

**Terápiás potenciállal rendelkező növényi szimbiotikus peptidok  
patogén gombákra gyakorolt hatásának és toxicitásának  
vizsgálata**

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

**Fábri-Ördögh Lilla**

**Témavezető: Dr. Kereszt Attila**

**Biológia Doktori Iskola**

Szegedi Tudományegyetem

Természettudományi és Informatikai Kar

MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Biokémia Intézet

Szeged

2014

## BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS

A gombás fertőzések, más néven mikózisok kórokozói az élet minden területét érintik az egész világon. A kórházi vagy egészségügyi intézményekben szerzett, úgynevezett nozokomiális fertőzések, vagy más gomba okozta betegségek nem csak az emberi lakosságot fenyegetik, hanem az állatokat és növényeket is.

A mikrobákkal szembeni drog rezisztencia globális méretű népegészségügyi problémává vált napjainkra, így szükségszerű új antimikrobiális szereket bevetni az egyre többféle szernek ellenálló kórokozókkal szemben. Az antibiotikum rezisztencia nem csak a baktériumokat érinti. Egyre több tanulmány számol be olyan patogén gomba izolátumokról, melyekkel szemben az általánosan használatos antifungális szerek hatástalannak bizonyulnak.

Az antimikrobiális peptidek (AMP), mint újgenerációs antibiotikumok, hatékony megoldást nyújthatnak az antibiotikum rezisztencia problémakörének megoldására. Antimikrobiális peptideket a baktériumoktól kezdve minden rendszertani kategóriába tartozó élőlény termel, növényekben, illetve gerinces és gerinctelen állatokban ezen vegyületek a veleszületett immunitás effektor molekulái. Vannak közöttük vírus, baktérium, protozoa és gomba ellenes aktivitással rendelkezők, valamint olyanok, melyek antibakteriális és antifungális hatással egyaránt bírnak. Széles hatásspektrumuknak és a rájuk jellemző gyors ölő, vagy gátló aktivitásuknak köszönhetően ezek a természetes molekulák ígéretes jelölteknek tekinthetők a kórokozókkal szembeni harcban.

Növényi antimikrobiális peptideket már izoláltak a növény minden részéből, így a gyökérből, a szárból, levélből, virágból és a magból is. A nemrégiben azonosított gümőspecifikus ciszteinben gazdag peptideket (nodule-specific cysteine rich peptides), röviden NCR-eket bizonyos pillangós virágú növények a gyökerükön fejlődő szimbiotikus szerv, a nitrogénkötő gümő

sejtjeiben termelik. Itt elsődleges szerepük a szimbiotikus partner (rhizobiumok) terminális differenciációjának irányítása. Az NCR-ek rövid peptidek, 30-50 aminosavból állnak és 4-6 ciszteint tartalmaznak konzervált pozícióban, ami alapján az antimikrobiális peptidek egy csoportjához, a defenzinekhez hasonlíthatóak. *Medicago truncatula*-ban eddig közel 500 NCR-t kódoló gént azonosítottak. Az érett peptidek elsődleges szekvenciája gyenge homológiát mutat és jelentős eltérések figyelhetők meg mind izoelektromos pontjukban, expressziós mintázatukban, mind pedig aktivitásukban.

Csoportunk korábban kimutatta, hogy egyes, magas izoelektromos ponttal rendelkező NCR peptidek antimikrobiális hatással rendelkeznek számos Gram-negatív és Gram-pozitív baktériummal szemben.

1. Ennek tükrében, első körben arra voltunk kíváncsiak, hogy az NCR-ek hatékonyak lehetnek-e gombákkal szemben is. Ehhez 19 eltérő izoelektromos ponttal rendelkező NCR peptid hatását vizsgáltuk meg tíz patogén gombafajjal szemben.
2. A továbbiakban célunk volt annak kiderítése, hogy a vizsgált, antifungális aktivitással rendelkező NCR peptidek milyen mechanizmussal fejtik ki hatásukat élesztőszerűen növekvő gombákon, mely sejtalkotók illetve fehérjék a célpontjaik.
  - a. Ennek érdekében, vizsgálni akartuk az NCR peptidek esetleges gombamembránt károsító hatását.
  - b. Meg akartuk határozni az NCR peptidek lokalizációját a célsejten.
  - c. Megpróbáltuk azonosítani az NCR peptidekkel kölcsönható fehérje partnereket.

3. Végző célunk pedig annak megállapítása volt, hogy az NCR peptidek alkalmazhatók-e terápiás célra, melynek előfeltétele, hogy ne legyenek toxikusak emlős/humán sejtekre, s képesek legyenek *in vitro* és *in vivo* leküzdeni a gombás fertőzést.

Ez utóbbi két pont (2., 3.) megvalósításához célorganizmusnak a *Candida albicans*-t választottuk, mely az egyik leggyakoribb opportunistá humán patogén gomba.

## **ALKALMAZOTT MÓDSZEREK**

### **A vizsgálatokban szereplő mikroorganizmusok és tenyésztési körülményeik**

A *Candida* fajokat (*Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Canida glabrata*) YPD táptalajon tartottuk fenn. A *Malassezia furfur*-t *Pityrosporum* médiumon (DSMZ472) növesztettük. A *Trichophyton mentagrophytes* Sabouraud agaron, míg a többi fonalas gomba, így az *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Fusarium graminearum* és a *Rhizopus stolonifer var. stolonifer* malátás táptalajon volt fenntartva. *C.albicans*-on hifás növekedést szérumentes komplett keratinocita médiummal (CKM) indukáltunk.

Az NCR peptidekkel végzett érzékenységi vizsgálatokat az alacsony só koncentrációjú, a defenzinek antifungális hatásának tanulmányozására használt táptalajban (low-salt medium, LSM), illetve egy glükózos foszfát pufferben (PBgluc) végeztük.

### **A vizsgálatokban szereplő humán sejt vonal**

A citotoxicitási vizsgálatokat PK E6/E7 immortalizált humán vaginális epitél sejt vonalon végeztük, melyet 5 ng/ml rekombináns epidermális növekedési faktoral, 50 µg/ml marha agyalapi mirigy kivonattal, L-glutaminnal és antibiotikum/antimikotikum oldattal kiegészített szérumentes CKM-ben tartottuk fenn, 37 °C-os CO<sub>2</sub> termosztátban. A sejtnövesztő flaskákban 60-70% konfluenciát mutató sejteket használtuk fel a kísérletekhez.

### **Alkalmazott peptidek**

Kémiai úton szintetizált érett, szignál peptid nélküli, valamint N-terminálisán fluorescein isothiocyanáttal (FITC) jelölt NCR peptideket használtunk.

## **Antifungális érzékenység vizsgálat**

Az NCR peptidek *in vitro* antifungális aktivitását mikrohígítási módszerrel vizsgáltuk 96-lyukú sík aljú lemezben. A peptidek hatását a gombák növekedésére a kezelés megkezdését követően 24 és 48 órával mikroszkópos vizsgálatokkal, valamint a kultúrák növekedésének mérésével határoztuk meg. A növekedés mértékére a 600 nm-en történő abszorbanciából következtettünk, melyet egy FLUOstar OPTIMA mikrotiter lemez leolvasó készülékkel (BMG Labtech) mértünk meg.

## **Fluoreszcens és konfokális mikroszkópia**

A peptidek okozta morfológiai változásokat *C. albicans*-on Axio Observer Z.1 (Zeiss) fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk. A peptid-gomba viszony (a peptid lokalizációja a célsejten/-ben) tanulmányozáshoz FITC-konjugált peptideket használtunk, és a kezelt *C. albicans* sejtekről Olympus Fluoview FV1000 konfokális pásztázó lézer mikroszkóppal (Olympus) készítettünk felvételeket.

## **Sejtmembrán permeabilitásának vizsgálata**

A sejtmembrán permeabilitásának NCR peptidkezeléseket követő változását az intracellulárisan felhalmozódott festék, a calcein sejtől történő felszabadulásának mérésével monitoroztuk. A sejt-permeabilis, nem-fluoreszcens Calcein-acetoximetil (Calcein-AM) festék az élő sejtekben intracelluláris észterázok hatására az acetoximetil észter hidrolízisét követően calceinné alakul, mely erős zöld-fluoreszcens jelet ad. A calcein hidrophil, így nem tud átjutni a sejt membránon és csak valamilyen membrán permeabilizáló ágens hatására tud kiszabadulni a sejtek citoplazmájából.

## **Affinitás kromatográfiai vizsgálatok *C. albicans* fehérje preparátumokon**

Affinitás kromatográfiát alkalmaztunk a kationos NCR247 intracelluláris célpont molekuláinak kutatásához. Első körben teljes sejtlizátumot használtunk, majd a lehúzási (pull-down) kísérleteket megismételtük csak plazmamembránt tartalmazó izolátummal is. A lehúzásokból származó fehérjék azonosítása LC-MS/MS tömegspektrometriai analízis segítségével történt.

## **Feltételezett kölcsönható partnerek vizsgálata élesztő kettős-hibrid módszerrel**

A tömegspektrometriai analízis során azonosított fehérjékből négy lehetséges kölcsönható partnert választottunk ki (transzlációs elongációs faktor 3, *CEF3*; transzlációs elongációs faktor 2, *EFT2*; eukarióta iníciációs faktor 4A, *eifA4*; hősokk protein, *hsp*), melyek kölcsönhatását a csalipeptidként használt NCR247 peptiddel élesztő kettős-hibrid rendszerben ellenőriztük.

## **Kvantitatív valós idejű PCR (qRT-PCR)**

Egy másik, szintén lehetséges NCR-rel kölcsönható fehérje a PIL1 génexpressziós változását vizsgáltuk qRT-PCR-rel, amelyhez peptid kezelt, kontrollként pedig kezeletlen és amfotericin B-vel kezelt *C. albicans*-ból tisztított RNS mintákból írt cDNS-eket használtunk.

## **Citotoxicitási vizsgálatok**

Az NCR peptidek esetleges toxikus hatását humán sejtekkel szemben, kétféle életképességi teszttel vizsgáltuk:

*MTT próba*: egy szemi-kvantitatív módszer, melynek során a sejtek metabolikus aktivitásáról kapunk információt az MTT (3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromid)-ból mitokondriális reduktázok hatására képződő formazán abszorbanciájának méréséből.

*Valós idejű sejt analízis (Real-Time Cell Analysis, RTCA):* egy kvantitatív, jelölés nélküli módszer, mely letapadt sejtek valós idejű monitorozását teszi lehetővé, impeadncia-változás mérése során.

Ez utóbbi módszert használtuk az NCR peptidek aktivitásának vizsgálatára egy *in vitro* fertőzéses kísérletben is, ahol a humán vaginális epitél sejteket *C. albicans* sejtekkel fertőztük.

## EREDMÉNYEK

Munkánk során azt tapasztaltuk, hogy egyes magas izoelektromos ponttal rendelkező NCR peptidek nagyfokú aktivitást mutatnak mind élesztőszerűen növe ( *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. crusei*, *C. glabrata*, *M. furfur*), mind pedig fonalas gombákkal (*T. mentagrophytes*, *A. flavus*, *A. niger*, *R. stolonifer*, *F. graminearum*) szemben is. A peptidek 6,25 – 25 µg/ml koncentráció tartományban gátolták az élesztőszerűen növe gombák sarjadzását, a fonalas gombák spóráinak csírázását, valamint a hifafonalak továbbnövekedését. Azonban nem csak növekedés gátlást tapasztaltunk ebben a tartományban, hanem a részletesebben vizsgált *C. albicans* esetében fungicid hatást is. Általánosan elmondható, hogy az általunk megvizsgált peptidek közül a 9-nél magasabb izoelektromos ponttal rendelkező NCR peptideknek volt gátló aktivitása.

Annak kiderítésére, hogy a vizsgált kationos NCR peptidek milyen mechanizmussal fejtik ki hatásukat élesztőszerűen növekvő gombákon, mely sejtalkotók illetve fehérjék a célpontjaik, az egyik leggyakoribb oportunista humán patogén gombát, a *Candida albicans*-t választottuk. Az antimikrobiális peptidek egyik gyakori célpontja a sejtmembrán integritásának megszüntetése. Fluoreszcensen jelölt NCR peptideket alkalmazva megállapítottuk, hogy

elsősorban a sejtmembránban lokalizálódnak, a membrán permeabilizáció vizsgálatára használt calcein felszabadulása pedig a membrán integritásának megváltozását igazolta. Membránkárosító hatásukat pszeudohifás alakon is tapasztaltuk. Mindezek mellett nem zárhatók ki sejten belüli célpontok sem.

Affinitás kromatográfia segítségével nagyszámú feltételes kölcsönható partnert kaptunk az egyik kationos peptid esetében. Ezek többsége riboszóma fehérje, illetve más, translációban szerepet játszó faktor volt. Néhány kölcsönhatást és célpontot ezek közül élesztő kéthibrid rendszerben illetve valós idejű PCR reakcióban próbáltunk validálni, ám ezzel a módszerrel nem találtunk tényleges kölcsönhatást az NCR peptid és a gomba fehérjéi közt.

A terápiás alkalmazhatóság érdekében életképességi tesztekkel vizsgáltuk az NCR-ek esetleges citotoxicitási aktivitását humán vaginális epitél sejteken. Az élő sejtek metabolikus aktivitását mérő MTT teszt alapján az antifungális koncentráció tartományban (<25 µg/ml) a kationos peptidek nem, vagy csak enyhén befolyásolták a humán sejtek életképességét. Ugyanakkor, az élő sejtek számának valós idejű monitorozása során, melyet a Roche ellenállás-méréseken alapuló xCelligence rendszerével végeztünk, kiderült, hogy a peptid kezelés gátolja osztódásukat.

Az aktív kationos NCR peptidek nemcsak az élesztő formát voltak képesek gátolni, de *in vitro* kevert kultúrában megakadályozták a fonalas forma növekedését is és ezáltal azok humán epitél sejtekre kifejtett ölü hatását. Tapasztalataink alapján, a só és a szérum jelenléte gátolja antifungális aktivitásukat. Ezen eredmények alapján, az NCR peptidek, ha az alkalmazáshoz olyan megfelelő közegben formulázzák őket, amelyben képesek megőrizni aktivitásukat a humán epitél felszínén, alkalmasak lehetnek felszíni kandidiázisok kezelésére.

## A DOLGOZAT ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNY

- **Ördögh L.**, Vörös A., Nagy I., Kondorosi É., Kereszt A. (2014) Symbiotic plant peptides eliminate *Candida albicans* both *in vitro* and in an epithelial infection model and inhibit the proliferation of immortalized human cells. *BioMed Research International*. Volume 2014, Article ID 320796  
(IF<sub>2014</sub>=2,706)

## EGYÉB KÖZLEMÉNYEK

- **Ördögh L.**, Hunyadkürti J., Vörös A., Horváth B., Szűcs A., Urbán E., Kereszt A., Kondorosi É., Nagy I. (2013) Complete genome sequence of *Propionibacterium avidum* Strain 44067, isolated from a human skin abscess. *Genome Announcements*. 1(3):e00337-13.
- **Ördögh L.**, Galgóczy L., Krisch J., Papp T. and Vágvölgyi Cs. (2010) Antioxidant and antimicrobial activities of fruit juices and pomace extracts against acne-inducing bacteria. *Acta Biologica Szegediensis* 54(1):45-49  
(IF<sub>2011</sub>=0,55)
- Galgóczy L., **Ördögh L.**, Virágh M., Papp T., and Vágvölgyi Cs. (2009) In vitro susceptibility of clinically important Zygomycetes to combinations of amphotericin B and suramin. *J. Mycol. Med.* 19(4), 241-247
- Galgóczy L., Papp T., Kovács L., **Ördögh L.** and Vágvölgyi Cs. (2008) In vitro activity of phenothiazines and their combinations with amphotericin B against zygomycetes causing rhinocerebral zygomycosis. *Med. Mycol.* 47, 331-335.  
(IF<sub>2012</sub>=2,13)
- Krisch J., **Ördögh L.**, Galgóczy L., Papp T., and Vágvölgyi Cs. (2008) Anticandidal effect of berry juices and extracts from *Ribes* species. *Cent. Eur. J. Biol.* 4, 86-89.  
(IF<sub>2008</sub>=0,250)