukáltuk. A *R. oryzae* fertőzés lefolyása intenzívebb volt a *R. microsporus* fertőzés lefolyásához képest.
 11. A kataláz enzimek patogenitásban betöltött szerepének vizsgálatához a gének elrontását lehetővé tevő transzformáló vektorokat készítettünk. A deléciós vektorokkal jelenleg transzformációs kísérletek folynak.

A fokozatszerzéshez kapcsolódó közlemények:

1. **Linka B**, Ötvös F, Szakonyi G, Nagy LG, Petkovits T, Papp T, Vágvölgyi Cs, Benyhe S (2012) Homology modeling and phylogenetic relationships of catalases of an opportunistic pathogen *Rhizopus oryzae* Life sciencis (Elsevire) (accepted with revision).*I.F.=2.451*
2. Palágyi Zs, **Linka B**, Papp T, and Vágvölgy Cs (2006) Isolation and characterization of *Xanthophyllomyces dendrorhous* mutants with altered carotenoid content. *Acta Alimentaria Hung* 35, 223-228. *IF: 0.253 Citacions:1*

A dolgozat témájához kapcsolódó poszterek:

1. Takó M, Vágvölgyi Cs, Palágyi Zs, **Linka B**, and Papp T (2005) Characterization of carotenoid over-producing *Xanthophyllomyces dendrorhous* mutants. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 52 (S), 161.
2. **Linka B**, Papp T, Nyilasi I, Vágvölgyi Cs (2006) Cloning and molecular analysis of the catalase 1 gene from the opportunistic pathogen *Rhizopus oryzae*. *Acta Microbiol Immunol Hung* 53, 310.
3. **Linka B**, Krizsán K, Papp T, Szekeres A and Vágvölgyi Cs (2007) Sensitivity of different Zygomycetes to the sesterterpene, ophiobolin A. *Acta Miikrobiol. et Immun. Hung.* 54, 76.
4. **Linka B**, Papp T, Vágvölgyi Cs (2008) Construction and analysis of a catalase deficient mutant of the zygomycete fungus, *Rhizopus oryzae*. *Acta Microbiol Immunol Hung* 55, 218-219.
5. **Linka B**, Pesti M, Kálmán N, Vágvölgyi Cs, Papp T (2009) Cloning and analysis of catalase genes from the opportunistic pathogene *Rhizopus oryzae*. 11th Regional Conference on Environment and Health DKMT-2009, 15-16 May, Szeged, Hungary, Abstracts.
6. **Linka B** (2009) Characterization of catalase genes in *Rhizopus oryzae*. *Acta Universitatis Szegediensis* 53, 66-67.

7. **Linka B**, Papp T, Vágvölgyi Cs (2009) Isolation and characterization of four catalase genes from *Rhizopus oryzae*. *Acta Microbiol Immunol Hung* 56, 197-198.

8. **Linka B**, Ötvös F, Szakonyi G, Nagy LG, Papp T, Vágvölgyi Cs, Benyhe S (2012) Homology modeling of putative catalases of an opportunistic pathogen *Rhizopus oryzae*. Magyar Élettani Társaság Membrántudományi Szakosztálya Romhányi György Alapítvány 42. 86.

Egyéb közlemények:

1. Csernetics Á, Péteri Zs, **Linka B**, Takó M (2005) *Physiological and genetic variability of Zygomycetes causing post-harvest decay*. *Acta Pytopathol. Entomol. Hung.* 40, 267-277.

2. Lukács Gy, **Linka B**, Nyilasi I (2006) *Phaffia rhodozyma and Xanthophyllomyces dendrorhous: astaxanthin-producing yeasts of biotechnological importance*. *Acta Alimentaria* 35, 99-107. *I.F.=0,253*

3. Csernetics Á, **Linka B**, Krisch J, Vágvölgyi Cs, Papp T (2007) Increased carotenoid content of *Xanthophyllomyces dendrorhous* cultivated in plant oil supplemented media. *Acta Biol Szeged* 51(1):43-46.

További konferenciaszereplések, előadások

1. Takó M, **Linka B**, Papp T, Vágvölgyi Cs (2006) A novel β -glucosidase gene from *Rhizomucor miehei*. ECFG-8. Vienna, Austria. Abstracts 257.

2. Vágvölgyi Cs, Takó M, **Linka B**, Nyilasi I, Nagy E, Papp T (2006) Comparison of *Candida* species on the basis of their phospholipase D sequences. ECFG-8. Vienna, Austria. Abstracts 427.

3. **Linka B** (2006) Cloning and molecular analysis of the catalase 1 gene from *Rhizopus oryzae* VMTDK Novi Sad, Srbija. Abstracts 45-46.

4. Ötvös F, **Linka B**, Benyhe Sándor (2011) A *Rhizopus oryzae* humánpatogén járomspórás opportunistá gomba kataláz fehérjéinek homológia modellezése. Peptidkémiai Munkabizottság tudományos ülése.

Társ szerzői nyilatkozat

Kijelentjük, hogy Linka Beáta szerepe meghatározó jelentőségű volt a

Linka B, Ötvös F, Szakonyi G, Nagy LG, Petkovits T, Papp T, Vágvölgyi Cs, Benyhe S (2012) Homology modeling and phylogenetic relationships of catalases of an opportunistic pathogen *Rhizopus oryzae*. Life sciencis (Elsevire) (accepted with revision).*I.F.*=2.451

Palágyi Zs, **Linka B**, Papp T, and Vágvölgy Cs (2006) Isolation and characterization of *Xanthophyllomyces dendrorhous* mutants with altered carotinoid content. *Acta Alimentaria Hung* 35, 223-228. *IF*: 0.253

címmel megjelent közleményekben, így az értekezésben és a publikációkban közölt eredményeket tudományos fokozat (Ph.D.) megszerzésére nem használtuk fel és ezt a jövőben sem fogjuk tenni.

Szeged, 2012. május. 2.

Prof. Dr. Vágvölgyi Csaba

Dr. Papp Tamás

Dr. Ötvös Ferenc

Dr. Benyhe Sándor

Dr. Szakonyi Gerda

Dr. Palágyi Zsuzsanna

Dr. Nagy László

Petkovits Tamás