

METABOLIZMUS KVASINIEK RODU *Malassezia*

ZUZANA SIHELSKÁ^a, PETER VÁCZI^b,
EVA ČONKOVÁ^b, EMIL HOLODA^a,
MARIÁN BADLÍK^a a JURAJ PISTL^a

^a Katedra mikrobiológie a imunológie, ^b Katedra farmakológie a toxikológie, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice
zuzana.sihelska@post.sk

Došlo 15.1.14, prijaté 20.2.14.

Kľúčové slová: *Malassezia*, metabolizmus, lipidy, lipázy, pigment

Obsah

1. Úvod
2. Metabolizmus malassezií
 - 2.1. Lipázy a fosfolipázy
 - 2.2. Tvorba pigmentov
3. Záver

1. Úvod

Bazidiomycétové kvasinky rodu *Malassezia* sú eukaryotické jednobunkové organizmy. Sú súčasťou mikrobiálnej flóry kože ľudí a teplokrvných zvierat, ale zároveň môžu vyvolať kožné ochorenia alebo otitídy. U zvierat najčastejšie spôsobujú otitídy a dermatitídy¹ a u ľudí atopickú dermatitídu, lupiny, folikulitídy, pityriasis versicolor (PV) alebo seboroickú dermatitídu (SD)².

V súčasnosti poznáme až 14 druhov malassezií a veľký počet kmeňov. Môžeme ich rozdeliť do troch skupín podľa hostiteľa: malassezie izolované len zo zvierat (*M. caprae*, *M. equina*, *M. cuniculi* a *M. nana*), malassezie prítomné predovšetkým u ľudí (*M. dermatis*, *M. japonica*, *M. obtusa*, *M. restricta*, *M. yamatoensis*) a malassezie vyskytujúce sa u zvierat, aj u ľudí (*M. furfur*, *M. globosa*, *M. slooffiae*, *M. sympodialis* a *M. pachydermatis*)³. Malassezie sú známe svojím lipofilným charakterom, čo sa odráža v stavbe ich bunky a produkcii enzýmov. Ich izolácia, kultivácia a diagnostika je sťažená ich závislosťou od lipidov. Len jeden druh, *M. pachydermatis*, je schopný kultivácie bez prídavku lipidov a 13 ďalších je lipid-dependentných^{3,4}. Na ich kultiváciu sa musia využívať špeciálne médiá obohatené o rôzne lipidové zdroje (napr. Modifikovaný Dixonov agar⁵, Leeming & Notman agar⁶ a iné).

2. Metabolizmus

Bunková stena je viacvrstvová s hrúbkou približne 0,12 µm, pričom dosahuje 26 až 37 % celkového objemu bunky⁷. Skladá sa z viacerých vrstiev, z ktorých dve sú hlavné. Okolo bunkovej steny sa nachádza vonkajšia lamelárna vrstva, ktorá vyzerá pod elektrónovým mikroskopom ako membrána s transparentným stredom obklopeným dvoma hustými líniami. Štruktúra lamelárnej vrstvy pozostáva z rôznych lipidových zlúčenín, a to v závislosti od zloženia kultivačného média⁸. Cytoplazmatická membrána prilieha tesne k vnútornému povrchu bunkovej steny⁹. Hlavnými súčasťami bunkovej steny sú sacharidy (~70 %), proteíny (~10 %) a lipidy (15 až 20 %) s malým množstvom dusíka a síry. Pätnásť percentný obsah lipidov v bunkovej stene malassezií je podstatne vyšší ako u iných kvasiniek a predpokladá sa, že zodpovedá za odolnosť bunky voči vonkajším vplyvom¹⁰. Funkcia mnohých zlúčenín bunkovej steny ešte stále nie je definovaná.

Malassezie nie sú schopné fermentovať cukry, ale využívajú lipidy ako jediný zdroj uhlíka¹¹. Využitie lipidov sa používa aj pri diferenciálnej diagnostike jednotlivých druhov malassezií. Nevyžadujú vitamíny, stopové prvky ani elektrolyty. Prednostne využívajú metionín ako hlavný zdroj síry, ale môžu tiež spotrebovať aj cystín alebo cysteín. Ako zdroj dusíka využívajú aminokyseliny a amóniové soli¹². Pri obohatení médií asparagínom, tiamínom a pyridoxínom bol zaznamenaný lepší rast, hoci tieto nepatria medzi esenciálne prvky potrebné pre rast^{11,13}. Jadro má jasne ohraničenú membránu, ktorá obklopuje granulárnu homogénnu nukleoplazmu. Vakuoly sa prezentujú v bunke obsiahnutými lipidmi a odlišujú sa vo veľkosti podľa veku bunky⁷. Prídavok väčšiny mastných kyselín s uhlíkovým reťazcom dlhším ako 10 uhlíkov podporuje rast malassezií a nezáleží, či obsahujú párne alebo nepárne uhlíkové reťazce. Zdroj lipidov využívajúci sa počas rastu ovplyvňuje obsah mastných kyselín v týchto kvasinkách¹⁴.

2.1. Lipázy a fosfolipázy

Malasseziám chýbajú gény kódujúce syntézu mastných kyselín, ale majú veľký počet génov pre syntézu enzýmov, ktoré zabezpečujú využitie lipidov¹⁵. Potreba malassezií asimilovať mastné kyseliny z vonkajších zdrojov sa odráža na schopnosti produkovať množstvo lipáz a fosfolipáz, ktoré boli dokázané v *in vitro*, ale aj v *in vivo* podmienkach¹⁶. Dlhoreťazcové mastné kyseliny sú vytvárané z kratších mastných kyselín a sú schopné transformácie z nasýtených na nenasýtené¹¹. Rozdiely boli zaznamenané v obsahu lipidových zlúčenín v bunke, a to v závislosti od zdroja lipidov vo vonkajšom prostredí, ale aj v samotnom metabolizme lipidov jednotlivých druhov malassezií^{14,17}. Autori popisujú vysokú extracelulárnu lipá-

zovú aktivitu (na membránu viazané extracelulárne lipázy) malassezií, avšak s druhovými rozdielmi¹⁶. Brunke a Hube v roku 2006 popísali u *M. furfur* prvý gén kódujúci lipázu. Gén MfLIP1 pozostáva z 1464 bázových párov kódujúcich proteín s molekulovou hmotnosťou 54,3 kDa. Samotný enzým je aktívny pri 40 °C a pH 5,8 (cit.¹⁸). Ďalšie lipázy boli charakterizované pri *M. pachydermatis*, s molekulovou hmotnosťou 48,1 kDa a pH optimom 7,5 (cit.¹⁹). U *M. globosa* bol objavený tzv. *M. globosa* LIP gén, ktorý kóduje 32 kDa enzým s aktivitou pri pH 5,5 (cit.²⁰). Zistilo sa, že lipázy u *M. globosa* sú schopné hydrolyzy len mono- a diglyceridov, avšak samotné bunky tohto malasseziového druhu hydrolyzujú aj triglyceridy. Predpokladá sa existencia ďalších prídavných lipáz, ktoré ešte nie sú preštudované. Xu a spol. v roku 2007 popísali 14 lipáz¹⁵. Ro a Dawson predpokladajú, že lipázová aktivita malassezií je základom patogenézy lupín a seboroidkej dermatitídy. Malassezie hydrolyzujú triglyceridy ľudského mazu a uvoľnené voľné mastné kyseliny spôsobujú iritáciu a začervenanie na koži²¹.

Malassezie produkujú enzýmy s lipoxygénázovou aktivitou, čo je demonštrované ich schopnosťou oxidovať voľné polynenasýtené mastné kyseliny. Lipidové peroxidázy tiež zohrávajú podstatnú úlohu v patogenéze pityriasis versicolor a popisuje sa aj ich toxický účinok na melanocyty²². Zistilo sa, že produkcia fosfolipáz u malassezií získaných z kožných lézií bola vyššia ako u malassezií izolovaných zo zdravej kože²³. Produkcia

fosfolipáz nie je ešte úplne preštudovaná, ale predpokladá sa ich významná patogénna úloha vo vzťahu *Malassezia*-ochorenie-koža. Riciputo a spol. v *in vitro* podmienkach sledovali produkciu fosfolipázy, ktorá spôsobila uvoľnenie kyseliny arachidonovej z HEp-2 bunkovej línie. Metabolity kyseliny arachidonovej zapríčínujú zápal kože²⁴.

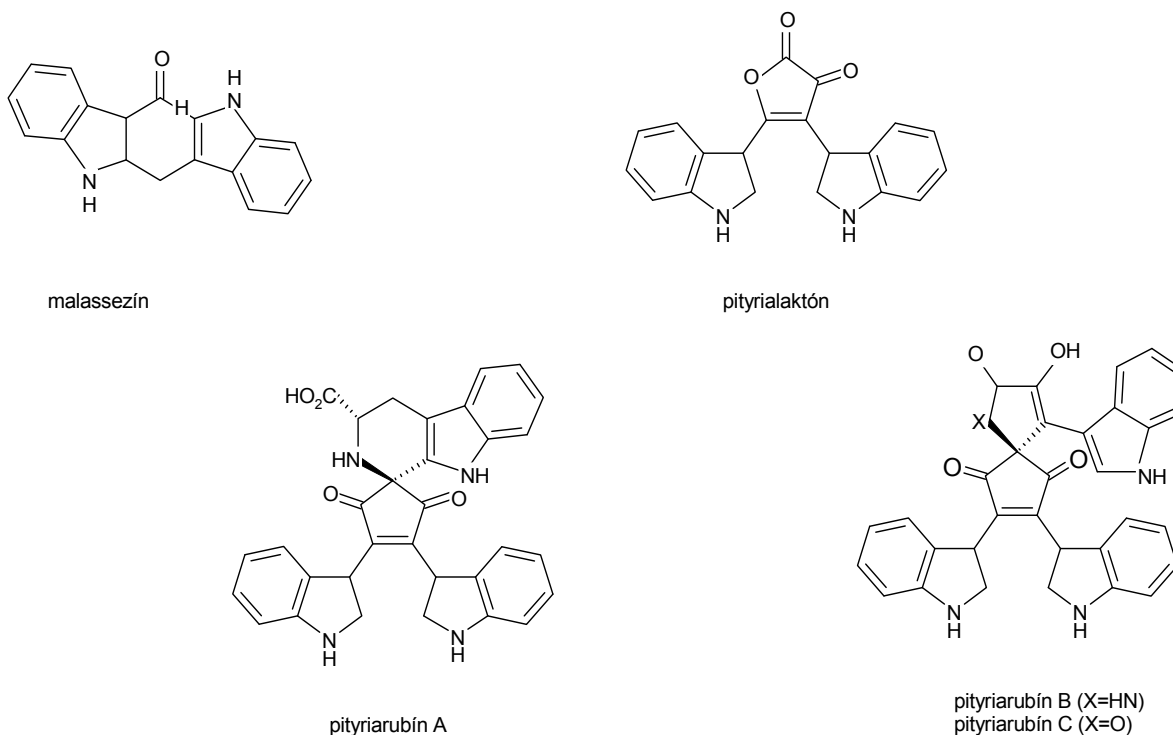
2.2. Tvorba pigmentov

Melanín

Pri pityriasis versicolor a seboroidkej dermatitíde dochádza u pacientov k hyperpigmentácii kože spôsobenej tmavým pigmentom melanínom. Hlavnými pôvodcami týchto ochorení sú malassezie. V roku 2006 Gaitanis a spol. publikovali štúdiu na dôkaz schopnosti malassezií získaných z kožných lupín z PV a SD oxidovať a produkovať melanín. Melanín detegovali pri malasseziách z ložísk s hyperpigmentáciou, zatiaľ čo u malassezií získaných z lézií bez pigmentácie nebol zistený. Malassezie boli testované na l-dihydroxyfenylalanín (L-DOPA) agare na množstvo a intenzitu tvorby melanínu, pričom *M. dermatis* v jeho produkcii vysoko prevyšuje *M. furfur*²⁵.

Pigmenty odvodené od tryptofánu

Najčastejšie izolovanou kvasinkou pri pityriasis versicolor je *M. furfur*. Zistilo sa, že je schopná previesť tryptofán do rôznych indolových alkaloidov, z ktorých niektoré vykazujú biologické vlastnosti, ktoré korelujú s niektorými



Obr. 1. Pigmenty produkované *M. furfur* (malassezín³¹, pityrialaktón²⁷, pityriarubíny²⁸) v prípade kultivácie na agare obsahujúcom tryptofán ako jediný zdroj dusíka

klinickými prejavmi PV. To naznačuje možnú úlohu týchto zlúčenín v patofyziológii ochorenia. Maysler a spol. zistili, že pri kultivácii *M. furfur* na agarovom médiu s tryptofánom ako jediným zdrojom dusíka produkuje hnedastý pigment. *M. sympodialis* nevytvára tento pigment a pri *M. pachydermatis* neboli výsledky jednoznačné²⁶. Pityriacitrín ($C_{20}H_{13}N_3O$) bol pozorovaný u *M. furfur* ako sekundárny produkt metabolizmu. Jeho významnou vlastnosťou je UV ochrana v mieste kožných lézií. Predpokladala sa aj potenciálna toxicita na *Candida albicans* a stafylokoky, ktorá sa však nepotvrdila²⁶.

Pityrialaktón ($C_{20}H_{12}N_2O_3$) (obr. 1) je fluorescenčná bisindolová zlúčenina, ktorá sa vo vodnom prostredí vyznačuje žltou fluorescenciou a v prostredí s obsahom lipidov zase modrou fluorescenciou. To by mohlo vysvetľovať mnohofarebné fluorescenčné PV lézie v závislosti na tom, či sa látka rozpustí v pote alebo v epidermálnych lipidoch²⁷.

Pityriarubín a pityriaanhydrid sú tehlovočervené pigmenty odvodené od bisindolu. V roku 2005 Krämer a spol. izolovali pityriarubíny typu A ($C_{32}H_{22}N_4O_4$), B ($C_{32}H_{20}N_4O_4$) a C ($C_{32}H_{19}N_3O_5$) (obr. 1), ktoré inhibujú neutrofilý²⁸.

Skupinu pigmentov uzatvára malassezín ($C_{18}H_{14}N_2O$) (obr. 1). Je to bezfarebná zlúčenina s acyklickou štruktúrou²⁹ a množstvom derivátov, napr. žltó-oranžovočervené *Malassezia*-karbazoly A, B, C a D, malasseziacitrín, keto-malassezín a iné. Zistilo sa, že malassezín môže spôsobiť indukciu apoptózy v ľudských melanocytoch, a to môže byť príčinou poškodenia melanocytov na kožných léziách pri PV alba³⁰.

3. Záver

Aj napriek veľkému záujmu o kvasinky rodu *Malassezia* a vyspelým biologicko-molekulárnym metódam sa o ich metabolizme ešte stále vie dosť málo. Najviac preštudovaný je ich lipidový metabolizmus, keďže lipidy využívajú ako jediný zdroj uhlíka. Obsah a druh lipidov v bunkovej stene a v samotnej bunke je závislý od ich zdrojov vo vonkajšom prostredí. *Malassezie* si nevedia vytvárať masné kyseliny, ale tie si zabezpečia z externých zdrojov lipázami a fosfolipázami. Len nedávno sa zistilo, že *malassezie* produkujú pigmenty odvodené od tryptofánu, ktoré zohrávajú úlohu v patogenéze kožných ochorení. Synergizmus malassezínu s ostatnými indolovými pigmentami je považovaný za príčinu klinických prejavov pityriasis versicolor, ako je hypopigmentácia, odolnosť PV lézií na UV žiarenie (pityriacitrín) a zníženie expresie zápalovej odpovede (pityriarubíny).

Práca bola podporená projektom APVV 0357-07 a realizáciou projektu Medicínsky univerzitný park v Košiciach (MediPark, Košice) ITMS:26220220185 OP Výskum a vývoj financovaného z Európskeho fondu regionálneho rozvoja (OP VaV-2012/2.2/08-RO).

LITERATÚRA

1. Crespo M. J., Abarca M. L., Cabañes F. J.: *Mycoses* 45, 333 (2002).
2. Guého E., Boekhout T., Ashbee H. R., Guillot J., Van Belkum A., Faergemann J.: *Med. Mycol.* 36, 220 (1998).
3. Cabañes F. J., Vega S., Castellá G.: *Med. Mycol.* 49, 40 (2011).
4. Gupta A., Kohli Y., Summerbell R., Faergemann J.: *Med. Mycol.* 39, 243 (2001).
5. Guého E., Midgley G., Guillot J.: *Antonie van Leeuwenhoek* 69, 337 (1996).
6. Leeming J. P., Notman F. H.: *J. Clin. Microbiol.* 25, 2017 (1987).
7. Keddie F. M., Barajas L.: *Int. J. Dermatol.* 11, 40 (1972).
8. Mittag H.: *Mycoses* 38, 13 (1995).
9. Wikler J. R., Janssen N., Bruynzeel D. P., Nieboer C.: *Acta Derm.-Venereol.* 70, 69 (1990).
10. Thompson E., Colvin, J. R.: *Can. J. Microbiol.* 16, 263 (1970).
11. Porro M. N., Caprilli F., Nazzaro P., Morpurgo G.: *J. Invest. Dermatol.* 66, 178 (1976).
12. Maysler P., Imkamp A., Winkler M., Papvassilis, C.: *Arch. Dermatol. Res.* 290, 277 (1998).
13. Benham R. W.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 58, 199 (1945).
14. Ran Y., Yoshike T., Ogawa H.: *J. Med. Vet. Mycol.* 31, 77 (1993).
15. Xu J., Saunders C. W., Hu P., Grant R. A., Boekhout T., Kuramae, E. E., Kronstad J. W., Deangelis Y. M., Reeder N. L., Johnstone K. R., Leland M., Fieno A. M., Begley W. M., Sun Y., Lacey M. P., Chaudhary T., Keough T., Chu L., Sears R., Yuan B., Dawson T. L.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 18730 (2007).
16. Catterall M. D., Ward M. E., Jacobs P.: *J. Invest. Dermatol.* 71, 398 (1978).
17. Maysler P., Pickel M., Haze P., Erdmann F., Papvassilis C., Schmidt R.: *Med. Mycol.* 36, 7 (1998).
18. Brunke S., Hube B.: *Microbiology* 152, 547 (2006).
19. Shibate N., Okanuma N., Hirai K., Arikawa K., Kimura M., Okawa Y.: *FEMS Microbiol. Lett.* 256, 137 (2006).
20. DeAngelis Y. M., Saunders C. W., Johnstone K. R., Reeder N. L., Coleman C. G., Kaczvinsky J. R., Gale C., Walter R., Mekel M., Lacey M. P., Keough T. W., Fieno A., Grant R. A., Begley B., Sun Y., Fuentes G., Youngquist R. S., Xu J., Dawson T. L.: *J. Invest. Dermatol.* 127, 2138 (2007).
21. Ro B. I., Dawson T. L.: *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.* 10, 194 (2005).
22. De Luca C., Picardo M., Breathnach A., Passi S.: *Exp. Dermatol.* 5, 49 (1996).
23. Cafarchia C., Otranto D.: *J. Clin. Microbiol.* 42, 4868 (2004).
24. Riciputo R.M., Oliveri S., Micali G., Sapuppo A.:

- Mycoses 39, 233 (1996).
25. Gaitanis G., Chasapi V., Velegriaki A.: J. Clin. Microbiol. 43, 4147 (2005).
 26. Mayser P., Wille G., Imkamp A., Thoma W., Arnold N., Monsees T.: Mycoses 41, 265 (1998).
 27. Mayser P., Stapelkamp H., Krämer H. J., Podobinska M., Wallbott W., Irlinger B., Steglich W.: Antonie van Leeuwenhoek 84, 185 (2003).
 28. Krämer H. J., Kessler D., Hipler U. C., Irlinger B., Hort W., Bödeker R. H., Steglich W., Mayser P.: ChemBioChem 6, 2290 (2005).
 29. Wille G., Mayser P., Thoma W., Monsees T., Baumgart A., Schmitz H. J., Schrenk D., Polborn K., Steglich W.: Bioorg. Med. Chem. 9, 955 (2001).
 30. Krämer H. J., Podobinska M., Bartsch A., Battmann A., Thoma W., Bernd A., Kummer W., Irlinger B., Steglich W., Mayser P.: ChemBioChem 6, 860 (2005).
 31. Gaitanis G., Magiatis P., Stathopoulou K., Bassukas I. D., Alexopoulos E. C., Velegriaki A., Skaltsounis A. L.: J. Invest. Dermatol. 128, 1620 (2008).

Z. Sihelská^a, P. Váczi^b, E. Čonková^b, E. Holoda^a, M. Badlík^a, and J. Pistl^a (^a Department of Microbiology and Immunology, ^b Department of Pharmacology and Toxicology, University of Veterinary Medicine and Pharmacy, Košice): **Metabolism of *Malassezia* spp Yeasts**

Despite a great interest in *Malassezia* yeasts their metabolism is still little known. Most studied is their lipid metabolism. Only recently it was found that *Malassezia* produces pigments derived from tryptophan, which play a role in the pathogenesis of skin diseases. Malassezin synergism with other indole pigments is considered to be the cause of clinical manifestation of pityriasis versicolor such as hypopigmentation, lesions resistant to UV radiation and decreased expression of inflammatory response.