

***A Neosartorya fischeri* antifungális protein (NFAP) heterológ expressziója és hatásmechanizmusának vizsgálata**

PhD-értekezés

Készítette:

Virágh Máté



Témavezetők:

Dr. Galgóczi László

tudományos munkatárs

Prof. Dr. Vágvölgyi Csaba

tanszékvezető egyetemi tanár

Biológia Doktori Iskola

Szegedi Tudományegyetem

Természettudományi és Informatikai Kar

Mikrobiológiai Tanszék

2015

Szeged

TARTALOMJEGYZÉK

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	3
2. BEVEZETÉS	8
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	10
3.1. A TÖMLŐSGOMBÁK DEFENZINSZERŰ FEHÉRJÉI	10
3.1.1 A tömlősgombák által termelt defenzinszerű fehérjék szerkezete, a szerkezetük és a hatásmechanizmusuk közötti összefüggések	13
3.1.2 Antifungális spektrum és hatás	17
3.1.3 Antifungális hatásmód.....	21
3.2 A <i>N. FISCHERI</i> ANTIFUNGÁLIS PROTEIN	25
3.3 A FONALAS TÖMLŐSGOMBÁK ÁLTAL TERMELT DEFENZINSZERŰ FEHÉRJÉK HETEROLÓG EXPRESSZIÓJA	27
3.4 AZ <i>IN SILICO</i> MODELLEZÉS ELMÉLETI ÉS GYAKROLATI LEHETŐSÉGEI.....	29
4. CÉLKITŰZÉSEK	32
5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	33
5.1. MIKROORGANIZMUSOK	33
5.2 TÁPKÖZEGEK, TENYÉSZTÉSI KÖRÜLMÉNYEK	34
5.2.1 Tápközegek	34
5.2.2 Tenyésztési körülmények	35
5.3 PUFFEREK, OLDATOK ÉS REAGENSEK.....	36
5.4 ALKALMAZOTT INDÍTÓSEKVENCIÁK.....	39
5.5 MÓDSZEREK	40
5.5.1 Az érett NFAP-t kódoló gén pPICZ α A vektorba történő klónozása.....	40
5.5.1.1 Az <i>nfap</i> cDNS amplifikálása.....	40
5.5.1.2 A pPICZ α A vektor tisztítása	41
5.5.1.3 Az érett NFAP-t kódoló cDNS klónozása pPICZ α A plazmidba	41
5.5.2 Az <i>nfap</i> cDNS-t hordozó pPICZ α A transzformálása <i>E. coli</i> TOP10F ⁻ sejtbe	42
5.5.2.1 <i>E. coli</i> TOP10F ⁻ kompetens sejt készítése	42
5.5.2.2 Baktérium transzformáció	42
5.5.3 A pPICZ α Anfap plazmid transzformálása <i>P. pastoris</i> KM71H-ba	43
5.5.3.1 Elektrokompétens <i>P. pastoris</i> KM71H sejt készítése	43
5.5.3.2 Élesztő elektroporáció	43
5.5.4 Az NFAP heterológ expressziója	45
5.5.5 A heterológ expresszió ellenőrzése	45
5.5.5.1 Fehérje gélelektroforézis	45
5.5.5.2 Coomassie-kék festés	45
5.5.5.3 Ezüst festés	46
5.5.6 A <i>P. pastoris</i> KM71H által termelt hNFAP tisztítása	46
5.5.6.1 Sómentesítés.....	46
5.5.6.2 Ultraszűrés.....	46
5.5.6.3 Kationcserés oszlopkromatográfia	46
5.5.7 A hNFAP azonosítása	47
5.5.7.1 A hNFAP tisztaságának ellenőrzése	47
5.5.7.2 A hNFAP koncentrációjának meghatározása.....	47
5.5.7.3 A hNFAP azonosítása tömegspektrometriával	47

5.5.7.4 N-terminális szekvenálás.....	48
5.5.14 Az NFAP szerkezetének vizsgálata.....	48
5.5.14.1 <i>In silico</i> szerkezetmeghatározás	48
5.5.8 Az NFAP termelése és tisztítása	49
5.5.9 Az NFAP és a hNFAP antifungális spektrumának összehasonlítása.....	49
5.5.10 A hNFAP hatására rövid és hosszú távon bekövetkező fenotipikus változások vizsgálata	50
5.5.10.1 Mikroszkópos vizsgálatok.....	50
5.5.10.2 A hNFAP hatásának vizsgálata a metabolikus aktivitására	50
5.5.10.4 A membránintegritás vizsgálata hNFAP jelenlétében	50
5.5.10.3 A lehetséges apoptotikus/nekrotikus események kimutatása hNFAP jelenlétében.....	51
5.5.10.5 Az aktin eloszlás vizsgálata hNFAP jelenlétében	51
5.5.10.6 A hNFAP kitintartalomra gyakorolt hatásának vizsgálata.....	51
5.5.11 A hNFAP lokalizációja a rá érzékeny sejtekben.....	51
5.5.11.1 hNFAP elleni antiszérum termelése	51
5.5.11.2 Western blot analízis	52
5.5.11.3 A hNFAP lokalizációjának vizsgálata <i>A. nidulans</i> -ban	52
5.5.12 <i>In vitro</i> antifungális érzékenységvizsgálatok jelátviteli utakban mutáns <i>A. nidulans</i> törzsekkel szemben	53
5.5.13 Statisztikai analízis.....	53
6. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK	54
6.1 AZ NFAP HETEROLÓG EXPRESSZIÓJA	54
6.1.1 Az NFAP heterológ termelésére alkalmas expressziós vektor létrehozása és transzformálása <i>Pichia pastoris</i> KM71H törzsbe.....	54
6.1.3 A natív NFAP termelése és tisztítása	55
6.1.2. A hNFAP termelése, tisztítása és azonosítása.....	55
6.5.1. Az NFAP szerkezetének a vizsgálata <i>in silico</i> módszerekkel.....	59
6.2 AZ NFAP ÉS A hNFAP ANTIFUNGÁLIS SPEKTRUMÁNAK ÖSSZEHASONLÍTÁSA.....	63
6.3 A hNFAP HATÁSÁRA RÖVID ÉS HOSSZÚ IDŐN BELÜL BEKÖVETKEZŐ FENOTIPIKUS VÁLTOZÁSOK	66
6.3.1 A hNFAP hatása az <i>A. nidulans</i> metabolikus aktivitására	66
6.3.3 A hNFAP hatása az <i>A. nidulans</i> membránjának integritására.....	67
6.3.2 A hNFAP kezelés hatására bekövetkező apoptotikus/nekrotikus események vizsgálata <i>A. nidulans</i> -on.....	67
6.3.4 A hNFAP hatása az aktin eloszlásra és kitin elhelyezkedésre <i>A. nidulans</i> hifában	69
6.3.5 A hNFAP lokalizációja <i>A. nidulans</i> FGSC A4 sejtekben	71
6.4. A hNFAP HATÁSMECHANIZMUSÁNAK VIZSGÁLATA	75
6.4.1 A hNFAP heterotrimer G-protein kapcsolt jelátviteli útvonalon keresztül aktiválja a cAMP/Pka szignáltranszdukciós útvonalat	75
6.4.2 A hNFAP egy sejtfa integritás útvonaltól független, mitogén által aktivált protien kináz A célponton keresztül is kifejti az antifungális hatását.....	79
6.4.3 A hNFAP nem aktiválja a CWI útvonalat.....	81
7. TARTALMI ÖSSZEFOGLALÓ	84
9. IRODALOMJEGYZÉK.....	94
10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	105

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

8-Br-cAMP:	<i>8-bromo</i> <u>a</u> <i>denosine-3'5'-cyclic monophosphate</i> (8-bromoadenozin-3'5'-ciklikus monofoszfát)
AC:	<u>a</u> <i>denilát-cikláz</i>
AcAFP:	<i>Aspergillus clavatus</i> ES1 <u>a</u> <i>ntifungal p</i> <u>r</u> <i>otei</i> n (A. <i>clavatus</i> ES1 antifungális protein)
AcAMP:	<i>Aspergillus clavatus</i> VR1 <u>a</u> <i>ntimicrobial p</i> <u>r</u> <i>otei</i> n (A. <i>clavatus</i> VR1 antimikrobiális protein)
AFPIM:	<i>Antifungal p</i> <u>r</u> <i>otei</i> n <u>i</u> <i>nduction m</i> <u>e</u> <i>dium</i> (antifungális protein indukáló tápoldat)
AMP:	<u>a</u> <i>ntimicrobial p</i> <u>r</u> <i>otei</i> n (antimikrobiális protein)
AnAFP:	<i>Aspergillus niger</i> KCTC202 <u>a</u> <i>ntifungal p</i> <u>r</u> <i>otei</i> n (A. <i>niger</i> KCTC202 antifungális protein)
AnAFP2:	<i>Aspergillus niger</i> CBS 513.88 <u>a</u> <i>ntifungal p</i> <u>r</u> <i>otei</i> n (A. <i>niger</i> CBS 513.88 antifungális protein)
AFP:	<i>Aspergillus giganteus</i> MDH18894 <u>a</u> <i>ntifungal p</i> <u>r</u> <i>otei</i> n (A. <i>giganteus</i> MDH18894 antifungális protein)
AFP _{NN5353} :	<i>Aspergillus giganteus</i> A3274 <u>a</u> <i>ntifungal p</i> <u>r</u> <i>otei</i> n (<i>Aspergillus giganteus</i> A3274 <u>a</u> <i>ntifungal p</i> <u>r</u> <i>otei</i> n)
BLAST:	<u>B</u> <u>a</u> <u>s</u> <u>i</u> <u>c</u> <u>L</u> <u>o</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>l</u> <u>A</u> <u>l</u> <u>i</u> <u>g</u> <u>n</u> <u>e</u> <u>m</u> <u>e</u> <u>n</u> <u>t</u> <u>S</u> <u>e</u> <u>a</u> <u>r</u> <u>c</u> <u>h</u> <u>T</u> <u>o</u> <u>o</u> <u>l</u>
BMG:	<u>b</u> <u>u<u>f</u><u>f</u><u>e</u><u>r</u><u>e</u><u>d</u> <u>m</u><u>i</u><u>n</u><u>i</u><u>m</u><u>a</u><u>l</u> <u>g</u><u>l</u><u>y</u><u>c</u><u>e</u><u>r</u><u>o</u><u>l</u> <u>m</u><u>e</u><u>d</u><u>i</u><u>u</u><u>m</u> (glicerolos minimál tápoldat)</u>
BMM:	<u>b</u> <u>u<u>f</u><u>f</u><u>e</u><u>r</u><u>e</u><u>d</u> <u>m</u><u>i</u><u>n</u><u>i</u><u>m</u><u>a</u><u>l</u> <u>m</u><u>e</u><u>t</u><u>h</u><u>a</u><u>n</u><u>o</u><u>l</u> <u>m</u><u>e</u><u>d</u><u>i</u><u>u</u><u>m</u> (metanolos minimál tápoldat)</u>
BP:	<i>Penicillium brevicompactum</i> DierckX <u>b</u> <u>u<u>b</u><u>b</u><u>l</u><u>e</u> <u>p</u><u>r</u><u>o</u><u>t</u><u>e</u><u>i</u><u>n</u></u>
cAMP:	<u>c</u> <u>y</u> <u>c</u> <u>l</u> <u>i</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>d</u> <u>e</u> <u>n</u> <u>o</u> <u>s</u> <u>i</u> <u>n</u> <u>e</u> <u>m</u> <u>o</u> <u>n</u> <u>o</u> <u>p</u> <u>h</u> <u>o</u> <u>s</u> <u>p</u> <u>h</u> <u>a</u> <u>t</u> <u>e</u> (ciklikus adenozin-monofoszfát)
CBS:	<u>C</u> <u>e</u> <u>n</u> <u>t</u> <u>r</u> <u>a</u> <u>a</u> <u>l</u> <u>b</u> <u>u</u> <u>r</u> <u>e</u> <u>a</u> <u>u</u> <u>v</u> <u>o</u> <u>o</u> <u>r</u> <u>S</u> <u>c</u> <u>h</u> <u>i</u> <u>m</u> <u>m</u> <u>e</u> <u>l</u> <u>c</u> <u>u</u> <u>l</u> <u>t</u> <u>u</u> <u>r</u> <u>e</u> <u>s</u> <u>B</u> <u>a</u> <u>a</u> <u>r</u> <u>n</u> , Utrecht, Hollandia

CFW:	<i>calcofluor white</i> (kalkofluor fehér)
CM:	<i>complete medium</i> (komplett tápoldat)
CWIP:	<i>cell wall integrity pathway</i> (sejtfalintegritás-útvonala)
DMSO:	<i>dimethyl sulfoxide</i> (dimetil-szulfoxid)
DTT:	<i>dithiothreitol</i> (ditiotreitól)
EGTA:	<i>ethylene glycol tetraacetic acid</i> (etilén-glikol-tetraecetsav)
ETH:	<i>Eidgenössische Technische Hochschule, Mycological Herbarium, Zürich, Svájc</i>
FDA:	<i>Food and Drug Administration</i> (Élelmiszer- és Gyógyszerfelügyeleti Hatóság), Silver Spring, USA
FGSC:	<i>Fungal Genetics Stock Center</i> , Kansas, USA
FITC:	fluoreszcein-izotiocianát
FPAP:	<i>Fusarium polyphialidicum</i> SZMC 11042 <i>antifungal protein</i> (<i>F. polyphialidicum</i> antifungális protein)
GAP:	<i>GTP-ase activating protein</i> (GTP-áz aktiváló protein)
GFP:	<i>green fluorescent protein</i> (zöld fluoreszcens protein)
HEPES:	4-(2-hidroxietyl)-1-piperazin-etánszulfonsav
hNFAP:	<i>Pichia pastoris</i> KM71H által termelt heterológ NFAP
HRP:	<i>horseradish peroxidase</i> (tormaperoxidáz)
IgG:	immunglobulin G
KCTC:	<i>Korean Collection for Type Cultures</i> , Daejeon, Koreai Köztársaság
latB:	<i>latrunculin B</i>
LSLB:	<i>low salt Luria Bertani broth/agar</i> (alacsony sótartalmú Luria Bertani tápoldat/táptalaj)

MDH:	<i>Michigan Department of Health</i> , Michigan, USA
MEA:	<i>malt extract agar/medium</i> (malátakivonatos táptalaj/táppoldat)
MES:	2-N-morfolino-etánszulfonsav
MIC:	<i>minimal inhibitory concentration</i> (minimális gátló koncentráció)
MM:	<i>minimal medium</i> (minimál táppoldat)
Mpk:	<i>mitogen-activated protein kinase</i> (mitogén-aktivált protein kináz)
MS:	<i>mass spectrometry</i> (tömegspektrometria)
NAF:	<i>Penicillium nalgiovense</i> BFE 66, 67, 474 <i>antifungális protein</i>
NFAP:	<i>Neosartorya fischeri</i> NRRL 181 <i>antifungális protein</i>
NMR:	<i>nuclear magnetic resonance</i> (mágneses magrezonancia)
NRRL:	<i>Northern Regional Research Laboratory Agricultural Research Service Culture Collection</i> , Peoria, USA
PAF:	<i>Penicillium chrysogenum</i> Q176 <i>antifungal protein</i> (<i>P. chrysogenum</i> Q176 <i>antifungális protein</i>)
Pc-Arctin:	<i>Penicillium chrysogenum</i> A096 <i>antifungal protein</i> (<i>P. chrysogenum</i> A096 <i>antifungális protein</i>)
PCR:	<i>polymerase chain reaction</i> (polimeráz láncreakció)
PDB:	<i>Protein Data Bank</i>
PgAFP:	<i>Penicillium chrysogenum</i> RP42C <i>antifungal protein</i> (<i>P. chrysogenum</i> RP42C <i>antifungális protein</i>)
PBS:	<i>phosphate buffered saline</i> (foszfát pufferes sóoldat)
PCD:	<i>programmed cell death</i> (programozott sejthalál)
pI:	izoelektromos pont
PI:	<i>propidium iodide</i> (propídium jodid)

Pka:	<u>p</u> rotein <u>k</u> ináz <u>A</u>
Pkc:	<u>p</u> rotein <u>k</u> ináz <u>C</u>
PVDF:	<u>p</u> oly <u>v</u> inylidene <u>d</u> ifluoride (polivinilidén-difluorid)
Q-TOF:	<u>q</u> uadrupole- <u>t</u> ime <u>o</u> f <u>f</u> light (kvadrupól repülési idő)
ROS:	<u>r</u> eactive <u>o</u> xygen <u>s</u> pecies (reaktív oxigén-fajták)
SDS-PAGE:	<u>s</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfate- <u>p</u> oly <u>a</u> crylamide <u>g</u> el <u>e</u> lectrophoresis (nátrium-lauril-szulfát-poliakrilamid gélelektroforézis)
SZMC:	<u>S</u> zeged <u>M</u> icrobiological <u>C</u> ollection, Szeged, Magyarország
TAE:	<u>t</u> ris- <u>a</u> cetic acid disodium- <u>E</u> DTA (tris-ecetsav-dinátrium-EDTA)
TBS/B:	<u>t</u> ris- <u>b</u> uffered <u>s</u> aline with <u>b</u> ovine <u>s</u> erum <u>a</u> lbumin (Tris pufferes sóoldat borjú szérum albuminnal)
TRIS:	tris-(hidroximetil)-aminometán
TRITC:	<u>t</u> etrametil- <u>r</u> odamin <u>i</u> zo <u>t</u> io <u>c</u> ianát
UAMH:	<u>U</u> niversity of <u>A</u> lberta <u>M</u> icrofungus <u>C</u> ollection and <u>H</u> erbarium, Edmonton, Kanada
YPD:	<u>y</u> east <u>e</u> xtract- <u>p</u> eptone- <u>d</u> extrose medium (élesztőkivonat-pepton-glükóz táptalaj/tápoldat)

A dolgozatban előforduló gének, DNS-régiók:

<i>agsA</i> :	α -1,3-glükán-szintáz
<i>chs7</i> :	<i>Fusarium oxysporum</i> kitinszintézis szabályozásában szerepet játszó chaperon-szerű fehérje
<i>chsB</i> :	<i>Aspergillus oryzae</i> III-as típusú kitin-szintáz
<i>chsD</i> :	<i>Aspergillus nidulans</i> kitin-szintáz

<i>chsV</i> :	<i>Fusarium oxysporum</i> V-ös típusú kitin-szintáz
<i>csmA</i> :	<i>Aspergillus nidulans</i> V-ös típusú kitin-szintáz
<i>fadA</i> :	<i>Aspergillus nidulans</i> RhoA GTP-áz fehérje α -alegysége
<i>gas1</i> :	<i>Fusarium oxysporum</i> glukanozil-transzferáz
<i>gpgA</i> :	<i>Aspergillus nidulans</i> RhoA GTP-áz fehérje γ -alegység
<i>pacC</i> :	<i>Fusarium oxysporum</i> sejtfalkiépülésének pH-függő szabályozásáért felelős transzkripciós faktort kódoló gén
pPICZ α A:	heterológ expressziós vektor
<i>rhoA</i> :	<i>Aspergillus nidulans</i> RhoA heterotrimer G-protein
<i>rlmA</i> :	az <i>agsA</i> -t aktiváló transzkripciós faktor <i>Aspergillus nidulans</i> -ban
<i>sfaD</i> :	<i>Aspergillus nidulans</i> RhoA GTP-áz fehérje β -alegysége

2. BEVEZETÉS

Az utóbbi két évtizedben folyamatosan emelkedett a fonalagombák által okozott fertőzések esetszáma, aminek a háttérében a legyengült immunrendszerrel rendelkező betegek számának a növekedése és az antimikotikumokkal szemben rezisztens fonalagomba-törzsek megjelenése áll (Nucci és Marr 2005; Miceli és Lee, 2011). Annak ellenére, hogy napjainkban számos új fejlesztésű antifungális szert alkalmaznak terápiás célból, az immuszupresszált betegek fonalagombák által okozott fertőzéseinek halálozási aránya az alkalmazott szertől és az immunszupresszió mértékétől függően 14% és 100% közé tehető (Miceli és Lee, 2011). A patogén fonalagombák hasonló felépítésbeli és fiziológiai tulajdonságokkal rendelkeznek, mint a humán gazda sejtjei (eukarióták), ami nagymértékben korlátozza a konvencionális antifungális szerek terápiás célú alkalmazhatóságát a lehetséges azonos támadáspontok és mellékhatások miatt. Mindez különösen jelentős lehet hosszú távú kezelések esetében. A fonalagombák által okozott fertőzések az állatvilág számára is komoly problémát jelentenek, veszélyeztetve ezzel a biodiverzitást. Kihalás veszélyezteteti például az amerikai és kanadai denevéropulációt, aminek a háttérében egy *Geomyces destructans* fertőzés áll (Fischer és mtsai., 2012). A mezőgazdaság és az élelmiszeripar számára is nehézségeket okoz a fonalagombák elleni küzdelem: a növénypatogén fonalagombák évről évre jelentős termésveszteségeket okoznak, valamint veszélyt jelenthetnek az emberek és állatok egészségére (Magan és mtsai., 2011). Az elmúlt néhány évben (véltetően a klímaváltozás következtében) Európában jelentős mértékben megemelkedett a mikotoxintermelő fonalagombák előfordulásának gyakorisága a mezőgazdaságban (Magan és mtsai., 2011). Mindezekon felül a fonalagombák kulturális örökségeink legfőbb kártevőiként léphetnek fel a múzeumokban, raktárakban és könyvtárakban. Károsíthatják a faszobrokat, festményeket, pergameneket (Sterflinger és Pinzari, 2012). A velük szembeni védekezés komoly kihívást jelent, mert a jelenleg használt fungicid fertőtlenítőszeresek ártalmasak lehetnek az emberekre nézve és kárt tehetnek a kezelni kívánt műtárgyakban (Sterflinger és Pinzari, 2012). Mindezek alapján napjainkban megnőtt az igény új, széles spektrumú, biztonságosan alkalmazható antifungális szerek kifejlesztése iránt (Hancock és Sahl, 2006).

A fonalagombák által termelt antifungális proteinek kedvező tulajdonságaik alapján (széles antifungális spektrum, stabilitás extrém környezeti körülmények között, korlátozott toxicitás emlős- és növénysejtekkel szemben) megfelelhetnek az új kihívásoknak. Pontos

hatásmechanizmusuk és szerkezetük megismerése után növényvédő- és tartósítószer, valamint gyógyszerek alapanyagául szolgálhatnak.

A *Neosartorya fischeri* NRRL 181 jelű törzs fermentlevéből egy antifungális protein (*N. fischeri* NRRL 181 antifungális protein, NFAP) izolálható, ami hatékonyan gátolja egyes Ascomycota fonalagombák növekedését (Kovács és mtsai., 2011). A *N. fischeri* NRRL 181 a termelődést fokozó stresszkörülmények alkalmazása ellenére is csak kis mennyiségben választja ki az NFAP-t, ezért annak ipari mennyiségben történő előállítás nem megoldott (Kovács és mtsai., 2011; Galgóczy és mtsai., 2013a). Munkánk során az NFAP nagy mennyiségben történő termeltetése érdekében létrehoztunk egy *Pichia pastoris*-alapú heterológ expressziós rendszert, összehasonlítottuk a *N. fischeri* által termelt NFAP és a *P. pastoris* eredetű heterológ NFAP (hNFAP) antifungális spektrumát, továbbá vizsgáltuk ennek a fehérjének a hatásmechanizmusát, valamint szerkezetét.

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1. A tömlősgombák defenzinszerű fehérjéi

Az 1990-es évek második felétől számos antifungális hatással rendelkező fehérjét izoláltak a tömlősgombák törzsébe tartozó fonalgombákból (**1. Táblázat**), de közülük mindösszesen két fehérjét tanulmányoztak részletesen: az *Aspergillus giganteus* antifungális proteint (AFP) és a *Penicillium chrysogenum* antifungális proteint (PAF) (Marx, 2004; Meyer, 2008; Wnendt és mtsai., 1994; Marx és mtsai., 1995; Lee és mtsai., 1999; Geisen és mtsai., 2000; Skouri-Gargouri és mtsai., 2008; Hajji és mtsai., 2010; Rodriguez-Martin és mtsai., 2010; Binder és mtsai., 2011). Az antifungális proteinek közös jellemzői az alacsony molekulatömeg, a 6-8 cisztein és az általuk kialakított 3-4 diszulfid-híd jelenléte, mely nagyfokú stabilitást biztosít a molekuláknak a protein degradációval szemben, szélsőséges pH-értékeken és magas hőmérsékleten (Marx, 2004; Meyer, 2008). További közös jellemzőjük a bennük található nagyszámú lizinnek és argininnek köszönhető pozitív töltés (Marx, 2004). Annak ellenére, hogy a fehérjék aminosav-szekvenciái nagymértékben eltérhetnek egymástól (10,9%-94,1% aminosav-szekvenciabeli hasonlóság), konzervált régiók minden esetben megfigyelhetők a ciszteinek, és az azok szomszédságában elhelyezkedő aminosavak pozíciójában.

Konzervált szekvenciamotívumaik alapján a tömlősgombák által termelt defenzinszerű fehérjék két nagy csoportját különíthetjük el: (1) olyan proteinek, melyekre a *Penicillium brevicompactum* „bubble protein” (BP) klaszter, és (2) olyan proteinek, melyekre a *P. chrysogenum* antifungális protein (PAF) klaszter a jellemző (Seibold és mtsai., 2011). A BP-klaszterrel rendelkező fehérjék élesztő- és fonalgombák növekedését gátolják, míg a PAF-klaszterrel rendelkező fehérjék elsősorban fonalgombákkal szemben bizonyultak aktívnak (Lacadena és mtsai., 1995; Lee és mtsai., 1999; Geisen, 2000; Meyer, 2008; Meyer és Stahl, 2003; Moreno és mtsai., 2003, 2006; Marx, 2004; Galgóczy és mtsai., 2005, 2007, 2008; Barna és mtsai., 2008; Meyer, 2008; Hajji és mtsai., 2010; Seibold és mtsai., 2011; Chen és mtsai., 2013).

A tömlősgombák defenzinszerű fehérjéi a prokarióták antimikrobiális fehérjéihez hasonlóan szelekciós előnyt biztosítanak a termelő szervezet számára az azonos ökológiai *niche*-t elfoglaló kompetitor mikrobákkal szemben. Ezt alátámasztja az a megfigyelés, hogy a tömlősgombák defenzinszerű fehérjéit kódoló gének transzkripciója fokozódhat egy-egy kompetitor mikroorganizmus jelenlétében (Meyer és Stahl, 2003; Marx, 2004). Az utóbbi

időben egyre több publikáció jelent meg az antimikrobiális proteinek antimikrobiális aktivitásán túli egyéb funkcióiról is. A PAF-ról feltételezik, hogy stresszkörülmények között szerepet játszik a termelő szervezet aszexuális differenciálódásában és a konídiumképzésben (Hegedűs és Marx, 2013).

A tömlősgombák által termelt defenzinszerű fehérjék gyakorlatban való alkalmazhatóságát már több kísérlettel is igazolták. Az AFP *in vitro* kísérletekben hatékonyan gátolta számos potenciálisan humán- (*Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*) és növénypatogén fonalagomba (*Fusarium oxysporum*, *Fusarium moniliforme*, *Magnaporthe grisea*, *Erysiphe graminis*, *Phytophthora infestans*) növekedését (Oldach és mtsai., 2001; Vila és mtsai., 2001; Theis és mtsai., 2003; Moreno és mtsai., 2006). Az AFP konstitutív termelésére képes transzgenikus rizs, búza, valamint gyöngyköles fertőzéses kísérleteivel bizonyították, hogy ezek a növények semmilyen morfológiai változást nem mutatnak a vad típushoz képest, fertilitásukat megőrzik és rezisztensek a vizsgált gombakártevőkkel szemben (Oldach és mtsai., 2001; Coca és mtsai., 2004; Moreno és mtsai., 2005; Girgi és mtsai., 2006). A PgAFP számos húsipari terméken előforduló, mikotoxintermelő fonalagomba növekedését gátolta (Rodríguez-Martín és mtsai., 2010) és rezisztensnek bizonyult proteolitikus enzimekkel szemben, valamint fermentált nyers kolbászon is képes volt gátolni a nemkívánatos fonalagombák növekedését, így élelmiszer-tartósítószerként potenciális hatóanyagául szolgálhat (Delgado és mtsai., 2015).

Antifungálisan hatékony koncentráció-tartományban sem az AFP, sem a PAF nem idéz elő citotoxikus és egyéb károsító hatást emlőssejteken *in vitro*, továbbá nem indukálja gyulladáshoz vezető citokinek termelődését (Szappanos és mtsai., 2005, 2006). A PAF *in vivo* sem váltott ki gyulladáshoz vezető folyamatot egér tüdőaszpergillózis modellben (Palicz és mtsai., 2013). A PAF-ról bebizonyították, hogy képes szinergisztikus kölcsönhatásba lépni sztatinokkal és flukonazollal (Galgóczy és mtsai., 2007; 2008).

Az eddigi vizsgálatok alapján a fonalagombák által termelt, defenzinszerű antifungális proteinek nagyfokú stabilitásuk, gazdaságos termeltethetőségük és korlátozott toxicitásuk révén, hatásmechanizmusuk és szerkeztük megismerése után, ígéretes jelöltnek bizonyulhatnak mezőgazdasági és gyógyászati célú felhasználás szempontjából.

1. Táblázat Fonalas tömlőgombákból eddig azonosított defenzinszerű antifungális proteinek és fizikai kémiai-tulajdonságaik.

Protein	Termelő törzs	Aminosavak száma	Molekula-tömeg (kDa)	Ciszteinek száma	Becsült pI	Lizinek/argininek száma	Azonosító	Referencia
PAF klasztert hordozó fehérjék								
AcAMP	<i>Aspergillus clavatus</i> VR1	51	5,8	8	9,06	11/1	ABR 10398	Skouri-Gargouri és mtsai., 2008
AcAFP	<i>Aspergillus clavatus</i> ES1	51	5,8	8	9,06	11/1	ADC55278	Hajji és mtsai., 2010
AFP	<i>Aspergillus giganteus</i> MDH 18894	51	5,8	8	9,27	12/1	X60771	Wnendt és mtsai., 1994
AFP _{NN5353}	<i>Aspergillus giganteus</i> A3274	51	5,7	8	9,30	11/2	n.a.	Binder és mtsai., 2011
AnAFP	<i>Aspergillus niger</i> KCTC 2025	58	6,6	6	7,14	5/3	n.a.	Lee és mtsai., 1999
FPAP	<i>Fusarium polyphialidicum</i> SZMC 11042	55	6,4	6	9,10	12/1	CAR 79015	Galgóczy és mtsai., 2013
NAF	<i>Penicillium nalgiovense</i> BFE 66, 67, 474	55	6,3	6	8,93	13/0	n.a.	Geisen, 2000
NFAP	<i>Neosartorya fischeri</i> NRRL 181	57	6,6	6	8,93	11/2	CAQ42994	Kovács és mtsai., 2011
PAF	<i>Penicillium chrysogenum</i> Q176	55	6,3	6	8,93	13/0	AAA 92718	Marx és mtsai., 1995
PgAFP	<i>Penicillium chrysogenum</i> RP42C	58	6,5	6	8,83	8/2	ACX54052	Rodriguez-Martin és mtsai., 2010
BP klasztert hordozó fehérjék								
BP	<i>Penicillium brevicompactum</i> DierckX	64	6,5	8	7,20	4/4	P83799	Seibold és mtsai., 2011
Pc-Arctin	<i>Penicillium chrysogenum</i> A096	64	n.a.	8	n.a.	3/6	CAP96194	Chen és mtsai., 2013

AcAMP: *Aspergillus clavatus* VR1 antimikrobiális protein, AcAFP: *A. clavatus* ES1 antifungális protein, AFP: *Aspergillus giganteus* MDH 18894 antifungális protein, AFP_{NN5353}: *A. giganteus* A3274 antifungális protein, AnAFP: *Aspergillus niger* KCTC2025 antifungális protein, AnAFP2: *A. niger* CBS 513.88 antifungális protein, FPAP: *Fusarium polyphialidicum* SZMC 11042 antifungális protein, NAF: *Penicillium nalgiovense* BFE 66, 67, 474 antifungális protein, NFAP: *Neosartorya fischeri* NRRL 181 antifungális protein, PAF: *Penicillium chrysogenum* Q176 antifungális protein, PgAFP: *P. chrysogenum* RP42C antifungális protein, BP: *Penicillium brevicompactum* Dierck X bubble protein, Pc-Arctin: *P. chrysogenum* A096 antifungális protein. MDH: Michigan Department of Health, Michigan, USA; KCTC: Korean Collection for Type Cultures, Daejeon, Koreai Köztársaság; CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures Baarn, Utrecht, Hollandia; SZMC: Szeged Microbiological Collection, Szeged, Magyarország; NRRL: Northern Regional Research Laboratory Agricultural Research Service Culture Collection, Peoria, USA; n.a.: nincs adat

3.1.1 A tömlősgombák által termelt defenzinszerű fehérjék szerkezete, szerkezet és hatásmechanizmus közötti összefüggések

A tömlősgombák által termelt defenzinszerű fehérjék aminosavsorrendje egymással 10,9%-94,1% hasonlóságot mutat, kivéve a NAF és a PAF esetében, melyek egymással 100%-ban megegyeznek (Marx, 2004; Meyer, 2008; Geisen, 2000). Annak ellenére, hogy a fehérjék aminosav-szekvenciája nagymértékben különbözik, konzervált régiókat minden esetben találunk bennük. Ilyenek a ciszteinek és az azok szomszédságában elhelyezkedő aminosavak. Az eddig leírt, tömlősgombák által termelt defenzinszerű fehérjék aminosav-szekvenciáinak összehasonlítását az **1. Ábra** mutatja be.

A tömlősgombák által termelt defenzinszerű fehérjék preproproteinekként szintetizálódnak. Az éretlen fehérjék N-terminális végén egy szignálszekvencia található, amit egy proszekvencia követ, melyet feltehetőleg egy Kex2-szerű endoproteáz hasít le (Wnendt és mtsai., 1994; Martinez-Ruiz és mtsai., 1997). A PAF-ra érzékeny *Aspergillus nidulans*-ban termeltetett, a szignál- és a proszekvenciát nem hordozó, illetve a csak a proszekvenciát hordozó rekombináns PAF fehérjevaltozatok segítségével bebizonyították, hogy a szignálszekvencia elengedhetetlen a fehérje szekréciójához, valamint, hogy a proszekvencia „intramolekuláris chaperon”-ként működve megakadályozza a fehérje aktivitását a szekréció előtt, ezzel védve a termelő szervezetet a fehérje antifungális hatásától (Marx és mtsai., 2005).

A fonalas tömlősgombák által termelt defenzinszerű antifungális fehérjék harmadlagos szerkezete egymással nagymértékű hasonlóságot mutat (**2. Ábra**). Kísérletesen mindezidáig csak az AFP (PDB azonosító: 1AFP) (Campos-Olivas és mtsai., 1995), a PAF (PDB azonosító: 2KCN) (Batta és mtsai., 2009) és a BP (PDB azonosító: 1UOY) (Olsen és mtsai., 2004) szerkezetét határozták meg mágneses magrezonancia spektroszkópia (AFP és PAF esetében) és röntgenkristallográfia (BP esetében) segítségével. Mindhárom fehérje 5 β -redőjét három rövid hurokrégió köti össze, amelyek két, egymással szemben elhelyezkedő, egymással merőleges szöget bezáró β -lemezzé rendeződnek, és egy β -hordó stuktúrárt hoznak létre (Campos-Olivas és mtsai., 1995; Olsen és mtsai., 2004; Batta és mtsai., 2009). *In silico* szerkezetvizsgálatok alapján az AcAFP, az FPAP, a PgAFP és számos BP-homológ fehérje szintén β -hordó szerkezettel rendelkezik (Skouri-Gargouri és mtsai., 2009; Galgóczy és mtsai., 2013; Seibold és mtsai., 2011).

Az AFP és a PAF esetében leírták egy központi hidrofób mag jelenlétét. Az AFP hidrofób magját poláros és aromás aminosavak veszik körül. A felszíni elhelyezkedésük miatt ezek az aminosavak a fehérje nagymértékű oldhatóságát eredményezik különböző

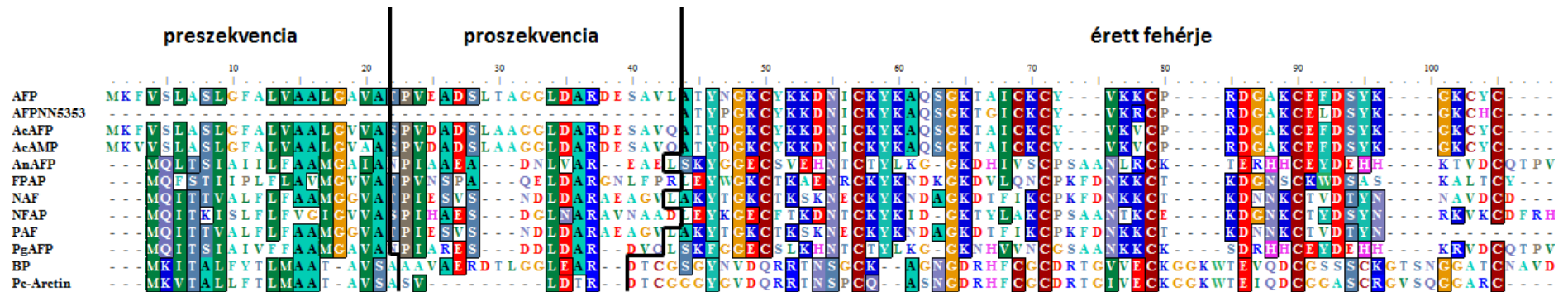
oldószerekben (Campos-Olivas és mtsai., 1995). Az érett AFP harmadlagos szerkezetét a 7., 14., 26., 28., 29., 33., 40. és az 51. pozícióban lévő ciszteinek által kialakított diszulfid-hidak stabilizálják, melyek az „*abcdabcd*” (cisztein párok: 7-33, 14-40, 26-49, 28-51) diszulfidhíd-mintázatot veszik föl. Az AFP amfipatikus struktúrával rendelkezik: a molekula felszínén egy pozitív töltésű domén található, amit a 9., 10., és a 32. pozícióban lévő lizinek alkotnak. A pozitívan töltött felszíni régió szomszédságában egy hidrofób árok helyezkedik el, amit a 29. és 45. pozícióban lévő tirozinok, valamint a 30. és 50. pozícióban található valinok alkotnak. Ez az „amifipatikus mintázat” nagymértékű hasonlóságot mutat a karcinotoxinok amfipatikus mintázatával, ahol a toxinra érzékeny sejtek membránjának foszfolipidjeivel való kölcsönhatásban van szerepe (Gilquin és mtsai., 1993; Campos-Olivas és mtsai., 1995). Az AFP N-terminális végén egy oligonukleotid-oligoszacharid kötő domént (OB domén) tartalmaz, mely képes megkötni az RNS-t, az egyszálú DNS-t, oligoszacharidokat és különböző fehérjéket. *In vitro* kísérletekben bebizonyították, hogy az AFP az OB-kötő doménjén keresztül a DNS-hez kötődve kromatinkondenzációt okoz (Martínez del Pozo és mtsai., 2002). Az AFP képes még a rá érzékeny gombák sejt falának kiépítésében szerepet játszó kitinhez is kapcsolódni az N-terminális végén megtalálható CKYKAQ (14.-19. aminosav) motívumán keresztül, ami nagyfokú hasonlóságot mutat a bakteriális kitin-kötő doménekkal (Hagen és mtsai., 2007). Az AFP kitin-kötő aktivitását *in vitro* kísérletekkel is igazolták (Liu és mtsai., 2002; Hagen és mtsai., 2007).

A PAF szintén 5 antiparallel lefutású β -redőből és az azokat összekapcsoló hurokrégiókból áll. Az 5 β -redő β -lemezt hoz létre és egy β -hordó struktúrát alakít ki. A szerkezetet a 7., 14., 28, 36., 43. és az 54. pozícióban lévő 6 cisztein által alkotott, „*abcabc*” (cisztein párok: 7-36, 14-43, 28-54) mintázatba rendeződő 3 diszulfid-híd stabilizálja (Batta és mtsai., 2009; Váradi és mtsai., 2013). A diszulfid-hidak elengedhetetlenül szükségesek az antifungális aktiv szerkezet kialakításához. Kísérletesen bizonyították, hogy a diszulfid-hidak ditiotreitollal történő redukciója után szignifikáns csökkenés következik be a PAF antifungális aktivitásában *A. niger*-rel szemben (Batta és mtsai., 2009). Az AFP-jéhez hasonló pozitív töltésű felszíni régió a PAF esetében is megfigyelhető, amit a 9., 35. és 38. pozícióban lévő lizinek alkotnak. Már egyetlen lizin alaninra történő cseréje szignifikánsan csökkentette a PAF aktivitását *A. niger*-rel szemben (Batta és mtsai., 2009). Ez alapján feltételezhető, hogy a felszíni pozitív töltésű régiónak fontos szerepe van az érzékeny sejtekkel való kölcsönhatásban mind az AFP, mind a PAF esetében (Campos-Olivas és mtsai., 1995; Batta és mtsai., 2009). Az AFP esetében megfigyelhető kitin-kötő domén PAF esetében hiányzik,

valamint bizonyították azt is, hogy a PAF nem képes kitinnel, valamint a rá érzékeny *A. nidulans* DNS-ével kölcsönhatásba lépni (Batta és mtsai., 2009).

A BP aminosav-szekvenciája nagymértékben eltér a PAF és az AFP aminosav-szekvenciájától, ennek ellenére röntgenkristallográfias vizsgálatokkal kimutatták, hogy azokhoz hasonló szerkezettel rendelkezik (Olsen és mtsai., 2004). A 64 aminosav hosszúságú molekula N-terminális végén egy 26 aminosavból álló hurokrégió található, amit egy 3 antiparallel állású β -redőből álló β -lemez követ. A C-terminális végen egy 2 β -redőből álló β -lemez található. A 2 β -lemez egy β -hordó-szerű struktúrát alakít ki (Olsen és mtsai., 2004). A molekula C-terminális végén található 2 β -lemez a molekula N-terminális végén található 26 aminosavból álló hurokrégióval együtt egy tölcserít képez, ami a molekulán megtalálható legnagyobb árok és amelyről feltételezik, hogy szerepe van a fehérje aktivitásában (Laskowski és mtsai., 1993; Olsen és mtsai., 2004). Leírták továbbá, hogy a BP néhány, a *Williopsis mrakii* killer toxinjához (WmKT) hasonló tulajdonsággal is rendelkezik (Antuch és mtsai., 1996; Olsen és mtsai., 2004). Hasonló a felszíni töltéeloszlásuk és a tölcserégiók mérete is. A tölcserít alkotó aminosavak a molekula egyik végén egy pozitív töltésű régiót, a molekulák tölcserrel szemközti végén pedig egy kisméretű, negatívan töltött régiót alakítanak ki (Olsen és mtsai., 2004).

Az *in silico* módszerrel prediktált szerkezettel rendelkező fehérjék közül a szakirodalom az AcAFP-ről számol be részletesebben. A többi tömlősgomba által termelt antifungális fehérjéhez hasonlóan az AcAFP is β -hordó struktúrát vesz fel. Szerkezetét vélhetően 4 diszulfid-híd stabilizálja. Az AFP-hez hasonlóan az AcAFP is amfipatikus molekula, ami a hidrofób (Y29, V30, Y45, Y50) és a kationos doménjének köszönhető (K9, K10). A két doménhez hasonló régiók az AFP esetében is megfigyelhetők, azonban az AFP 32. pozíciójában található, pozitív töltésű lizin helyett az AcAFP esetében egy valin helyezkedik el, ami miatt az AcAFP felszíni régiója kevésbé pozitív, mint az AFP hasonló régiója (Skouri-Gargouri és mtsai., 2009), mely magyarázatul szolgálhat a két fehérje eltérő fajspecifitására (**2. Táblázat**).



1. Ábra Az eddig izolált, tömlősgombák által termelt defenzinszerű fehérjék aminosav-szekvenciáinak illesztése. AFP: *Aspergillus giganteus* MDH 18894 antifungális protein (azonosító: X60771), AFP_{NN5353}: *A. giganteus* A3274 antifungális protein, AcAFP: *Aspergillus clavatus* VR1 antifungális ptein (azonosító: ABR1039), AcAMP: *A. clavatus* ES1 antimikrobiális protein (azonosító: ABR 10398), AnAFP: *A. niger* KCTC 2025 antifungális protein, FPAP: *Fusarium polyphialidicum* SZMC 11042 antifungális protein (azonosító: CAR 79015), NAF: *Penicillium nalgiovense* BFE 66, 67, 474 antifungális protein, NFAP: *Neosartorya fischeri* NRRL 181 antifungális protein (azonosító: CAQ42994), PAF: *Penicillium chrysogenum* Q 176 antifungális protein (azonosító AAA 92718), PgAFP: *P. chrysogenum* RP42C antifungális protein (azonosító: ACX54052), BP: *Penicillium brevicompactum* DierckX bubble protein (azonosító: P83799), Pc-Areitin: *P. chrysogenum* A096 antifungális protein (azonosító: CAP96194).

csökkenti a fehérje aktivitását (Theis és mtsai., 2003). A PAF esetében is leírták a kationok antifungális aktivitást csökkentő hatását: a fehérje aktivitását a 20 mM-nál nagyobb $MgCl_2$ koncentráció, vagy a magas Na_2SO_4 koncentráció szignifikánsan lecsökkentette (Marx, 2004). Az AcAFP antifungális aktivitásának csökkenését szintén megfigyelték egy- (50 mM NaCl) és kétértékű (Mn^{2+} , Fe^{2+} és Ca^{2+}) kationok jelenlétében is (Skouri-Gargouri és mtsai., 2009). Hasonló hatást írtak le NFAP esetében is (Galgóczy és mtsai., 2013). Ezek alapján feltételezhető, hogy az egy- és kétértékű kationok koncentráció-függő módon képesek gátolni vagy csökkenteni a tömlősgombák által termelt defenzinszerű fehérjék aktivitását. Növényi eredetű antimikrobiális proteinek esetében a kationok fehérjékkel szembeni neutralizáló hatását azzal magyarázzák, hogy megakadályozzák a pozitív töltésű fehérjék kötődését a fehérjére érzékeny célorganizmus membránjához, leszorítva őket a kötőhelyükről (Thevissen és mtsai., 2003). Hasonló mechanizmus feltételezhető a tömlősgombák által termelt defenzinszerű fehérjék esetében is (Marx, 2004).

A tömlősgombák által termelt defenzinszerű fehérjék antifungális spektruma eltér egymástól, a rájuk érzékeny fajok között csak kismértékű átfedés figyelhető meg. Hatásukat elsősorban más fonalgombákkal szemben fejtik ki (Marx, 2004, Meyer, 2008). Hatékonyan gátolják számos egészségügyi és mezőgazdasági szempontból fontos patogén fonalgomba növekedését. (Lacadena és mtsai., 1995; Lee és mtsai., 1999; Geisen, 2000; Meyer és Stahl, 2003; Moreno és mtsai., 2003, 2006; Marx, 2004; Galgóczy és mtsai., 2005, 2007, 2008; Barna és mtsai., 2008; Meyer, 2008). Az AnAFP, AFP, PAF, a PgAFP és az NFAP tömlős- és járomspórás gombafajok növekedését gátolják (MIC=1-200 $\mu g/ml$) (Lacadena és mtsai., 1995; Lee és mtsai., 1999; Kaiserer és mtsai., 2003; Moreno és mtsai., 2003, 2006; Theis és mtsai., 2003; Marx, 2004; Galgóczy és mtsai., 2005, 2007, 2008; Barna és mtsai., 2008; Meyer, 2008; Rodríguez-Martín és mtsai., 2010; Delgado és mtsai., 2015). Élesztőkkel szembeni antifungális aktivitással az AnAFP (*Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* és *Trichosporon beigelii*; MIC=8-15 μM), a BP (*S. cerevisiae*, Seibold és mtsai., 2011) és az FPAP rendelkezik (*Candida inconspicua*, *Candida lipolytica*, *Candida lusitanae*, *Candida norvegica*; MIC=150 $\mu g/ml$) (Lee és mtsai., 1999; Galgóczy és mtsai., 2013). Bazidiumos gombák tömlősgombák által termelt defenzinszerű fehérjékkel szembeni érzékenységéről mindezidáig kevés információ áll rendelkezésünkre: a *Rhodotorula mucilaginosa* az AFP-vel szemben rezisztensnek, míg a *T. beigelii* és a *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* az AnAFP-vel és PAF-fal szemben érzékenynek bizonyult (Lacadena és mtsai., 1995; Lee és mtsai., 1999; Barna és mtsai., 2008). Antibakteriális aktivitást csak az AcAMP mutat *Staphylococcus*

aureus, *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* és *Escherichia coli* ellen (MIC: 10-50 µg/ml) (Hajji és mtsai., 2010). A Pc-Arctin fonalagombákkal (*Paecilomyces variotii*, *Alternaria longipes*, *Trichoderma viride*) szemben bizonyult aktívnek. Az eddig vizsgált érzékeny mikroorganizmusok listája a **2. Táblázat**-ban található.

2. Táblázat Az eddig izolált, tömlőgombák által termelt defenzinszerű fehérjék antimikrobiális spektruma (Kovács, 2014 alapján).

Antifungális fehérje	Érzékeny mikroorganizmus	Referencia
PAF-klaszter		
AcAFP	<u>Ascomycota</u> : <i>Alternaria solani</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Fusarium</i> spp. (<i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Fusarium solani</i>), <i>Stachybotrys microspora</i> , <i>Trichoderma reesei</i>	Skoura Gargouri és Gargouri, 2008
AcAMP	<u>Ascomycota</u> : <i>A.niger</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>F. solani</i> <u>Gram+ baktériumok</u> : <i>Bacillus cereus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Hajji és mtsai., 2010
AnAFP	<u>Ascomycota</u> : <i>Aspergillus</i> spp. (<i>A. flavus</i> , <i>A. fumigatus</i>), <i>Candida albicans</i> , <i>Fusarium</i> spp. (<i>F. oxysporum</i> , <i>F. solani</i>), <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <u>Basidiomycota</u> : <i>Trichosporon beigeli</i>	Lee és mtsai., 1999
AFP	<u>Ascomycota</u> : <i>Alternaria alternata</i> , <i>Aspergillus</i> spp. (<i>A. flavus</i> , <i>A. nidulans</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. terreus</i> , <i>A. welwitschiae</i>), <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Erysiphe graminis</i> , <i>Fusarium</i> spp. (<i>F. aqueductum</i> , <i>F. bubigenum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. equiseti</i> , <i>F. lactis</i> , <i>F. lini</i> , <i>F. moniliforme</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>F. poae</i> , <i>F. proliferatum</i> , <i>F. sambucinum</i> , <i>F. solani</i> , <i>F. sporotrichioides</i> , <i>F. vasinfectum</i>), <i>Gliocladium roseum</i> , <i>Magnaporthe grisea</i> , <i>Penicillium purpurogenum</i> , <i>Trichoderma</i> spp. (<i>T. harzianum</i> , <i>T. koningii</i>) <u>Oomycota</u> : <i>Phytophthora infestans</i>	Lacadena és mtsai., 1995; Moreno és mtsai., 2003, 2006; Theis és mtsai., 2003; Meyer, 2008
AFP_{NN5353}	<u>Ascomycota</u> : <i>Aspergillus</i> spp. (<i>A. flavus</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>A. giganteus</i> , <i>A. nidulans</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. terreus</i>), <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Fusarium</i> spp. (<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>oxysporum</i> , <i>F. sambucinum</i>), <i>Gliocladium roseum</i> , <i>Neurospora crassa</i> , <i>P. chrysogenum</i> , <i>T. koningii</i>	Binder és mtsai., 2011
FPAP	<u>Ascomycota</u> : <i>Aspergillus</i> spp. (<i>A. nidulans</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. terreus</i>), <i>Candida</i> spp. (<i>C. inconspicua</i> , <i>C. lusitaniae</i> , <i>C. norvegica</i>), <i>Cladosporium herbarum</i> , <i>T. harzianum</i> <u>Zygomycota</u> : <i>Gilbertella persicaria</i>	Galgóczy és mtsai., 2013
NFAP	<u>Ascomycota</u> : <i>Aspergillus</i> spp. (<i>A. nidulans</i> , <i>A. niger</i>) <u>Zygomycota</u> : <i>Rhizomucor miehei</i>	Kovács és mtsai., 2011,
PgAFP	<u>Ascomycota</u> : <i>Aspergillus</i> spp. (<i>A. carbonarius</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. ochraceus</i> , <i>A. ochraceoroseus</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>A. oryzae</i> , <i>A. tamarii</i> , <i>A. tubingensis</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>A. welwitschiae</i> , <i>A. westerdijkiae</i>), <i>Penicillium</i> spp. (<i>P. chrysogenum</i> , <i>P. commune</i> , <i>P. echinulatum</i> , <i>P. nalgiovense</i> , <i>P. nordicum</i> , <i>P. restrictum</i> , <i>P. solitum</i>)	Rodríguez-Martin és mtsai., 2010; Delgado és mtsai., 2015.
PAF	<u>Ascomycota</u> : <i>Aspergillus</i> spp. (<i>A. flavus</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>A. giganteus</i> , <i>A. nidulans</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. terreus</i>), <i>Blumeria graminis</i> f. sp. <i>hordei</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Cladosporium herbarum</i> , <i>Cochliobolus carbonum</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>Gliocladium roseum</i> , <i>Hypocrea orientalis</i> , <i>N. crassa</i> , <i>Microsporium canis</i> , <i>M. gypseum</i> , <i>Trichoderma</i> spp. (<i>T. atroviride</i> , <i>T. harzianum</i> , <i>T. inhamatum</i> , <i>T. koningii</i> , <i>T. longibrachiatum</i> , <i>Trichophyton</i> spp. (<i>T. mentagrophytes</i> , <i>T. rubrum</i> , <i>T. tonsurans</i>) <u>Basidiomycota</u> : <i>Puccinia recondita</i> f. sp. <i>tritici</i> <u>Zygomycota</u> : <i>Absidia corymbifera</i> , <i>Micromucor ramanniana</i> , <i>Mortierella</i> spp. (<i>M. elongata</i> , <i>M. natalensis</i> , <i>M. wolfii</i>), <i>Mucor piriformis</i> , <i>Mycotypha africana</i> , <i>Rhizomucor miehei</i> , <i>Rh. pusillus</i> , <i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>oligosporus</i> , <i>R. oryzae</i> , <i>Thamnostylum piriforme</i> , <i>Umbelopsis isabellina</i> , <i>Zygorrhynchus macrocarpus</i>	Kaiserer és mtsai., 2003; Marx, 2004; Galgóczy és mtsai., 2005, 2007, 2008; Barna és mtsai., 2008
BP-klaszter		
BP	<u>Ascomycota</u> : <i>S. cerevisiae</i>	Seibold és mtsai., 2011
Pc-Arctin	<u>Ascomycota</u> : <i>Paecilomyces variotii</i> , <i>Alternaria longipes</i> , <i>Trichoderma viride</i>	Chen és mtsai., 2013

PAF: *Penicillium chrysogenum* Q 176 antifungális protein (azonosító AAA 92718), AFP: *Aspergillus giganteus* MDH 18894 antifungális protein (azonosító: X60771), AFP_{NN5353}: *A. giganteus* A3274 antifungális protein, AcAFP: *Aspergillus clavatus* VR1 (azonosító: ABR1039), AcAMP: *A. clavatus* ES1 antimikrobiális protein (azonosító: ABR 10398), AnAFP: *Aspergillus niger* KCTC 2025 antifungális protein, FPAP: *Fusarium polyphialidicum* SZMC 11042 antifungális protein (azonosító: CAR 79015), NAF: *Penicillium nalgiovense* BFE 66, 67, 474 antifungális protein, NFAP: *Neosartorya fischeri* NRRL 181 antifungális protein (azonosító: CAQ42994), PgAFP: *P. chrysogenum* RP42C antifungális protein (azonosító: ACX54052), BP: *Penicillium brevicompactum* DierckX bubble protein (azonosító: P83799), Pc-Arctin: *Penicillium chrysogenum* A096 antifungális protein (azonosító: CAP96194).

3.1.3 Antifungális hatásmód

A tömlősgombák által termelt defenzinszerű fehérjék aminosavasorrendbeli különbségeik ellenére hasonló harmadlagos fehérjeszerkezettel, valamint fizikai-kémiai tulajdonságokkal rendelkeznek, és az általuk kiváltott antifungális hatások is nagyon hasonlóak. Mindezen hasonlóságok ellenére a hatásmechanizmusuk eltérő lehet. A két legintenzívebben tanulmányozott fehérje a PAF és az AFP, melyek antifungális hatása - habár néhány közös jellemzővel rendelkezik - eltérő módon valósul meg. Mindkét fehérje - közvetlen, vagy közvetett módon - az érzékeny hifák polarizált növekedését zavarja, és felborítja a sejtek Ca^{2+} -homeosztázisát, ami programozott sejthalálhoz vezethet (Theis és mtsai., 2003; Meyer, 2008; Binder és mtsai., 2010a).

Az AFP hatása több szinten érvényesül. Magas koncentrációban alkalmazva (300 $\mu\text{g/ml}$) a fehérje kisebb hányada feltételezhetően a pozitív töltésű, lizin-gazdag fészini régiója révén képes az érzékeny sejtek sejtmembránjának negatívan töltött foszfolipidjeihez kötődni, megszüntetni a membrán integritását és permeabilizálni azt (Campos-Olivas és mtsai., 1995; Theis és mtsai., 2003; Hagen és mtsai., 2007). *Magnaporthe grisea* sejtekben a membrán permeabilizációját követően az AFP a magban lokalizálódik. *In vitro* kísérletekben bebizonyították továbbá, hogy az AFP képes a *M. grisea* DNS-ével kölcsönhatásba lépni. Ezek alapján feltételezhető, hogy az AFP antifungális hatásához hozzájárul az a tulajdonsága is, hogy oligonukleotid/oligoszacharid-kötő doménjén keresztül képes kölcsönhatásba lépni a nukleinsavakkal (Martinez del Pozo és mtsai., 2002).

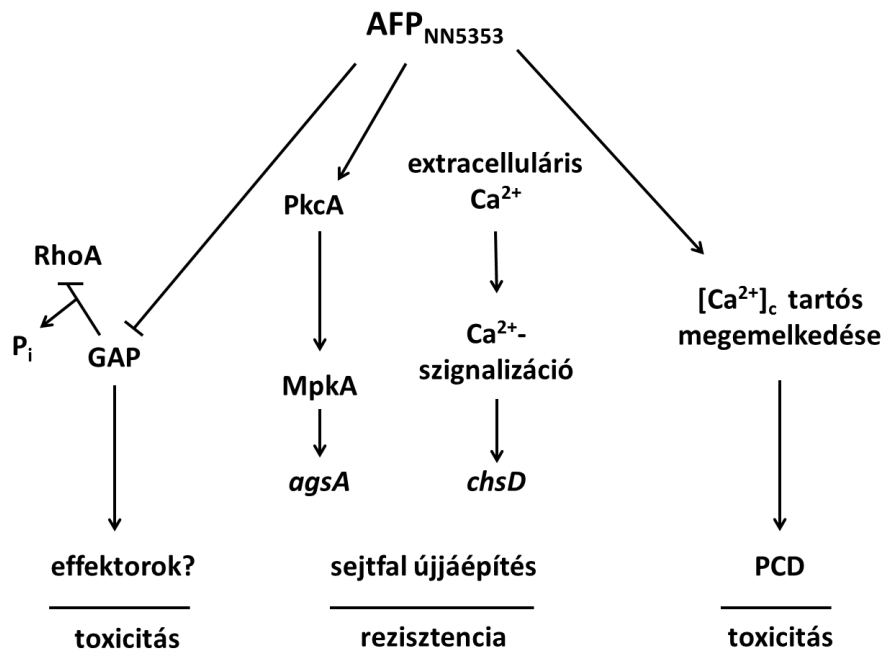
Az AFP nagyobb hányada a sejtfa glikoproteinekből álló külső rétegében, valamint a sejtfaiban halmozódik fel és megzavarja a sejtfa helyes kiépülését (Theis és mtsai., 2005). *In vitro* kísérletekkel bizonyították, hogy *Fusarium oxysporum*-ban és *Aspergillus oryzae*-ben az AFP az N-terminális kitin-kötő motívumán keresztül képes kapcsolódni a kitinhez. Az AFP a kizárólag fonalassgombákban megtalálható III-as és V-ös típusú kitin-szintázok specifikus gátlása révén akadályozza a sejtfa helyes kiépülését (Hagen és mtsai., 2007). Ezt igazolja, hogy a *F. oxysporum* ΔchsV (*chsV* - a *F. oxysporum* V-ös típusú kitin-szintázát kódoló gén), *A. oryzae* ΔchsB (*chsB* - az *A. oryzae* III-as típusú kitin-szintázát kódoló gén) és *A. nidulans* ΔcsmA (*csmA* - az *A. nidulans* V-ös típusú kitin-szintázát kódoló gén) deléciós mutánsok csökkent érzékenységet mutáltak AFP-vel szemben, valamint, hogy *in situ* kísérletekben a *F. oxysporum*, az *A. oryzae* és az *A. niger* kitin-szintáz aktivitása jelentősen lecsökkent AFP jelenlétében (Hagen és mtsai., 2007). Mivel a kitinszintézis számos folyamatot igényel, több lehetséges magyarázat is létezik az AFP kitinszintézist gátló aktivitására: (1) a sejtfa

kiépülésének helyére a kitin-szintázok specifikus vezikulumokban, ún. kitoszómákban transzportálódnak. A fehérje zavarhatja a kitoszómák sejtfalszintézis helyére történő transzportját, (2) megakadályozhatja a kitin-szintázok kiszabadulását a kitoszómákból, (3) megakadályozhatja a kitin-szintázok plazmamebránhoz történő lehorgonyzását, (4) gátolhatja a kitin-szintázok aktivitását, (5) zavarhatja a kitin mikrofibrillumok sejtfalba épülését, vagy azok kötődését a β -glukánokhoz (Meyer, 2008). Az AFP antifungális hatásának kialakításában fontos szerepe lehet még a kitinszintézisben szerepet játszó CHS7 chaperon-szerű fehérjének, a sejtfal kiépülésének pH-függő szabályozásában szerepet játszó PacC transzkripciós faktornak, valamint a sejtfal glukán bioszintézisben szerepet játszó GAS1 glukanozil-transzferáznak. Igazolták, hogy a $\Delta pacC$, a $\Delta chs7$ és a $\Delta gas1$ *F. oxysporum* törzsek AFP-vel szemben ellenállóbbak a szülői törzshöz képest (Martín-Urdiroz és mtsai., 2009). Az AFP *A. nidulans*-szal szembeni toxicitásában szerepet játszik a Rho GTP-áz szignalizációs út vonal is. A RhoA GTP-áz szignalizációs útvonalnak a hifák polarizált növekedésében és a sejtfal helyes kiépülésében van szerepe. A RhoA GTP-áz GTP-kötött állapotban aktív, GDP-kötött állapotban deaktiválódik. A $rhoA^{G14V}$ és a $rhoA^{E40I}$ domináns mutációt hordozó *A. nidulans* törzsekben a GTP nem tud hidrolizálódni, így a GTP-áz GTP-kötött, konstitutívan aktív állapotban van. A $rhoA^{E40I}$ allélt hordozó törzsből azonban a GTP-áz aktiváló protein (GAP) kötőhelyét is érinti a pontmutáció, így a GAP nem tud kötődni a RhoA-hoz, akadályozva ezzel a RhoA-GAP célpontjainak aktiválását (Guest és mtsai., 2004). Mivel a $rhoA^{E40I}$ allélt hordozó *A. nidulans* törzs rezisztensebbnek mutatkozott AFP_{NN5353}-mal szemben, mint a szülői törzse és a $rhoA^{G14V}$ allélt hordozó törzs, így feltételezhető, hogy az AFP_{NN5353} hatását a RhoA-GAP komplex valamely *downstream* célpontján fejt ki (Binder és mtsai., 2011).

A kitinszintézis hifacsúcsi gátlása következtében a sejtfal csúcsi integritása megszűnik, amire kompenzációs válaszként az érzékeny törzsekben RhoA-független módon, a PkcA/MpkA szignalizációs útvonalon keresztül indukálódik a sejtfalintegritás-útvonal (CWIP, *cell wall integrity pathway*), aminek következtében fokozódik az α -1,3-glukán-szintáz gén (*agsA*) expressziója, ami a sejtfal újraépítést indukálja (Theis és mtsai., 2005; Hagen és mtsai., 2007; Binder és mtsai., 2011).

Az AFP_{NN5353} *A. niger*-ben a citoszol nyugalmi Ca^{2+} -szintjének hirtelen és jelentős mértékű növekedését indukálja (Binder és mtsai., 2011). A Ca^{2+} -homeosztázis tartós megváltozása programozott sejthalálhoz (PCD - *programmed cell death*) vezethet (Leiter és mtsai., 2005). Ezen kívül igazolták, hogy az AFP_{NN5353} a Ca^{2+} -szignalizációs kaszkádon

keresztül a sejtfa bioszintézisét indukálja a ChsD kitin-szintáz expressziójának indukciójával (Binder és mtsai., 2011). Az AFP_{NN5353} hatásmechanizmusát *A. nidulans*-ban a 3. Ábra mutatja be.



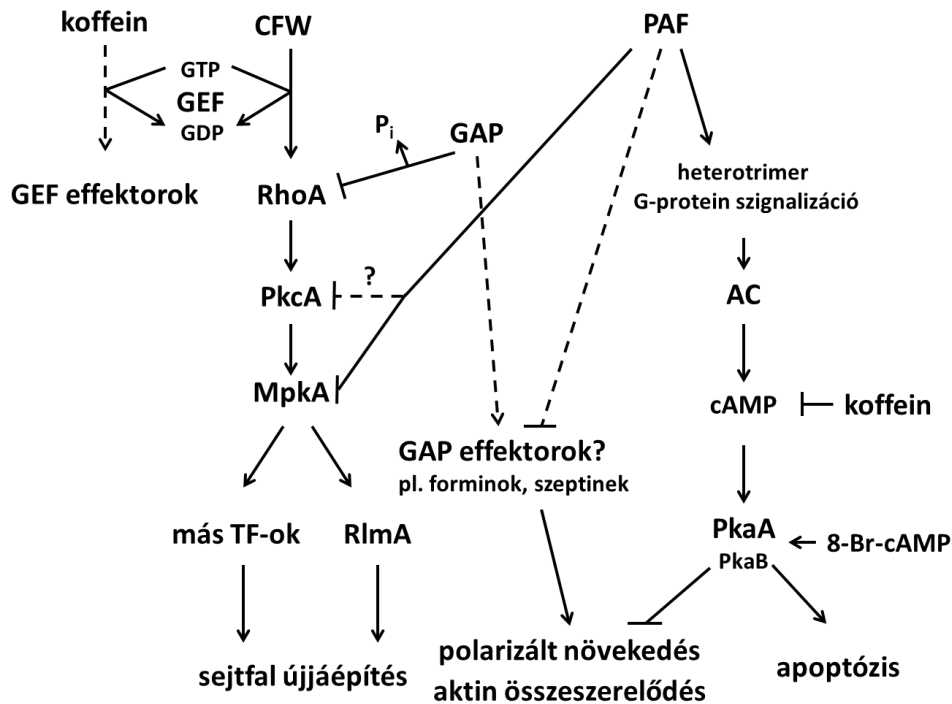
3. Ábra Az AFP_{NN5353} hatásmechanizmusának feltételezett modellje *Aspergillus* fajokban (Binder és mtsai., 2011). Az AFP_{NN5353}-mal szembeni sejtválaszt *A. nidulans*-ban a Pkc/Mpk útvonal szabályozza. Az AFP_{NN5353} hatására megemelkedik az *agsA* transzkripció szintje, ami a sejtfa újjáépítését indukálja. A fehérje hatására *A. niger*-ben megemelkedik az intracelluláris Ca²⁺ koncentrációja. A Ca²⁺-homeosztázis hirtelen és tartós változása programozott sejtthalálhoz vezethet. Ugyanakkor a célsejt Ca²⁺-szignalizációs kaszkádon keresztül fokozza a ChsD expresszióját, ami szintén a sejtfa újjáépítését indukálja. MpkA: mitogén-aktivált protein kináz A, PkaA: protein kináz A A, PkcA: protein kináz C A, RhoA: GTP-kötő fehérje, GAP: GTP-aktiváló protein, PCD: *programmed cell death* (programozott sejtthalál), *agsA*: α-1,3-glukán-szintáz, ChsD: kitin-szintáz

Az AFP-vel szemben rezisztens gombafajok esetében a fehérje intracellulárisan lokalizálódik, és normál degradatív folyamatok során lebomlik (Theis és mtsai., 2003, 2005).

A PAF szintén több szinten fejti ki antifungális hatását. Receptormediált endocitózissal jut a sejtekbe és intracellulárisan lokalizálódik (Oberparleiter és mtsai., 2003). A PAF-ra érzékeny sejtekben reaktív oxigénfajták (*reactive oxygen species*, ROS) felhalmozódását és apoptotikus markerek megjelenését igazolták (Kaiserer és mtsai., 2003; Leiter és mtsai., 2005). Ezen kívül a PAF megváltoztatja a rá érzékeny sejtek hifavégeiben az

aktin és kitin elrendeződését is (Binder és mtsai., 2010b). A PAF antifungális hatását részben a FadA-SfaD-GpgA (α -, β - és γ -alegységek)-függő heterotrimer G-protein kapcsolt jelátviteli úton keresztül fejt ki (Leiter és mtsai., 2005). Az útvonalnak a vegetatív növekedés szabályozásában és a glutation/glutation-diszulfid redox egyensúly fenntartásában van szerepe (Adams és mtsai., 1998). Az *A. nidulans* *fadA*^{G203R} mutánsban a heterotrimer G-protein FadA alegységének 203. pozíciójában található glicin argininra történő cseréje miatt az α -alegység nem tud disszociálni a $\beta\gamma$ -alegységről, aminek következtében a szignalizációs útvonal blokkolt állapotban van. Az *A. nidulans* *fadA*^{G203R} mutáns PAF-fal szemben rezisztensebbnek mutatkozott, mint a szülői törzs, ami alapján arra következtethetünk, hogy a PAF - legalábbis részben - a FadA-SfaD-GpgA heterotrimer G-protein-függő jelátviteli úton keresztül fejt ki hatását (Leiter és mtsai., 2005), feltehetőleg az intracelluláris glutation redox-egyensúly felborításával, amit gombákban az apoptózis egyik kiváltó tényezőjeként tartanak számon (Pócsi és mtsai., 2004). Az RgsA regulátor fehérje a GanB-SfaD-GpgA-függő heterotrimer G-protein szignalizációs úton keresztül képes gátolni az oxidatív stresszválaszt, ezáltal a ROS szintjének az emelkedését okozza, ami apoptózist indukál (Han és mtsai., 2004; Molnár és mtsai., 2006). Az RgsA-nak a PAF toxicitásában betöltött szerepét igazolja az, hogy az *rgsA* deléciója PAF-toleráns fenotípust eredményez *A. nidulans*-ban (Hegedűs és mtsai., 2011). Ezek alapján feltételezhető, hogy a PAF toxicitásában mind a FadA-SfaD-GpgA, mind pedig a GanB(RgsA)-SfaD-GpgA heterotrimer G-protein-függő szignalizációs útvonalak szerepet játszanak (Hegedűs és mtsai., 2011). A PAF *A. nidulans*-ban indukálja továbbá a heterotrimer G-protein kapcsolt jelátviteli útvonal által aktivált ciklikus adenzin-monofoszfát/protein kináz A (cAMP/PkaA) szignalizációs kaszkádot, ami az aktin abnormális polimerizációját, a polarizált növekedés zavarát és apoptózist eredményez (Binder és mtsai., 2010b). A PAF az AFP-hez hasonlóan *Neurospora crassa*-ban és *A. niger*-ben a citoszol nyugalmi Ca²⁺-szintjének gyors emelkedését okozza és megzavarja a Ca²⁺-szignalizációt (Leiter és mtsai., 2005; Binder és mtsai., 2010a, 2015). A citoszol nyugalmi Ca²⁺-szintjének gyors megváltozása oxidatív stresszt, majd apoptózist indukál (Marx és mtsai., 2008). *A. niger*-ben bebizonyították, hogy a cAMP/PkaA szignalizációs útvonal PAF általi aktivációja szoros kapcsolatban áll a citoszol nyugalmi Ca²⁺-szintjének megemelkedésével (Binder és mtsai., 2015). A PAF az AFP-vel ellentétben nem aktiválja a CWIP-t. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a hasonló szerkezeti, fizikai-kémiai tulajdonságaik, valamint hasonló antifungális hatásuk ellenére a fonalagombák által termelt antifungális fehérjék

hatásmechanizmusa eltér egymástól. A PAF hatásmechanizmusát *A. nidulans*-ban a **4. Ábra** foglalja össze.



4. Ábra A PAF hatásmechanizmusának feltételezett modellje *Aspergillus nidulans*-ban (Binder és mtsai., 2010b). A PAF heterotrimer G-protein-kapcsolt jelátviteli úton keresztül aktiválja a cAMP/PkaA szignalizációs kaszkádot, ami apoptózishoz, sérült aktin-összerendeződéshez és defektív polarizált növekedéshez vezet. Az aktin-összerendeződést eddig ismeretlen Rho-GAP által aktivált faktorok is befolyásolhatják. A PAF nem aktiválja az MpkA-t és valószínűleg a PkcA-t sem, akadályozva ezzel az *A. nidulans* sejtfalstresszorokkal szembeni rezisztencia-mechanizmusait. Ezzel ellentétben a CFW és a kofein RhoA-függő és független módon indukálják a sejtfal újjáépítést (Kuranda és mtsai., 2006; Fujioka és mtsai., 2007). 8-Br-cAMP: 8-bromoadenozin 3'5'-ciklikus monofoszfát, AC: adenilát-cikláz, cAMP: ciklikus adenozin-monofoszfát, CFW: *calcofluor white*, MpkA: mitogén-aktivált protein kináz A, PkaA: protein kináz A A, PkcA: protein kináz C A, RhoA: GTP-kötő fehérje, TF: transzkripciós faktor, RlmA: az *A. nidulans* sejtfalintegritás-útvonalában szerepet játszó transzkripciós faktor.

3.2 A *N. fischeri* antifungális protein

A *N. fischeri* NRRL 181 jelű izolátuma egy defenzinszerű antifungális fehérjét, a *N. fischeri* antifungális proteint (NFAP) termel. A fehérjét kódoló *nfap* gén 409 bp hosszúságú, a

PAF-klaszterrel rendelkező fehérjékhez hasonlóan 2 intront tartalmaz a 128-190 és a 267-337 pozíciókban, és egy 94 aminosav hosszúságú prekursor proteint kódol (Kovács és mtsai., 2011; Seibold és mtsai., 2011). Az *nfap* gén promóter régiójában a szakirodalomban leírt NFAP-vel rokon fehérjékhez hasonlóan külső környezeti hatásokra és stresszhatásra termelődő transzkripciós faktorok találhatóak (Marx, 2004; Meyer, 2008; Kovács és mtsai., 2011).

Az NFAP szekréciója során egy érési folyamaton megy keresztül. Az N-terminális végéről lehasad egy 23 aminosav hosszúságú szignálszekvencia, majd egy további 14 aminosav hosszúságú proszekvencia. Az érett NFAP 57 aminosav hosszúságú (**2. Ábra**), aminosavsorrendje 39,6%-50% szekvenciabeli hasonlóságot mutat más, már leírt, PAF-klasztert hordozó, tömlősgombák által termelt defenzinszerű fehérjékkel, melyek szerkezetével az NFAP szerkezete a Swiss-Modell szerver (Arnold és mtsai., 2006) használatával előrejelzett harmadlagos szerkezeti képe alapján nagyfokú hasonlóságot mutat: 5 antiparallel lefutású β -redő két ortogonális β -lemezzé rendeződve β -hordó struktúrát alakít ki (Kovács és mtsai., 2011). Az NFAP hat ciszteint tartalmaz, melyek három diszulfid-híd kialakításában vesznek részt. A benne található lizineknek és arginineknek köszönhetően a molekula bázikus karakterű. *In silico* adatok alapján a molekula töltése +5 (pH=7,0). A fehérje becsült molekulatömege 6625,50 Da, izoelektromos pontja (pI) 8,93.

Az NFAP hatékonyan gátolja néhány orvosi szempontból is jelentős fonalaszgomba növekedését (**2. Táblázat**) (Kovács és mtsai., 2011), azonban sem élesztőkkel, sem baktériumokkal szemben nem bizonyult aktívnak a vizsgált koncentráció-tartományon belül. A vizsgált fonalaszgombák közül az *A. niger* bizonyult a legérzékenyebbnek NFAP-vel szemben (MIC₅₀=100 μ g/ml - MIC₅₀: 50%-os növekedésgátlást okozó koncentráció). Hatását dóziszfüggő módon fejti ki, alacsonyabb koncentrációban (100 μ g/ml) fungisztatikus hatású, magasabb koncentrációban (200 μ g/ml) hatása fungicid jellegűvé válik. Az NFAP által kiváltott antifungális hatás a PAF és az AFP esetében leírtakhoz hasonló: a rá érzékeny fajokban NFAP-kezelés hatására késleltetett konídiumcsírázást figyelhetünk meg, valamint rövid, többszörösen elágazó hifák, duzzadt hifavégek jelennek meg (Kovács és mtsai., 2011).

Az NFAP széles pH-tartományban aktív (pH=7,0-9,0). Hőkezeléssel szemben ellenálló, aktivitását 30 perces, 100 °C-os hőkezelés után is megtartotta. Ellenálló továbbá proteináz K-kezeléssel szemben is. Ez a nagyfokú stabilitás vélhetően a tömlősgombák által termelt defenzinszerű fehérjékre jellemző kompakt szerkezetnek és a molekulát stabilizáló diszulfid-hidaknak köszönhető (Kovács és mtsai., 2011).

Korábbi tanulmányok alapján az *A. nidulans* mérsékelten szenzitívnek bizonyult az NFAP-vel szemben (Kovács és mtsai., 2011; Galgóczy és mtsai., 2013), ezért az NFAP hatásmechanizmusának tanulmányozása érdekében létrehoztak egy *A. nidulans*-alapú heterológ expressziós rendszert, ami képes az NFAP-t (*A. nidulans* hNFAP) aktív formában megtermelni. Az *A. nidulans* hNFAP hatására a transzformáns konídiumokból fejlődött hifa fala deformált, gyűrött, csavarodott és buborékszerű kitüremkedések jelennek meg rajta. A gyűrött hifavégeknél sejtmagok halmozódnak fel. Sérül a sejtfal szerveződése is, benne a kitinfilamentumok sérült és szórt elrendeződését figyelték meg (Galgóczy és mtsai., 2013). Az NFAP nem rendelkezik az AFP esetében leírt kitin-kötő doménnel (Hagen és mtsai., 2007), így a kitinfilamentumok sérülését valószínűleg nem a kitin-szintázok specifikus gátlása okozza, hanem a sejtfal integritásának megszűnése. A heterológ NFAP-t termelő *A. nidulans* törzs csírázása során reaktív oxigénfajták halmozódnak fel, és benne apoptózis, illetve nekrozis indukálódik. Mindezek alapján kijelenthető, hogy az NFAP a PAF-hoz hasonlóan képes apoptózist indukálni az NFAP-t termelő, arra érzékeny *A. nidulans* sejtekben, és az AFP-hez hasonlóan képes a kitinfilamentumok sérülését is kiváltani (Marx, 2007; Meyer, 2008; Galgóczy és mtsai., 2013). A fent leírt folyamatok molekuláris háttere a mai napig nem tisztázott.

Az NFAP-t termelő, vad típusú *N. fischeri in vitro* antagonizmus-tesztekben hatékonyabban gátolta a vele hasonló ökológiai *niche*-t elfoglaló fonalgombák növekedését, mint a *Δnfap* deléciós törzs. Ezek alapján feltételezhető, hogy az NFAP-nek a kompetitor mikrobákkal szembeni, tápanyagokért folytatott küzdelemben van szerepe (Kovács, 2014), amit a PAF és az AFP esetében is igazoltak (Hegedűs és Marx., 2013).

3.3 A tömlősgombák által termelt defenzinszerű fehérjék heterológ expressziója

Az antimikrobiális proteinek (AMP) karakterizálásához, hatásmechanizmusuk és szerkezetük megismeréséhez, vagy a gyakorlatban történő alkalmazásukhoz elengedhetetlenül szükséges a nagy mennyiségben történő előállításuk. Az AMP-k, köztük a fonalas tömlősgombák által termelt defenzinszerű fehérjék természetes termelőivel elérhető fehérjekihozatal relatíve alacsony (Parachin és mtsai., 2012; López-Garcia és mtsai., 2010), így a fehérjék ilyen módon történő, nagy mennyiségben való előállítása és tisztítása idő- és költségigényes. Kémiai úton történő szintézisük szintén idő- és költségigényes, amit tovább nehezít az adott molekulákra jellemző diszulfid-híd mintázat kialakítása is (Parachin és mtsai., 2012). PAF esetében leírták, hogy a fehérje mérete és aminosavösszetétele jelentősen

megnehezíti kémiai úton történő szintézisét. A lépésenkénti szilárd fázisú szintézissel mindössze 1,5%-os fehérjekihozatalt értek el. Ezt a fehérje 2 fragmentben történő szintézisével és a fragmentek natív kémiai ligálásával sikerült növelni, de az átlagos fehérjekihozatal még így is 10% alatt maradt (Váradí és mtsai., 2013). Az AMP-k előállítása szempontjából a leghatékonyabb módszer a heterológ expressziós rendszerben való termeltetésük. Napjainkban az AMP-k előállítására leggyakrabban használt heterológ expressziós rendszer a *P. pastoris*-alapú heterológ expressziós rendszer (Parachin és mtsai., 2012; Cereghino és mtsai., 2002), ami számos előnyös tulajdonsággal rendelkezik. Magas fehérjekihozatalt tesz lehetővé (Macauley-Patrick és mtsai., 2005), az expresszió léptéknövelése könnyen kivitelezhető és használatához nincs szükség komplex táptalajra, ami jelentősen redukálja a termeltetés költségeit és megkönnyíti a fehérje tisztítását. A *P. pastoris* biztonságosan alkalmazható élesztő. Az amerikai Élelmiszer- és Gyógyszerfelügyeleti Hatóság (*Food And Drug Administration, FDA*) 2009-ben jegyezte be az első *P. pastoris*-alapú heterológ expressziós rendszerben termeltetett gyógyszerhatóanyagot (Parachin és mtsai., 2012).

A szakirodalom napjainkig három, tömlősgombák által termelt defenzinszerű fehérje heterológ expressziójáról számolt be. A PAF-ot és az AFP-t *P. pastoris*-alapú heterológ expressziós rendszerben (Batta és mtsai., 2009; López-Garcia és mtsai., 2010), míg az NFAP-t *A. nidulans*-alapú heterológ expressziós rendszerben termeltették meg (Galgóczy és mtsai., 2013).

A AFP-t pPICZ α A expressziós vektor használatával *P. pastoris* KM71 sejtekkel termeltették meg (López-Garcia és mtsai., 2010). A pPICZ α A vektoron található α -faktor szignálszekvencia biztosítja az extracelluláris szekréciót. A szignálszekvencia lehasítását a Kex2 és Ste13 endoproteázok végzik el. A Ste13 hasítása a termeltetni kívánt protein aminosav-szekvenciájától függően nem mindig pontos. A Ste13 endoproteáz pontatlan hasításának következtében az AFP heterológ expressziója során megjelent egy, az N-terminális végén plusz 4 aminosavat hordozó fehérje is, amit proAFP-nek neveztek el. A Ste13 hasítóhelyének eliminálása után a *P. pastoris* KM71 sikeresen megtermelte az érett AFP-t is. A fehérjekihozatal a heterológ proAFP esetében 40,0 mg/l, a heterológ AFP esetében pedig 2,5 mg/l. A heterológ AFP az eredeti termelő, *A. giganteus* által termelt AFP-vel azonos mértékben gátolta a *F. verticillioides* növekedését. A natív és heterológ AFP ultraibolya cirkuláris dikroizmus spektruma (UV-CD spektrum) is megegyezik, ami alapján

kijelenthető, hogy a *P. pastoris* kiválóan megfelel az AFP nagy mennyiségben történő megtermelésére (López-García és mtsai., 2010).

A PAF, valamint 4 mutáns változatának (PAF^{K9A}, PAF^{K35A}, PAF^{K38A}, PAF^{K9,35,38A}) heterológ expresszióját pPic9K expressziós vektor használatával, szintén *P. pastoris* KM71-ben végezték el. A létrehozott heterológ expressziós rendszer sikeresen, nagy mennyiségben, aktív formában termelte meg a PAF-ot (Batta és mtsai., 2009; Binder és mtsai., 2015).

Az NFAP heterológ expresszióját *A. nidulans* CS2902 törzsével végezték el, egy pAMA alapú expressziós vektor használatával (Galgóczy és mtsai., 2013). A szakirodalom nem számol be más tömlősgomba által termelt defenzinszerű antifungális protein fonalgombában történő heterológ expressziójáról. A fehérjekihozatal 1680 ± 223 $\mu\text{g/l}$ fermentlé volt, ami közel azonos a természetes termelő *N. fischeri* NRRL 181 törzssel elérhető fehérjekihozattal (1250 ± 123 $\mu\text{g/l}$) (Kovács és mtsai., 2011; Galgóczy és mtsai., 2013). A viszonylag alacsony fehérjekihozatal feltehetőleg az NFAP-t termelő *A. nidulans* sejtek önmérgező tulajdonságának köszönhető, valamint annak, hogy a használt vektor nem integrálódik az *A. nidulans* genomjába, így akár el is veszhet (Galgóczy és mtsai., 2013).

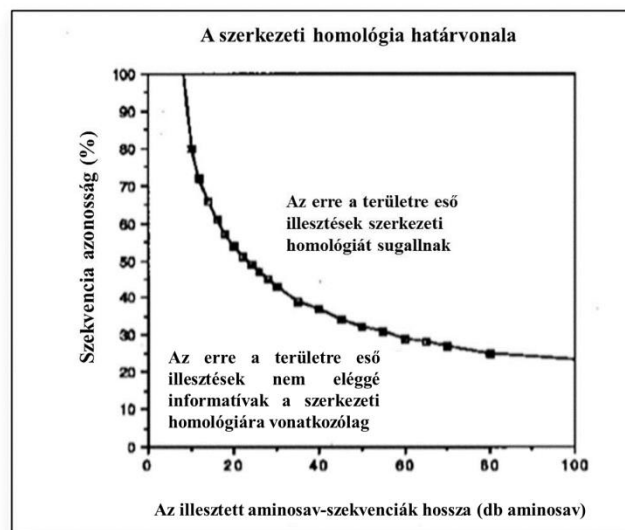
3.4 Az *in silico* modellezés elméleti és gyakorlati lehetőségei

A megismert gének és az általuk kódolt fehérjeszekvenciák száma sokkal gyorsabban növekszik, mint a kísérletes módszerekkel meghatározott fehérjeszerkezetek száma. Ez a folyamat különösen hangsúlyossá vált a genomszekvenálási projektek megjelenésével. A kísérletes térszerkezet-meghatározás technikai okok miatt nem tud lépést tartani a szekvenciaadatok felhalmozódásával, így megnőtt az igény a fehérjemolekulák szerkezetének *in silico* módszerekkel történő meghatározására (Krieger és mtsai., 2003).

Az *in silico* szerkezetbecslés lehetővé teszi azon fehérjék térszerkezetének vizsgálatát, melyek túl nagyok a mágneses magrezonancia spektroszkópiához (NMR), vagy nagyon nehezen kristályosíthatóak a röntgenkristallográfiás vizsgálatok érdekében (Krieger és mtsai., 2003). A két leggyakrabban alkalmazott stratégia a fehérjék térszerkezetének *in silico* előrejelzésére az *ab initio* módszer, illetve a templát-alapú, vagy homológia-modellezés.

A homológia-modellezés azon az elven alapul, hogy a fehérjék harmadlagos szerkezetét az elsődleges szerkezetük (aminosavsorrendjük) szabja meg (Epstein, 1964), valamint, hogy a fehérjék térszerkezete sokkal konzerváltabb, mint az aminosavsorrendjük, ezért a hasonló szekvenciák legtöbbször hasonló térszerkezetet vesznek fel (Chothia és Lesk, 1986). Az egyre növekvő számú, kísérletesen meghatározott fehérje térszerkezeti adataival

rendelkező *Protein Data Bank* (PDB)-nak (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) köszönhetően az *in silico* módszerekkel meghatározható szerkezet- és a szekvenciabeli hasonlóság közötti összefüggés mára jól leírható (**5. Ábra**) (Sander és Schneider, 1991). Egy bizonyos fokú szekvenciabeli hasonlóság felett a fehérjék térszerkezete jól modellezhető homológia-modellezéssel.



5. Ábra A szerkezeti homológia határvonala. A függvény feletti területre eső illesztések szerkezeti homológiát sugallnak, az ilyen fehérjék jó eséllyel azonos hajtogatódási sémával bírnak, ami lehetővé teszi a térszerkezetük homológia-modellezéssel történő meghatározását (Sander és Schneider, 1991).

A homológia-modellezés előfeltételei a modellezni kívánt fehérje (*target* fehérje) aminosav-szekvenciájának ismerete, illetve egy, vagy több rokon fehérje (templát- vagy referencia-fehérje) kísérletesen meghatározott, jó minőségű térszerkezeti adatai. A modellezés hét lépésből áll: (1) templát kiválasztása, (2) szekvenciaillesztés és annak optimalizálása, (3) fehérjeváz felépítése, (4) hurokrégiók modellezése, (5) oldallánc modellezése, (6) modell optimalizálása, (7) modell ellenőrzése (Krieger és mtsai., 2003). Az *in silico* szerkezetbecsléshez számos szoftver, illetve szerver áll a rendelkezésünkre. A ROBETTA (<http://robetta.bakerlab.org>) (Kim és mtsai., 2004), a SWISS-MODELL (<http://swissmodel.expasy.org>) (Schwede és mtsai., 2003) és a 3D-Jigsaw

(<http://bmm.cancerresearchuk.org/~3djigsaw>) a leggyakrabban használt automatizált szerkezetbecslő szerverek. A non-profit kutatási intézmények és egyetemek számára ingyenesen elérhető MODELLER (Eswar és mtsai., 2008) az egyik leggyakrabban használt szerkezetbecslő szoftver. Számos előnye mellett használatával lehetőségünk van többszörös illesztésekből származó adatok alapján elvégezni a vizsgálni kívánt fehérje térszerkezetének becslését, valamint lehetőségünk van a fehérje hurokrégióinak modellezésére is.

A szakirodalom számos tömlősgomba által termelt defenzinszerű antifungális fehérje *in silico* szerkezetmeghatározásáról számol be (FPAP: Galgóczy és mtsai., 2013; AcAFP: Skouri-Gargouri és mtsai., 2009; PgAFP: Rodríguez-Martin és mtsai., 2010; BP-homológok: Seibold és mtsai., 2011). Ezek a fehérjék a viszonylag nagyfokú szekvenciabeli hasonlóságuknak és a csoportba tartozó PAF és AFP fehérjék jó minőségű térszerkezeti adatainak (Campos-Olivas és mtsai., 1995, Batta és mtsai., 2009) köszönhetően jól modellezhetőek *in silico* módszerekkel.

4. CÉLKITŰZÉSEK

Az utóbbi néhány évtizedben a fonalagombák által okozott fertőzések egyre nagyobb kihívást jelentenek az orvostudomány, az élelmiszeripar és a mezőgazdaság számára. A rendelkezésünkre álló antifungális szerek gyakran nem elég hatékonyak, szűk spektrumúak és káros mellékhatásaik lehetnek a gazdaszervezetre. Szükség van új, biztonságosan alkalmazható, széles spektrumú antifungális szerek kifejlesztésére. Ennek a kihívásnak eleget tehetnek a tömlőgombák által termelt defenzinszerű antifungális proteinek.

A *Neosartorya fischeri* NRRL 181 jelű törzse által termelt *N. fischeri* antifungális protein (NFAP) hatékonyan gátolja néhány orvosi és mezőgazdasági szempontból fontos fonalagomba növekedését. Az NFAP gyakorlati alkalmazásához elengedhetetlenül szükséges a fehérje nagy mennyiségben történő előállítás, hatásmechanizmusának és szerkezetének megismerése, valamint a szerkezet és hatásmechanizmus közötti összefüggések feltárása. Mindezek alapján a következő konkrét célokat fogalmaztuk meg:

- 1. Az NFAP nagy mennyiségben történő előállítása *Pichia pastoris*-alapú heterológ expressziós rendszerben.** Az NFAP-t kódoló cDNS expressziós vektorba történő klónozása, a vektorkonstrukció *P. pastoris* KM71H törzsébe történő transzformációja, a heterológ NFAP (hNFAP) termelése és tisztítása.
- 2. Az NFAP/hNFAP szerkezetének vizsgálata.** Az NFAP/hNFAP térszerkezeti képének *in silico* becslése homológia-modellezéssel.
- 3. A *N. fischeri* által termelt NFAP és a *P. pastoris* által termelt hNFAP antifungális spektrumának összehasonlítása.** Az NFAP és a hNFAP antifungális aktivitásának vizsgálata *in vitro* mikrodilúciós tesztben klinikai szempontból jelentős fonalagombákkal szemben.
- 4. A hNFAP hatására létrejövő morfológiai változások és a protein lokalizációjának vizsgálata érzékeny gombafajban.** Rövid és hosszú távú NFAP-kezelés során *Aspergillus nidulans*-ban létrejövő morfológiai változások és a protein lokalizációjának vizsgálata specifikus festékek és fluoreszcens mikroszkóp használatával.
- 5. A hNFAP hatásmechanizmusának vizsgálata *A. nidulans* törzseken.** A hNFAP antifungális hatásának vizsgálata különböző jelátviteli utakban mutáns *A. nidulans* törzsekkel szemben, az érzékenységi adatok alapján egy lehetséges hatásmechanizmus leírása.

5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

5.1. Mikroorganizmusok

A dolgozatban felhasznált mikroorganizmusokról a **3. Táblázat** nyújt áttekintést.

3. Táblázat. A dolgozatban vizsgált mikroorganizmusok.

Fajnév	Az izolátum kódja/törzsgyűjteményi azonosító	Az izolálás adatai/egyéb adatok
Tömlőgombák		
<i>Aspergillus flavus</i>	SZMC 2521	humán keratitisz
<i>Aspergillus fumigatus</i>	SZMC 2394	humán keratitisz
<i>Aspergillus nidulans</i>	FGSCA4	genotípus: <i>Glasgow wild type</i>
<i>Aspergillus nidulans</i>	FGSC 116	genotípus: <i>yA2</i>
<i>Aspergillus nidulans</i>	FGSC 1035	genotípus: <i>yA2fadAG203R</i> , Ronen és mtsai. (2007)
<i>Aspergillus nidulans</i>	R153	genotípus: <i>wA2;pyroA4</i> , Ronen és mtsai. (2007)
<i>Aspergillus nidulans</i>	<i>alcA-pkcA</i>	genotípus: <i>wA2; pyroA4; pyrG89::pyr4alcA(p)::pkcAΔp</i> Ronen és mtsai. (2007)
<i>Aspergillus nidulans</i>	GR5	genotípus: <i>pyrG89; wA3; pyroA4</i> , Guest és mtsai. (2004)
<i>Aspergillus nidulans</i>	RhoA ^{G14V}	<i>A773+pGG2 (rhoA^{G14})</i> és <i>pRG3AMA1</i> , Guest és mtsai. (2004)
<i>Aspergillus nidulans</i>	<i>AmpkA</i>	genotípus: <i>AmpkA</i> Bussink és Osmani (1999)
<i>Aspergillus nidulans</i>	RKIS1	genotípus: <i>papaA1; yA2</i> Shimizu és Keller (2001)
<i>Aspergillus nidulans</i>	<i>ΔpkaA</i>	genotípus: <i>papaA1; yA2; ΔpkaA::argB; ΔargB::trpC; trpC801; veA1</i> Shimizu és Keller (2001)
<i>Aspergillus nidulans</i>	Actin GFP	Taheri-Talesh és mtsai. (2008)
<i>Aspergillus niger</i>	SZMC 601	n. a.
<i>Aspergillus nomius</i>	SZMC 2441	humán keratitisz
<i>Aspergillus tamaris</i>	SZMC 2482	humán keratitisz
<i>Aspergillus terreus</i>	SZMC 2535	humán keratitisz
<i>Aspergillus tubingensis</i>	SZMC 2503	humán keratitisz
<i>Aspergillus welwitschiae</i>	SZMC 2390	humán keratitisz
<i>Fusarium incarnatum</i>	SZMC 11403	humán keratitisz
<i>Fusarium solani</i>	SZMC 11412	humán keratitisz
<i>Fusarium solani</i>	SZMC 11427	humán keratitisz
<i>Fusarium sporotrichioides</i>	SZMC 11421	humán keratitisz
<i>Pichia pastoris</i>	KM71H	genotípus: <i>arg4 aox1::ARG4</i>
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	UAMH 7955	humán szinusz
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	UAMH 9515	humán peritoneális folyadék
Járomspórás gombák		
<i>Absidia corymbifera</i>	SZMC 95033	humán tüdőfertőzés
<i>Rhizomucor miehei</i>	CBS 360.92	humán mikózis
<i>Rhizomucor pusillus</i>	ETH M4920	humán trachea
<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>oligosporus</i>	CBS 102.277	humán rhinocerebrális fertőzés
<i>Rhizopus oryzae</i>	CBS 140.90	humán <i>pallatum molle</i> fertőzés
Baktérium		
<i>Escherichia coli</i>	TOP10F	n.a.

SZMC: *Szeged Microbiological Collection*, Szeged, Magyarország; FGSC: *Fungal Genetics Stock Center*, Kansas, USA; UAMH: *University of Alberta Microfungus Collection and Herbarium*, Edmonton, Kanada; CBS: *Centraalbureau voor Schimmelcultures Baarn*, Utrecht, Hollandia; ETH: *Eidgenössische Technische Hochschule Mycological Herbarium*, Zürich, Svájc; n.a.: nem közölt adat

5.2 Tápközegek, tenyésztési körülmények

5.2.1 Tápközegek

Minimál tápoldat/táptalaj (*minimal medium*, MM): 5% (v/v) sóoldat*, 10 g/l D-glükóz, 0,85 g/l NaNO₃, 0,1% (v/v) vitaminoldat**, táptalaj esetében 20 g/l agarral, illetve szükség esetén 2 g/l para-amino-benzoosavval, 50 mg/l piridoxinnal, vagy 400 mg/l biotinnal kiegészítve.

*Sóoldat: 26 g/l KCl, 26 g/l MgSO₄•7 H₂O, 76 g/l K₂PO₄, 5% (v/v) nyomelemoldat***.

Vitaminoldat: 40 mg/l pantoténsav, 40 mg/l para-amino-benzoosav, 50 mg/l riboflavin, 25 mg/l piridoxin, 0,1 mg/l biotin, 50 mg/l tiamin. *Nyomelemoldat: 40 mg/l Na₂B₄O₇•10 H₂O, 400 mg/l CuSO₄, 714 mg/l FePO₄, 728 mg/l MnSO₄•H₂O, 800 mg/l Na₂MoO₄•2H₂O, 8 mg/l ZnSO₄•7 H₂O.

Komplett tápoldat/táptalaj (*complete medium*, CM): 5% (v/v) sóoldat, 10 g/l D-glükóz, 0,85 g/l NaNO₃, 0,1% (v/v) vitaminoldat, 1,5 g/l kazamiosav, 2 g/l pepton, 1 g/l élesztőkivonat.

Pufferelt minimál glicerol és minimál metanol tápoldat (*Buffered minimal glycerol medium* és *Buffered minimal methanol medium*, BMG és BMM): 100 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄ puffer pH=6*, 134 g/l *Yeast Nitrogen Base* (Sigma Aldrich), 200 mg/l biotin, 1% (v/v) glicerol vagy 0,5% (v/v) metanol. *K₂HPO₄/KH₂PO₄ puffer (pH=6): 174 g/l K₂HPO₄, 136 g/l KH₂PO₄.

Malátás tápoldat/táptalaj (*malt extract agar/medium*, MEA): 5 g/l malátakivonat, 5 g/l élesztőkivonat, 5 g/l D-glükóz, 10 g/l K₂PO₄, táptalaj készítése estén 20 g/l agar.

Alacsony sótartalmú Luria-Bertani tápoldat/táptalaj (*Low Salt Luria-Bertani broth/agar*, LSLB): 10 g/l tripton, 5 g/l élesztőkivonat, 5 g/l NaCl, táptalaj esetében 20 g/l agar.

Élesztőkivonat-pepton-glükóz táptalaj/tápoldat (*Yeast Extract-Peptone-Glucose medium* YPD): 10 g/l élesztőkivonat, 20 g/l pepton, táptalaj esetében 20 g/l agar, szükség esetén 182,2 g/l D-szorbit.

Antifungális protein-indukáló tápoldat (*antifungal protein induction medium*, AFPIM): 15 g/l keményítő, 10 g/l húskivonat, 20 g/l pepton, 5-30 g/l NaCl és 0-1% (v/v) etanol, pH=6,8.

5.2.2 Tenyésztési körülmények

A járomspórás és tömlősgomba fajokat 4 °C-on, MEA táptalajon tartottuk fenn, kivéve az *Aspergillus nidulans* FGSC A4 törzsét, melyet CM táptalajon, és a jelátviteli utakban mutáns *A. nidulans* törzseket, melyeket az egyes törzseknek megfelelő anyagokkal kiegészített MM táptalajon, szintén 4 °C-on tartottuk fenn. A spóraszuszpenziók készítéséhez a gombák fenntartására használt táptalajon nevelt, spóráztatott tenyészeteket használtuk. Az inkubációs hőmérséklet az egyes törzsek igényeinek megfelelően 25, 30 és 37 °C volt.

A transzformáláshoz használt *Escherichia coli* TOP10F⁻ törzset 37% glicerol-tartalmú LSLB tápoldatban, -80 °C-on tartottuk fenn. A transzformáns *E. coli* sejteket 25 µg/ml zeocin-tartalmú LSLB táptalajon növesztettük 37 °C-on, 16 órán át.

A transzformáláshoz használt *Pichia pastoris* KM71H törzseket 37% glicerol-tartalmú YPD tápoldatban, -80 °C-on tartottuk fenn. A transzformáns *P. pastoris* KM71H sejteket 100 µg/ml zeocin-tartalmú YPDS táptalajon növesztettük 3 napon át.

A plazmid- és DNS-kivonáshoz az *E. coli* TOP10 F⁻ sejteket LSLB tápoldatban, 37 °C-on, 150 rpm-en rázatva növesztettük 16 órán át, a *P. pastoris* KM71H sejteket pedig YPD tápoldatban, 30 °C-on, 150 rpm-en rázatva szintén 16 órán át.

Az NFAP heterológ expressziójához az előtenyésztett *P. pastoris* KM71H-t BMG tápoldatban, 30 °C-on, 16 órán át, 220 rpm-en rázatva növesztettük. A heterológ expresszió BMM tápoldatban, 30 °C-on, 5 napon át, 220 rpm-en rázatva folyt, 24 óránként 1% (v/v) metanol hozzáadásával.

Az antifungális hatásvizsgálatokhoz 10 g/l L-glutaminnal kiegészített RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) tápoldatot, CM tápoldatot, és az egyes fajok igényeinek megfelelően kiegészített MM tápoldatot használtunk. Az inkubációs hőmérséklet fajtól függően 25 °C (*Aspergillus niger* SZMC 601, *Neosartorya fischeri* NRRL 181), 30 °C (*A. nidulans* R153, *A. nidulans alcA-pkc*, *A. nidulans actin-GFP*, *P. pastoris* KM71H), vagy 37 °C (*Aspergillus corymbifera* SZMC 95033, *Aspergillus awamori* SZMC 2390, *Aspergillus flavus* SZMC 2521, *Aspergillus fumigatus* SZMC 2394, *A. nidulans* FGSCA4, *A. nidulans* FGSC 116, *A. nidulans* FGSC 1035, *A. nidulans* GR5, *A. nidulans* RhoAG14V, *A. nidulans* RKIS1, *A. nidulans ΔmpkA*, *A. nidulans ΔpkaA*, *Aspergillus nomius* SZMC 2441, *Aspergillus tamaritii* SZMC 2482, *Aspergillus terreus*, SZMC 2535, *Aspergillus tubingensis* SZMC 2503, *Fusarium incarnatum* SZMC 11403, *E. coli* TOP 10F⁻, *Fusarium solani* fajkomplex SZMC 11412, *F. solani* fajkomplex SZMC 11427, *Fusarium sporotrichioides* SZMC 11421, *Rhizomucor miehei* CBS 360.92, *Rhizomucor pusillus* ETH M4920, *Rhizopus microsporus*

var. *oligosporus* CBS 102.277, *R. oryzae*, CBS 140.90, *Trichoderma longibrachiatum* UAMH 7955, *T. longibrachiatum* UAMH 9515) volt.

5.3 Pufferek, oldatok és reagensek

Kompetens *E. coli* sejtek készítéséhez használt oldatok:

- 100 mM CaCl₂ oldat, hűtve tárolva
- 70 % (v/v) glicerol

E. coli TOP10 F⁻ sejtek transzformációjához használt oldatok:

- TCM puffer: 10 mM Tris (pH=7,5), 10 mM CaCl₂, 10 mM MgCl₂
- Antibiotikum-törzsoldat: 10 mg/ml zeocin (Life Technologies) steril desztillált vízben hígítva

Nukleinsav gélelektroforézishez használt oldatok:

- TAE puffer: 40 mM Tris-HCl (pH=7,6), 1 mM Na₂EDTA
- Agaróz gél: 10 g/l agaróz, TAE pufferben
- 1×SYBR Safe (Life Technologies) DNS festék törzsoldat agaróz gélben
- Mintapuffer: 6×DNS mintapuffer (Thermo Scientific)
- Molekulasúlymarker: *GeneRuler 1 kb DNA Ladder* (Thermo Scientific); *pUC Mix Marker* (Thermo Scientific): steril desztillált víz: 6×DNS mintapuffer: molekulasúlymarker 4:1:1 arányú keveréke

Elektrokompetens *P. pastoris* KM71H sejtek készítéséhez használt oldatok:

- 1M D-szorbit oldat, hűtve tárolva
- 70% glicerol

P. pastoris KM71H sejtek elektroporálásához használt oldatok:

- 1M D-szorbit oldat, hűtve tárolva
- Antibiotikum törzsoldat: 10 mg/ml zeocin (Life Technologies) steril desztillált vízben hígítva

Fehérjetisztításhoz használt oldatok:

- 50 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ puffer (pH=7,2)
- 1M NaCl oldat

Fehérje-gélelektroforézishez használt anyagok:

- 4-12%-os Bis-Tris gél (NuPAGE[®], Novex[®], 4-12% *Bis Tris Protein Gel*, 1.0 mm 10 well, Life Technologies)
- 1× futtatópuffer: NuPAGE[®] MES *Running Buffer* (pH=7,3) (Life Technologies)
- Fehérje-molekulasúlymarker: *SeeBlue[®] Plus2 Protein Standard* (Life Technologies)

Poliakrilamid gél festéséhez használt oldatok:Coomassie-kék festés:

- Coomassie-kék festőoldat: 250 mg/l *Coomassie Brilliant Blue R-250*, 40% metanol, 7% ecetsav
- Mosó oldat 1: 40% (v/v) metanol, 7% (v/v) ecetsav
- Mosó oldat 2: 5% (v/v) metanol, 3,5% (v/v) ecetsav

Ezüstfestés:

Fixáló oldat: 50% (v/v) metanol, 12% (v/v) ecetsav, 0,05% (v/v) formaldehid

Szenzitizáló oldat: 0,02% (v/v) Na₂S₂O₃

Ezüst-nitrát oldat: 0,2 % (v/v) AgNO₃ oldat

Előhívó oldat: 4 mg/l Na₂S₂O₃, 60 g/l NaCO₃, 0,05% (v/v) formaldehid

Tömegspektrometriás méréseknél használt oldatok:

- „A” eluens: desztillált víz, 0,1 % (v/v) hangyasav
- „B” eluens: acetonitril, 0,1% (v/v) hangyasav

Spóraszuszpenzió készítéséhez használt oldat:

- 0,01% (v/v) Tween 80

NFAP-elleni antiszérum termeléséhez használt oldatok:

- Freund adjuváns (Sigma-Aldrich)
- PBS (*phosphate buffered saline*): 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na₂HPO₄, 1,47 mM KH₂PO₄

Western-blotthoz használt anyagok:

- PVDF membrán (*Immobilion-P*, Millipore)
- TBST oldat (*Tris buffered saline with Tween*): 50 mM Tris (pH=7,4), 150 mM NaCl
- Blokkoló oldat: 50 g/l tejpor TBST-ben oldva
- NFAP antiszérum TBST-ben hígítva 1:100 arányban
- Tormaperoxidázzal konjugáltatott anti-patkány másodlagos ellenanyag (*Goat Anti-Rat IgG HRP Conjugated Antibody*, R&D Systems) TBST-ben hígítva 1:1000 arányban
- *Supersignal West Pico* kemilumineszcens szubsztrát (Thermo Scientific)

Mikroszkópos vizsgálatoknál használt oldatok:

Metabolikus aktivitás vizsgálata:

- 5 µM FUN-1 festék (Life Technologies)
- 10 mM HEPES puffer (pH=7,2) (Sigma-Aldrich)

Apoptózis detektálása:

- *Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit* (Sigma-Aldrich)

Membránintegritás vizsgálata:

- 5 µg/ml propídium-jodid (PI, Sigma-Aldrich) CM-ben oldva
- 70% etanol

A sejtfa kitintartalmának vizsgálata:

- 10 µM *Calcofluor white* (CFW, Sigma-Aldrich) CM-ben oldva

Immunfluoreszcens festés:

- Fixáló oldat: 50 mM piperazine-N,N'-bis (2-etánszulfonsav) (pH=6,7) (PIPES, Sigma-Aldrich), 5 mM MgSO₄, 5% (v/v) dimetil szulfoxid (DMSO), 8% (v/v) formaldehid
- PEM puffer: 50 mM PIPES (pH=6,7), 25 mM EGTA, 5 mM MgSO₄
- Sejtfaemésztő oldat: 500 mg/ml Glucanex (Sigma-Aldrich) PEM pufferben oldva
- Fehérjekicsapáshoz használt oldat: 100 mM PIPES (pH=6,7)

- TBS/B puffer (*Tris-buffered saline* BSA): 20 mM Tris-HCl (pH=8,0), 20 mM NaCl, 0,1% (v/v) Tween 20, 3% (v/v) BSA (*bovine serum albumine*, Sigma-Aldrich)
- Anti-NFAP szérum TBS/B pufferben hígítva 1:600 arányban
- Másodlagos antitest: Fluoreszcein-izotiocianáttal konjugáltatott kecske anti-patkány Immunglobulin G TBS/B (*FITC-conjugated goat anti-rat-IgG*, Sigma-Aldrich) pufferben hígítva 1:40 arányban
- 5 µg/ml latrunculin B 20% (v/v) etanolban oldva
- Monoklonális egér anti aktin (*Monoclonal anti β -actin produced in mouse*, Sigma-Aldrich) TBS/B pufferben hígítva 1:600 arányban
- Tetrametilrodamin-izotiocianáttal (TRITC) konjugáltatott poliklonális nyúl anti-egér antitest (*Antimouse IgG-TRITC antibody produced in rabbit*, Sigma Aldrich) TBS/B pufferben hígítva 1:40 arányban

Jelátviteli utakban mutáns *A. nidulans* törzsek érzékenységvizsgálatánál használt anyagok:

- 5 mM 8-bromoadenozin-3'5'-ciklikus monofoszfát (8-Br-cAMP, Sigma-Aldrich)
- 10, 20, 100 µg/ml *calcofluor white* (CFW, Sigma-Aldrich)
- 10, 20 mM koffein (Sigma-Aldrich)

5.4 Alkalmazott indítószekvenciák

Az NFAP-t kódoló cDNS klónozásánál használt indítószekvenciák:

NFAPXHOIF: 5'-GGCCCTCGAGAAAAGACTTGAGTATAAAGGAGAATG-3' (T_m : 62,0 °C)

NFAPXBAIR: 5'-GGCCTCTAGATCAATGGCGGAAGTCACACTTG-3' (T_m : 64,5 °C)

Az *nfap*-t hordozó pPICZ α A vektor *P. pastoris* KM71H-ba való beépülésének ellenőrzésére használt indítószekvenciák:

AOX15': 5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3' (T_m : 54,2 °C)

AOX13': 5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3' (T_m : 54,7 °C)

5.5 Módszerek

5.5.1 Az érett NFAP-t kódoló gén pPICZ α A vektorba történő klónozása

5.5.1.1 Az *nfap* cDNS amplifikálása

A Kovács és mtsai. (2014) által a *N. fischeri* NRRL 181 izolátum genomjából izolált és pBSK(-) plazmidba klónozott cDNS-t (pBSK(-)*nfap*) az *Xho*I és *Xba*I restrikciós endonukleázok hasítóhelyeit tartalmazó NFAPXHOIF és NFAPXB AIR primerek használatával amplifikáltuk a plazmidból. A gén amplifikálásához polimeráz láncreakciót végeztünk el *MJ Mini*TM *Personal Thermal Cycler* (Bio-Rad) használatával. A reakciót 25 μ l végtérfogatban mértük össze a következők szerint:

- 1x *Pfu* puffer (Zenon Bio)
- 0,5 mM dNTP mix (Thermo Scientific)
- 125 ng *forward* és *reverse* indítószekvencia
- 2,5 mM MgCl₂
- 10 ng plazmid DNS
- 2 U *Pfu* DNS-polimeráz (Zenon Bio)

A reakciókörülmények a következők voltak:

94 °C - 2 perc	1 ciklus	elődenaturálás
94 °C - 10 mp	} 35 ciklus	denaturálás
58 °C - 30 mp		indítószekvencia-kötődés
72 °C - 1 perc		láncszintézis
72 °C - 5 perc	1 ciklus	végző láncszintézis

A PCR-terméket gélelektroforézissel ellenőriztük 1,2% (m/v) agaróz gélen, majd a gélből *Gel-M Gel Extraction System* (Viogene) használatával izoláltuk vissza.

5.5.1.2 A pPICZ α A vektor tisztítása

Az *E. coli* TOP10F⁻ sejtekben fenntartott pPICZ α A plazmidot a *Viogene Mini-M Plasmid DNA Extraction System* (Viogene) használatával tisztítottuk, a gyártó utasításait követve.

5.5.1.3 Az érett NFAP-t kódoló cDNS klónozása pPICZ α A plazmidba

Az érett NFAP-t kódoló cDNS pPICZ α A vektorba történő klónozásához az amplifikált *nfap* cDNS-t és a pPICZ α A plazmidot *Xho*I és *Xba*I restriktációs endonukleázokkal emésztettük, majd az *nfap* cDNS-t a pPICZ α A plazmid megfelelő restriktációs hasítóhelyeire klónoztuk (6. Ábra).

```
TTGCGACTGGTTCCAATTGACAAGCTTTTGATTTAACGACTTTTAACGACAACCTTGAGAAGATCAAAAAACAATAATTATT
CGAAACGATGAGATTTTCCTTCAATTTTACTGCTGTTTTATTTCGCAGCATCCTCCGCATTAGCTGCTCCAGTCAACACTACAAC
AGAAGATGAAACGGCACAATAATCCGGCTGAAGCTGTTCATCGGTTACTCAGATTTAGAAGGGGATTTCGATGTTGCTGTTTTGC
CATTTTCCAACAGCACAATAACGGGTTATTGTTTTATAAATACTACTATTGCCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAGGGGTATCT
CTCGAGAAAAGA CTTGAGTATAAAGGAGAATGTTTTACAAAGGACAACACTTGTAATAACAAAATTGATGGGAAGACATACCTT
GCCAAGTGCCTAGCGCCGCAACACAAAAGTGCAGAGGATGGAATAAGTGCACATATGACTCCTACAACAGAAAGGTCAAG
TGTGACTTCGCCATTGACTAGACAAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGAATAGCGCCGTCGACCATCATCATCATCATC
ATTGAGTTTTGTAGCCTTAGACATGACTGTTTCTCAGTTCAAGTTGGGCATTACGAGAAGACCGGTCTTGCTAGATTCTAATC
AAGAGGATGTCAGAATGCCATTTGCCTGAGAG
```

6. Ábra A pPICZ α A plazmid *multiple cloning site*-ja a beépült, érett NFAP-t kódoló cDNS-sel. Zölddel jelöltük a Kex2 proteáz hasítóhelyét *Xho*I restriktációs endonukleáz hasítóhelyével kiegészülve, pirossal az *Xba*I restriktációs endonukleáz hasítóhelyét. Narancssárga dőlt betűvel jelöltük az érett NFAP-t kódoló cDNS-t.

Az emésztési reakciók összetétele a következő volt:

Plazmidemésztés:

43 μ l desztillált vízben oldott 5 μ g plazmid

4 μ l megfelelő enzimpuffer (Thermo Scientific)

3-3 μ l (30-30 U) *Xho*I és *Xba*I restriktációs endonukleáz (Thermo Scientific)

nfap cDNS emésztése:

14 μ l desztillált vízben oldott *nfap* 2 μ g DNS

2 µl megfelelő enzimpuffer (Thermo Scientific)

2-2 µl (20-20 U) *XhoI* és *XbaI* restrikciós endonukleáz (Thermo Scientific)

Az emésztési reakciókat 16 órán át 37 °C-on inkubáltuk és 20 perces, 65 °C-on történő hőkezeléssel állítottuk le.

Az emésztett *nfa*p cDNS-t T4 ligáz használatával ligáltuk a pPICZαA plazmidba. A ligálási reakció összetétele a következő volt:

3 µl desztillált vízben oldott 100 ng inszert DNS

5 µl desztillált vízben oldott 500 ng emésztett pPICZαA plazmid

1 µl 10× T4 DNS ligáz puffer (Thermo Scientific)

1 µl T4 DNS ligáz (5 U) enzim (Thermo Scientific)

A ligálási reakciót 16 órán át 4 °C-on inkubáltuk és 10 perces 65 °C-on történő hőkezeléssel állítottuk le.

5.5.2 Az *nfa*p cDNS-t hordozó pPICZαA transzformálása *E. coli* TOP10F⁻ sejtbe

A létrehozott vektorkonstrukciót fenntartás céljából *E. coli* Top10F⁻ törzsébe transzformáltuk. A transzformáláshoz kompetens *E.coli* Top10 F⁻ sejteket készítettünk.

5.5.2.1 *E. coli* TOP10F⁻ kompetens sejt készítése

E. coli TOP10F⁻ 16 órán át nevelt tenyészet 3 ml-ét 30 ml LB tápoldatba átváltoztatva OD₆₂₀=0,5 érték eléréséig növesztettük 37 °C-on, 220 rpm-en történő rázatás mellett. A sejteket centrifugálással összegyűjtöttük (2200×g, 5 perc, 4 °C) és 30 ml hideg 100 mM-os CaCl₂ oldatban szuszpendáltuk. Az előző lépés megismétlése után a szuszpenziót 1 órán át 4 °C-on inkubáltuk, majd a sejteket ismét centrifugáltuk (2200×g, 5 perc, 4 °C), majd 800 µl hideg, 20 % (v/v) glicerin-tartalmú CaCl₂ oldatba szuszpendáltuk és 200 µl-es térfogatokban szétadagoltuk. A sejteket felhasználásig -80 °C-on tároltuk.

5.5.2.2 Baktérium-transzformáció

100 µl fagyasztva tárolt, kompetens *E. coli* TOP10F⁻ sejthez jégen történő felolvasztás után 100 ng pPICZα*Anfa*p plazmidot és 100 µl TCM puffert adtunk. Ezt követően 1 perc 30 másodpercre 42 °C-ra helyeztük, majd 10 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. A

baktériumokat végül 25 µg/ml zeocint (Life Technologies) tartalmazó LSLB táptalajra szélesztettük és 16 órán át 37 °C-on inkubáltuk.

5.5.3 A pPICZαAnfap plazmid transzformálása *P. pastoris* KM71H-ba

Az NFAP heterológ expressziója érdekében az *anfap* gént tartalmazó, linearizált pPICZαA expressziós vektort (pPICZαAnfap) *P. pastoris* KM71H sejtekbe transzformáltuk elektroporálással. Az elektroporáláshoz elektrokompetens sejteket használtunk.

5.5.3.1 Elektrokompetens *P. pastoris* KM71H sejt készítése

Az elektrokompetens sejtek készítése az *Easy Select Pichia Expression Kit* (Life Technologies) utasításai alapján történt. A *P. pastoris* KM71H törzsét 5 ml YPD tápoldatban növesztettük 50 ml-es Falcon-csőben, 16 órán keresztül, 30 °C-on, 220 rpm-en történő rázatás mellett. Az 5 ml térfogatú tenyészetet 200 ml YPD tápoldatba oltottuk, és az OD₆₂₀=1,3-1,5 érték eléréséig növesztettük. A tenyészetet centrifugáltuk (1500×g, 5 perc, 4 °C). A felülúszó leöntését követően a leülepedett sejteket 100 ml steril, hideg desztillált vízben szuszpendáltuk. Az előző lépés megismétlését követően a sejteket 20 ml steril, hideg 1 M szorbit oldatba szuszpendáltuk fel. Újabb centrifugálást követően (1500×g, 5 perc, 4 °C) a leülepedett sejteket 1 ml 1 M szorbit oldatba szuszpendáltuk. A sejteket jégen tartottuk és az elkészítésük napján felhasználtuk.

5.5.3.2 Élesztő elektroporáció

A *P. pastoris* KM71H sejtek pPICZαAnfap plazmiddal történő elektroporációs transzformálásához a plazmidot *Bst*XI emésztéssel linearizáltuk. Az emésztési reakció összetétele a következő volt:

24 µl desztillált vízben oldott 3 µg inszertet hordozó vektor

3 µl megfelelő enzimpuffer

3 µl (30 U) *Bst*XI restrikciós endonukleáz

Az emésztési reakciót 1 órán át 55 °C-on inkubáltuk, majd 10 perces 80 °C-os hőkezeléssel állítottuk le.

Az emésztési reakció dialízisét követően a pPICZαAnfap plazmidot elektroporálással elektrokompetens *P. pastoris* KM71H sejtekbe juttatuk. Az elektroporáláshoz 2 mm-es

résméretű elektroporációs küvettát (*GenePulser/MicroPulser Electroporation Cuvette*, Bio-Rad) és *MicroPulser* elektroporációs készüléket (Bio-Rad) használtunk ($V=2,5$ kV, $t=6$ msec). Az elektroporálást követően 1 ml hideg 1M szorbitolt adtunk a sejtekhez és 2 órán át 30 °C-on inkubáltuk azokat. A sejteket végül 100 µg/ml zeocin-tartalmú YPDS táptalajra szélesztettük és 3 napon keresztül 30 °C-on inkubáltuk.

A vektor integrálódását a *P. pastoris* genomjába a plazmidon található alkohol-oxidáz promóterének (AOX1) PCR-alapú szűrésével, az AOX15' és az AOX13' primerek használatával, és az így kapott fragment kapilláris szekvenálásával végeztük el. A polimeráz lánreakcióhoz a transzformáns *P. pastoris* sejtekből DNS-t vontunk ki az *E.Z.N.A.® Yeast DNA Kit* (Omega Bio-Tek) használatával, a gyártó utasításait követve. A polimeráz lánreakció összetétele a következő volt:

- 10 µl *Phusion* puffer (Thermo Scientific)
- 1 mM dNTP mix (Thermo Scientific)
- 125 ng *forward* és *reverse* indítószekvencia
- 50 ng plazmid DNS
- 0,5 µl (10 U) *Phusion* polimeráz (Thermo Scientific)

A reakciókörülmények a következők voltak:

94 °C - 3 perc	1 ciklus	elődenaturálás
94 °C - 20 mp	} 35 ciklus	denaturálás
55 °C - 20 mp		indítószekvencia-kötődés
72 °C - 3 perc		láncszintézis
72 °C - 5 perc	1 ciklus	végso láncszintézis

A PCR-termék szekvenciájának meghatározását az AGOWA Sequencing (Berlin, Németország) munkatársai végezték. A szekvenogramok kiértékeléséhez a *BioEdit* (Hall, 1999) és az NCBI honlapján található *Basic Local Alingment Search Tool* (Altschul és mtsai., 1990; BLAST, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) programokat használtuk.

5.5.4 Az NFAP heterológ expressziója

Az NFAP heterológ expresszióját az *Easy Select Pichia Expression Kit* (Life Technologies) utasításait követve végeztük el. Tíz transzformáns *P. pastoris* KM71H telepet egyenként 10 ml glicerol-tartalmú BMG tápoldatba oltottunk. A sejteket 16 órán át, 30 °C-on növesztettük rázatás mellett (220 rpm). Az előtenyészeteket továbboltottuk 3 l-es Erlenmeyer-lombikban lévő 1 l BMG tápoldatba. A sejteket további 16 órán át növesztettük 30 °C-on, rázatás mellett (220 rpm), majd a tenyészetet centrifugáltuk (1500×g, 5 perc, 25 °C). A felülúszó leöntése után a sejteket 100 ml metanol-tartalmú BMM tápoldatban szuszpendáltuk. A 100 ml sejtszuszpenziót 1 l-es Erlenmeyer-lombikba helyeztük és 30 °C-on inkubáltuk 5 napon keresztül, rázatás mellett, 24 óránként 500 µl metanolt adva a tenyészetekhez (1%, v/v). A 2. naptól kezdődően naponta 1-1 ml mintát vettünk a tenyészetekből. A mintákat centrifugáltuk (1500×g, 5 perc, 25 °C), és a felülúszókat fehérje-gélelektroforézissel vizsgáltuk. Ezüstoffestés után a poliakrilamid-gélen megjelenő sávok erőssége alapján választottuk ki a hNFAP-t legnagyobb mennyiségben termelő transzformánst. A továbbiakban az összes heterológ NFAP (hNFAP) termelést ezzel a transzformánssal végeztük a fent leírt módszer alapján.

5.5.5 A heterológ expresszió ellenőrzése

Az *nfap* gént hordozó transzformáns *P. pastoris* sejtek fermentlevének fehérjetartalmát nátrium-lauril-szulfát (SDS) poliakrilamid gélelektroforézissel (PAGE) és Coomassie-kék, valamint ezüstoffestéssel vizsgáltuk.

5.5.5.1 Fehérje-gélelektroforézis

A fehérje-gélelektroforézist 4-12%-os Bis-Tris gélen (NuPAGE[®], Novex[®], 4.12% *Bis-Tris Protein Gel*, 1.0 mm, 10 well, Life Technologies) végeztük, 1×MES (2-(N-morfolino)etánszulfonsav, Life Technologies) futtatópuffer használatával. A mintáinkat 200 V feszültségen futtattuk 30 percig.

5.5.5.2 Coomassie-kék festés

Az SDS-PAGE gélt 16 órán át Coomassie-kék festőoldatban rázattuk (45 rpm). Ezután a gélt 2 × 30 percen át az 1. mosóoldatban, majd 2 × 45 percen át a 2. mosóoldatban rázattuk (45 rpm).

5.5.5.3 Ezüstfestés

Az SDS-PAGE gélt 2 órán át fixálóoldatban rázattuk (45 rpm). A fixálóoldat leöntése után 3×30 percig 20% etanollal, majd 2 percig szenzitizáló oldattal kezeltük. Ezt követően 2×1 percig desztillált vízzel mostuk, majd 20 percig 0,2% (m/v) AgNO_3 oldatban rázattuk. Újabb desztillált vizes mosást követően az előhívóoldatban rázattuk a gélt a fehérjesávok megjelenéséig. A sávok megjelenése után 96 %-os (v/v) ecetsavval állítottuk le a reakciót.

Az agaróz és az SDS-PAGE gélek kiértékelése *BioDoc-It System* géldokumentációs rendszerrel (UVP Inc.), UV-szűrő vagy annak használata nélkül történt.

5.5.6 A *P. pastoris* KM71H által termelt hNFAP tisztítása

Az 5.5.5 fejezetben leírtak alapján termelt 100 ml fermentlevet centrifugálással ($1500 \times g$, 5 perc, 25°C) sejtmentesítettük. A felülúszót 80% (m/v) NH_2SO_4 -tal, 4°C -on történő 24 órás kisózással betöményítettük. A betöményített fehérjemintát 20 ml 50 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ pufferben ($\text{pH}=7,2$) szuszpendáltuk.

5.5.6.1 Sómentesítés

A fehérjemintát dialízismembránban (*Snake Skin dialysis tubing*, 3,5 K MWCO, Thermo Scientific) 50 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ($\text{pH}=7,2$) pufferrel szemben, 1:100 arányban, 48 órán át, 4°C -on sómentesítettük.

5.5.6.2 Ultraszűrés

A sómentesített minta fehérjetartalmát ultraszűréssel 10 kDa alatti és 10 kDa feletti frakciókra különítettük. Az ultraszűréshez *Corning® Spin-X® Concentrator (10 MWCO*, Sigma-Aldrich) ultraszűrőt használtunk ($4000 \times g$, 17 perc, 4°C). A továbbiakban a 10 kDa alatti frakcióval dolgoztunk tovább.

5.5.6.3 Kationcserés oszlopkromatográfia

A hNFAP-t tartalmazó 10 kDa alatti fehérjefrakciót kationcserés oszlopon (*Bio-Scale™ Mini Macro-Prep High S column*, Bio-Rad) tisztítottuk *DuoFlow* folyadékromatográfiás készülék segítségével (*Duoflow Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) System*, Bio-Rad). Az oszlopot ötszörös oszloptérfogatnyi 50 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ($\text{pH}=7,2$) pufferrel ekvilibráltuk. A mintafelvétel átfolyási sebessége 0,5

ml/perc volt. A mintafelvétel után a fehérjét 50 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ (pH=7,2) pufferben készített 0,0-1,0 M NaCl grádienssel eluáltuk, 2 ml/perc átfolyási sebességgel.

5.5.7 A hNFAP azonosítása

5.5.7.1 A hNFAP tisztaságának ellenőrzése

A hNFAP tisztaságát SDS-PAGE poliakrilamid-gélelektroforézissel (SDS-PAGE) és ezüstoffestéssel ellenőriztük az 5.5.5 fejezetben leírtak alapján.

5.5.7.2 A hNFAP koncentrációjának meghatározása

A tisztított hNFAP koncentrációját Bradford-módszerrel határoztuk meg. Ehhez BSA fehérjéből kalibrációs sort készítettünk 20-20 µl végtérfogatban, felező hígítással 0,0015-1 mg/ml koncentráció-tartományban. A kalibrációs sor egyes tagjaiból, valamint a tisztított fehérjemintánkból 5-5 µl-t 96-lyukú mikrotiterlap mintahelyeibe pipettáztunk. Az egyes mintákhoz 200 µl steril desztillált víz és Bradford reagens (Sigma-Aldrich) 1:1 arányú keverékét adtuk. Tizenöt perces, szobahőmérsékleten, sötétben történő inkubáció után mértük a minta fényelnyelését 595 nm hullámhosszon *Spectrostar Nano Control* mikrotiterlemez-olvasóval (BMG Biotech). A kalibrációs sor egyes tagjai OD₅₉₅-értékeinek ábrázolásával létrehozott kalibrációs egyenes egyenletének segítségével számoltuk ki a hNFAP koncentrációját.

5.5.7.3 A hNFAP azonosítása tömegspektrometriával

A hNFAP tömegspektrometriás azonosítása enzimatis emésztéses módszeren alapult. A tisztított hNFAP-t poliakrilamid gélen futtattuk. Az NFAP méretével megegyező tartományban lévő fehérjesávot kivágtuk. A gélkockát apró darabokra szeleteltük és 100 µl 50% acetonitrilben oldott 25 mM NH₄HCO₃-ot adtunk hozzá, majd 10 percig vortexeltük és centrifugáltuk (1 perc, 800×g). A felülúszó leöntése után a mintát vákuum-centrifuga segítségével beszárítottuk. A diszulfid-hidak redukálásához a beszárított mintához 25 µl 25 mM NH₄HCO₃-ban oldott 10 mM ditiotreitolt (DTT) adtunk, vortexelést követően 1 órán át 56 °C-on inkubáltuk, majd újra centrifugáltuk (1 perc, 800×g). A minta alkilálásához a felülúszó leöntése után a géldarabokhoz 25 µl jódacetamidot adtunk, sötétben, szobahőmérsékleten 45 percig inkubáltuk, és újabb centrifugálást követően ismét leöntöttük a felülúszót. A géldarabkákat 100 µl, 50% acetonitrilben oldott 25 mM NH₄HCO₃-tal

dehidratáltuk, majd vákuum-centrifugában beszáritottuk. A beszáritott mintához 25 µl tripszin oldatot adtunk és 10 percig 4 °C-on inkubáltuk, majd 25 µl 25 mM NH₄HCO₃-ot adtunk hozzá és 16 órán át 37 °C-on inkubáltuk. A triptikus emésztés után 5% hangyasav-50% acetonitril 1:1 arányú keverékét adtuk a mintához. Az emésztett minták analízise egy Q-TOF MS (kvadrupól-repülési idő tömegspektrométer, Micromass® Q-TOF, Waters) készüléssel összekapcsolt ultra nagyhatékonyságú folyadékkromatográf (UPLC, *Nano Aquity Ultrapformance Liquid Chromatography System*, Waters) segítségével történt BEH130 C18 oszlopon (Waters, oszlopmhossz 250 mm, oszlopátmérő: 75 µm, részecskeméret: 1,7 µm). A mozgó fázis kiindulási összetétele 3% „B eluens” volt, amelyet 40 perc alatt 40%-ra növeltünk 350 nl/min áramlási sebesség mellett (oszloptermosztát hőmérséklete: 40 °C). A tömegspektrométert MSE módban használtuk elektropray ionizációs forrással pozitív polaritással. Az adatok kiértékelése a WATER Biopharmalynx szoftver (Waters) használatával történt.

A tömegspektrometriás méréseket és az adatok értékelését Dr. Kele Zoltán, a Szegedi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Orvosi Vegytani Intézetének munkatársa végezte el.

5.5.7.4 N-terminális szekvenálás

A hNFAP első öt N-terminális aminosavát Edman-féle szekvenálással határozták meg automata szekvenáló készülék (*Procise Model 492 Edman Micro Sequencer*, Applied Biosystems, Egyesült Államok) és az online hozzákapcsolt aminosav-analizátor (*ABI Model 140C PTH Amino Acid Analyzer*, Applied Biosystems) segítségével az Innsbrucki Orvosi Egyetem, Klinikai Biokémiai Tanszékének munkatársai (Innsburck, Ausztria).

5.5.8 Az NFAP/hNFAP szerkezetének vizsgálata

5.5.8.1 *In silico* szerkezetmeghatározás

Az NFAP szerkezetének *in silico* módon történő meghatározását homológia-modellezéssel, a *MODELLER 9.1* szoftver (<https://salilab.org/modeller>) (Sali és Blundell, 1993) használatával végeztük el. Templátként az AFP (PDB azonosító: 1afp) NMR-spektroszkópiával meghatározott szerkezeti adatait használtuk. A szerkezeti modell értékelését a *Procheck* szoftver (<http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/PROCHECK/>) segítségével végeztük el. A molekulát a *PyMol* (PyMOL Molecular Graphics System, Version

1.7.4 Schrödinger, LLC) (<https://www.pymol.org/>) az *UCSF Chimera* (<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>) (Pettersen és mtsai., 2004) és a *SwissPDB Viewer* (<http://spdbv.vital-it.ch/>) (Gues és Peitsch, 1997) szoftverek segítségével ábrázoltuk.

5.5.9 Az NFAP termelése és tisztítása

A natív NFAP termeléséhez 1 ml 10^5 konídium/ml inokulumot tartalmazó *N. fischeri* NRRL 181 spórasuszpenziót 500 ml AFPIM tápoldatba oltottunk, majd 28 °C-on, 220 rpm-en folyamatos rázatva 7 napig növesztettük. A fermentlevet centrifugálás (4200×g, 5 perc) után steril gézlapon szűrtük át. A további tisztítási lépések megegyeztek az 5.5.6. fejezetben, a hNFAP-ra leírtakkal.

5.5.10 Az NFAP és a hNFAP antifungális spektrumának összehasonlítása

Az NFAP és a hNFAP antifungális spektrumának összehasonlítását humán fertőzésekből származó *Absidia*, *Rhizomucor*, *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Fusarium* és *Trichoderma* izolátumokon (ld. 6.2 fejezet), *in vitro* mikrodilúciós tesztekkel végeztük el a *Clinical Laboratory Standard Institute* utasításai alapján (*Clinical and Laboratory Standards Institute M38-A2 broth microdilution method*), kisebb módosításokkal, 96-lyukú mikrotiterlemezen, 620 nm hullámhosszú fény abszorbanciájának mérésével. Az abszorbancia méréséhez *SpectroStar Nano Control* mikrotiterlemez-olvasó készüléket (BMG Biotech) használtunk. A vizsgálathoz 100 µl RPMI 1640 tápoldatban hígított NFAP-t és hNFAP-t (12,5 µg/ml - 200 µg/ml) elegyítettünk szintén RPMI 1640 tápoldatban hígított spórasuszpenzióval (10^5 spóra/ml). A mikrotiter-lemezeket 37 °C-on inkubáltuk, az abszorbanciát 0, 24 (járomspórás gombák esetében), és 48 (tömlősgombák esetében) óra után mértük. A spektrometriai kalibrációhoz 200 µl steril RPMI 1640 tápoldatot használtunk. Növekedési kontrollként 100 µl steril RPMI 1640 tápoldat és RPMI 1640 tápoldatban hígított spórasuszpenzió (10^5 spóra/ml) elegyét alkalmaztuk. A gátlás mértékének megállapításához a növekedési kontrollok OD_{620} -értékeit tekintettük 100%-os növekedésnek.

Az érzékenységi teszteket három alkalommal ismételtük meg és minden esetben három párhuzamos leoltást használtunk.

5.5.11 A hNFAP hatására rövid és hosszú távon bekövetkező fenotipikus változások vizsgálata

5.5.11.1 Mikroszkópos vizsgálatok

A mikroszkópos vizsgálatokat *A. nidulans* FGSC A4, *A. nidulans* Actin-GFP, *A. nidulans* FGSC 1035 és *A. nidulans* Δ *pkA* törzseken végeztük el. A gombákat fedőlemezsre kitapasztva növesztettük fel CM-ben 37 °C-on (*A. nidulans* Actin-GFP esetében 30 °C-on). A hNFAP rövid távú hatásának vizsgálatához a fedőlemezeket CM-ben oldott, szubletális koncentrációjú (25 µg/ml) hNFAP-vel kezeltük 30 és 60 percig 37 °C-on (*A. nidulans* Actin-GFP esetében 30 °C-on), a hNFAP hosszú távú hatásának vizsgálata érdekében pedig 16 órán át. A mintákat festés után fény- és fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk, amihez AxioCam ERc 5s kamerával (Carl Zeiss) felszerelt Axiolab (Carl Zeiss) fluoreszcens mikroszkópot használtunk. A felvételeket a ZEN 2011 (Carl Zeiss) szoftver segítségével készítettük el és értékeltük ki. A PI festés során a 9-es számú szűrőszettet (excitáció BP 546/12 nm, emisszió LP 590 nm; Carl Zeiss), az Annexin V-FITC festés, az immunfluoreszcens festés és a GFP-fúziós aktin vizsgálatához a 15-ös számú szűrőszettet (excitáció BP 450- 490 nm, emisszió LP 515; Carl Zeiss), a CFW festéshez pedig a 49-es számú szűrőszettet (excitáció BP 365, emisszió BP 445/50, Carl Zeiss) használtuk.

5.5.11.2 A hNFAP metabolikus aktivitásra gyakorolt hatásának vizsgálata

Az *A. nidulans* FGSC A4 törzsének metabolikus aktivitását NFAP jelenlétében *FUN-1 viability stain* (Life Technologies) festék segítségével vizsgáltuk. A fedőlemezsre tapadt hifákat 10 mM HEPES pufferrel (pH=7,5) mostuk, majd 30 percig, 37 °C-on inkubáltuk 2% glükózt tartalmazó 10 mM HEPES pufferoldatban (pH=7,5). Inkubáció után 10 mM HEPES pufferben (pH=7,5) oldott 5 µM FUN-1 festékekkel inkubáltuk sötétben, szobahőmérsékleten, 30 percig, majd mikroszkóp alatt vizsgáltuk.

5.5.11.3 A membránintegritás vizsgálata hNFAP jelenlétében

A hNFAP hatását *A. nidulans* FGSC A4 membránintegritására PI festéssel vizsgáltuk. A fedőlemezsre tapadt hifákat CM-mel történő mosás után 5 µg/ml CM-ben oldott PI-vel inkubáltuk sötétben, 10 percig, szobahőmérsékleten. Pozitív festődési kontrollként 70% etanollal 30 percig, 4 °C-on inkubált mintát használtunk.

5.5.11.4 A lehetséges apoptotikus/nekrotikus események kimutatása hNFAP jelenlétében

A lehetséges apoptotikus/nekrotikus események kimutatására az *Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit*-et (Sigma-Aldrich) használtuk. A fedőlemezre tapadt *A. nidulans* FGSC A4 hifákat CM-mel történő mosás után *binding* puffer-ben oldott *Annexin V-FITC* és PI festékek elegyével inkubáltuk 10 percig szobahőmérsékleten, sötétben, majd mikroszkóp alatt vizsgáltuk.

5.5.11.5 Az aktineloszlás vizsgálata hNFAP jelenlétében

A hNFAP hatását az *A. nidulans* aktinhálózatra zöld fluoreszcens proteinnel konjugáltatott (*green fluorescent protein* - GFP) aktint expresszáló *A. nidulans* (*A. nidulans* Actin-GFP) törzsön vizsgáltuk.

5.5.11.6 A hNFAP kitintartalomra gyakorolt hatásának vizsgálata

A hNFAP *A. nidulans* sejtfalának kitintartalmára gyakorolt hatását *A. nidulans* törzsek (FGSC A4, FGSC 1035, *ΔpkaA*) hifáinak CFW-vel (Sigma-Aldrich) történő festésével vizsgáltuk. A fedőlemezre tapadt hifákat CM-mel történő mosás után 10 μM CM-ben oldott CFW-vel inkubáltuk sötétben, szobahőmérsékleten, 10 percig, majd fluoreszcens mikroszkóp alatt vizsgáltuk.

5.5.12 A hNFAP lokalizációja a rá érzékeny sejtekben

5.5.12.1 hNFAP elleni antiszérum termelése

Az immunizálást 8-10 hetes hím Wistar patkányokon végeztük. Az első oltás során *Complete Freund's* adjuvánst (Sigma-Aldrich) használtunk. A *Complete Freund's* adjuváns 1 mg/ml előlt *Mycobacterium tuberculosis*-t tartalmaz. Az adjuvánst és a hNFAP-t (100 μg/állat/kezelés) tartalmazó vizes oldatot (1×PBS) 1:1 arányban összekevertük, majd a patkányok bőre alá oltottuk. Második és harmadik oltás során *M. tuberculosis*-mentes, *Incomplete Freund's* adjuvánst (Sigma-Aldrich) használtunk. A negyedik kezelés során nem használtunk adjuvánst, ehelyett 100-100 μg hNFAP-t oltottunk intraperitoneálisan az állatokba (200-200 μl 1×PBS-ben oldva). A kontroll állatok esetében hNFAP helyett 1×PBS puffert oltottunk az állatok bőre alá. Mindkét csoportban 3-3 állatot kezeltünk. Az oltásokat kéthetente ismételtük. A negyedik oltást követő harmadik napon étterrel elaltattuk az állatokat,

majd szívpunkcióval levettük a teljes vérüket. A vérvételt követő napon lecentrifugáltuk a megalvadt vérmintákat, majd a savót felhasználásig -20°C-on tároltuk.

A hNFAP elleni antiszérum termeltetését Dr. Vizler Csaba és Marton Annamária, a Magyar Tudományos Akadémia Szegedi Biológiai Kutatóközpontjának Biokémia Intézetének munkatársai végezték el.

5.5.12.2 Western blot analízis

A Western-blot analízishez 10 és 100 ng tisztított hNFAP-t poliakrilamid gélen megfuttattunk. A fehérjégre kontrollként 25 µl-t vittünk fel a pPICZαA plazmidot hordozó *P. pastoris* KM71H fermentlevéből. Futtatás után a fehérjéket *Immobilon-P* PVDF membránra blottoltuk (Millipore). A membránt 4 °C-on inkubáltuk 16 órán át TBS/T pufferben oldott anti-NFAP szérummal 1:100 hígításban. Ezt követően steril desztillált vízzel mostuk a membránt háromszor. Mosást követően torma-peroxidázzal konjugáltatott anti-patkány másodlagos ellenanyaggal (1:1000; R&D Systems) inkubáltuk a membránt 1:1000 hígításban 1 órán át. Az immunoreaktív szignálok előhívása *Supersignal West Pico* kemilumineszcens szubsztráttal történt (Thermo Scientific). Az előhívást LI-COR ODYSSEY® Fc (*Dual-mode imaging system* LI-COR Biosciences) készülékkel végeztük el Odyssey v1.2 szoftver használatával.

5.5.12.3 A hNFAP lokalizációjának vizsgálata *A. nidulans*-ban

A hNFAP lokalizációját immunfluoreszcens festés segítségével vizsgáltuk Fischer és Timberlake (1995) módszere alapján. A kitapadt hifákat hordozó fedőlemezt fixáló oldatba helyeztük és szobahőmérsékleten 2 óráig inkubáltuk. Ezután a fedőlemezt négyszer mostuk PEM pufferrel (pH=6,7). A hifák sejt falának emésztése érdekében a fedőlemezt 2 órán keresztül sejt falemésztő oldatban inkubáltuk, majd 30 percre extrakciós oldatba helyeztük. Ezt követően négyszer mostuk TBS/B (pH=8,0) pufferrel és egy órán keresztül inkubáltuk az elsődleges antitesttel, majd TBS/B-vel (pH=8,0) történő mosást követően újabb egy órát inkubáltuk a másodlagos antitesttel. A hNFAP sejtbe jutásának vizsgálatához az immunfluoreszcens festést elvégeztük 5 µg/ml latrunculin B (latB, Sigma-Aldrich) jelenlétében is. Pozitív festési kontrollként egér antiaktint (Sigma-Aldrich) használtunk elsődleges antitestként, amihez TRITC-cel konjugáltatott nyúl anti egér IgG-t (Sigma-Aldrich) használtunk másodlagos antitestként.

5.5.13 *In vitro* antifungális érzékenységvizsgálatok jelátviteli utakban mutáns *A. nidulans* törzsekkel szemben

A hNFAP, a 8-Br-cAMP, a CFW és a koffein antifungális aktivitását jelátviteli utakban mutáns *A. nidulans* törzsekkel szemben mikrodilúciós tesztekben vizsgáltuk 96-lyukú mikrotiter-lemezekben, 620 nm hullámhosszúságú fény abszorbanciájának mérésével *Spectro Star Nano Control* mikrotiterlemez-olvasó készülék (BMG Labtech) segítségével.

A vizsgálathoz az egyes törzsek igényei szerint kiegészített (Bussink és Osmani, 1999; Shimizu és Keller, 2001; Guest és mtsai., 2004; Ronen és mtsai., 2007) MM és CM tápoldatban hígított, különböző koncentrációjú antifungális szereket (hNFAP: 50-200 µg/ml, 8-Br-cAMP: 5 mM, koffein: 10 és 20 mM, CFW: 10, 20 és 100 µg/ml) elegyítettünk szintén 100 µl kiegészített MM vagy CM tápoldatban oldott spóraszuszpenziókkal (10^5 spóra/ml). A kombinációs vizsgálatokhoz különböző koncentrációjú hNFAP-t tartalmazó (50-200 µg/ml), a megfelelő anyagokkal kiegészített MM vagy CM tápoldatban oldott spóraszuszpenziót elegyítettünk 100 µl megfelelő tápoldatban oldott 100 µg/ml CFW-vel, 5 mM 8-Br-cAMP-vel és 20 mM koffeinnel. A mikrotiterlapokat 30 (*A. nidulans* R153, *A. nidulans* *alcA*-PkcA, *A. nidulans* *Actin*-GFP esetében) vagy 37 °C-on (*A. nidulans* FGSC A4, *A. nidulans* GR5, *A. nidulans* RhoA, *A. nidulans* Δ mpkA, *A. nidulans* RKIS1, *A. nidulans* Δ pka, *A. nidulans* FGSC 1035, *A. nidulans* FGSC 116 esetében) inkubáltuk, az abszorbanciát 48 óra után mértük.

Az érzékenységi tesztek három alkalommal ismételtük meg és minden esetben három párhuzamos leoltást használtunk.

5.5.14 Statisztikai analízis

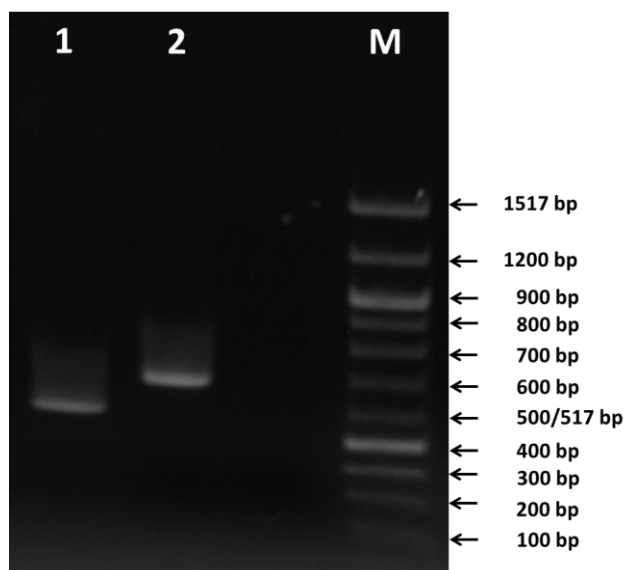
Az adatok statisztikai analízisét *GraphPad Prism* (v 5.01 for Windows, GraphPad Software) programmal végeztük. A szignifikancia megállapításához a variancia *Bonferroni post hoc* tesztjének egyirányú analízisét használtuk.

6. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

6.1 A *Neosartorya fischeri* antifungális protein (NFAP) heterológ expressziója

6.1.1 Az NFAP heterológ termelésére alkalmas expressziós vektor létrehozása és transzformálása *Pichia pastoris* KM71H törzsbe

Az érett NFAP-t kódoló cDNS-t a pPICZ α A expressziós vektorba klónoztuk. Ez a vektor képes integrálódni a *P. pastoris* KM71H genomjába. A vektoron található α -faktor szignálszekvencia lehetővé teszi a fehérje extracelluláris szekréciónak, az alkohol-oxidázt (AOX1) kódoló gén indukálható promotere pedig a fehérje expresszióját metanol jelenlétében. Az *nfap*-t hordozó pPICZ α A vektort (pPICZ α Anfap) elektroporálással transzformáltuk a *P. pastoris* KM71H sejtekbe. A vektor integrálódását a transzformáns *P. pastoris* KM71H genomjának *aox1* génre történő PCR-alapú szűrésével ellenőriztük. A PCR terméke egy 700 bp hosszúságú DNS-fragmentum volt (**7. Ábra**).



7. Ábra A pPICZ α Anfap plazmid integrálódásának igazolása a *P. pastoris* KM71H genomjába: 1: Üres pPICZ α A plazmidot hordozó transzformáns *P. pastoris* genomjából a pPICZ α A vektor 5' és 3' AOX1 indítószekvenciáinak segítségével amplifikált DNS-szakasz. 2: pPICZ α Anfap plazmidot hordozó transzformáns *P. pastoris* genomjából a pPICZ α A vektor 5' és 3' AOX1 indítószekvenciáinak segítségével amplifikált DNS-szakasz M: molekulásúly marker (100 bp DNA Ladder, New England Biolabs).

A PCR-fragmentum nukleotid-sorrendjének meghatározásával igazoltuk az érett NFAP-t kódoló cDNS-t tartalmazó expressziós vektor beépülését a *P. pastoris* KM71H genomjába.

6.1.2 A natív NFAP termelése és tisztítása

A natív NFAP-t a Kovács és mtsai. (2011) által leírt módszerrel termeltettük meg. Kationcserés kromatográfiát követően a fehérje tisztaságát poliakrilamid gélen ellenőriztük (**9. Ábra**). A három párhuzamos fehérjetermelés NFAP-kihozatalának átlaga 978 ± 201 $\mu\text{g/l}$ volt (**4. Táblázat**).

6.1.3 A hNFAP termelése, tisztítása és azonosítása

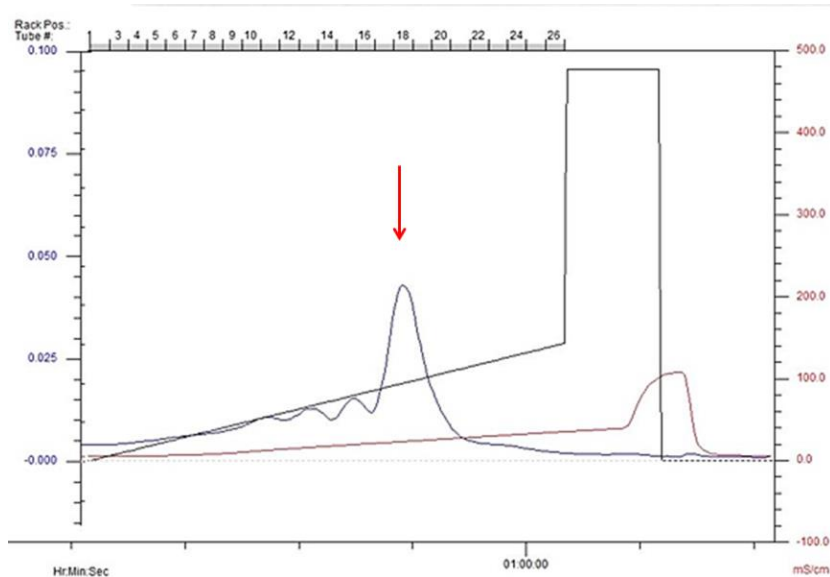
A pPICZ α Anfap vektort hordozó *P. pastoris* KM71H megtermelte a heterológ NFAP-t (hNFAP). A tisztítás után három termelésből származó hNFAP-mennyiségek átlaga 5958 ± 236 $\mu\text{g/l}$ volt, ami közel hatszorosa az eredeti termelő *N. fischeri*-vel NRRL 181-gyel elért fehérjekihozatalnak (**4. Táblázat**).

4. Táblázat A *N. fischeri* NRRL 181 által termelt NFAP hozamának összehasonlítása a *P. pastoris* KM71H által termelt hNFAP mennyiségével.

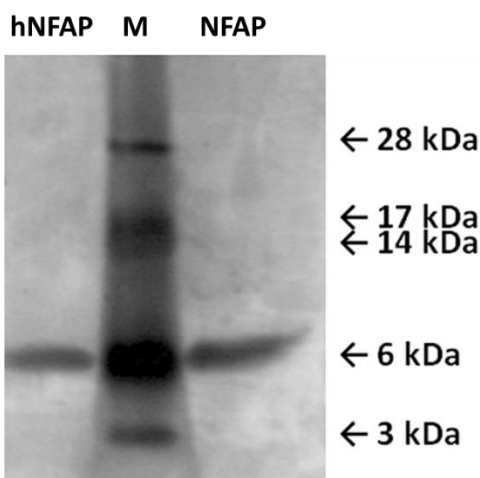
Tisztítás	<i>N. fischeri</i> NRRL 181 által termelt NFAP ($\mu\text{g/l}$)	<i>P. pastoris</i> KM71H által termelt hNFAP ($\mu\text{g/l}$)
1. tisztítás	802	6205
2. tisztítás	1197	5734
3. tisztítás	934	5935
A 3 tisztítás átlaga (\pm SD)	978 ± 201	$5958 \pm 236^{***}$

A *P. pastoris* KM71H által termelt hNFAP kihozatalának szignifikanciaértékét (p-érték) a *N. fischeri* NRRL 181 által termelt NFAP kihozatalának mennyiségéhez viszonyítva határoztuk meg. $^{***}p < 0,0001$. SD: szóráserték.

Az általunk alkalmazott tisztítási módszer alkalmasnak bizonyult a hNFAP homogenitásig történő tisztítására. A kationcserés oszlopkromatográfiából származó frakciók fehérjetartalmát és azok tisztaságát 4-12% *Bis-Tris* poliakrilamid gélen vizsgáltuk. Ezüstoffestés után az ioncserés kromatográfiából származó 4. csúcsot alkotó 17-19. frakciókból (**8. Ábra**) egy-egy körülbelül 6,5 kDa tömegű fehérje jelenlétét mutattuk ki (**9. Ábra**).



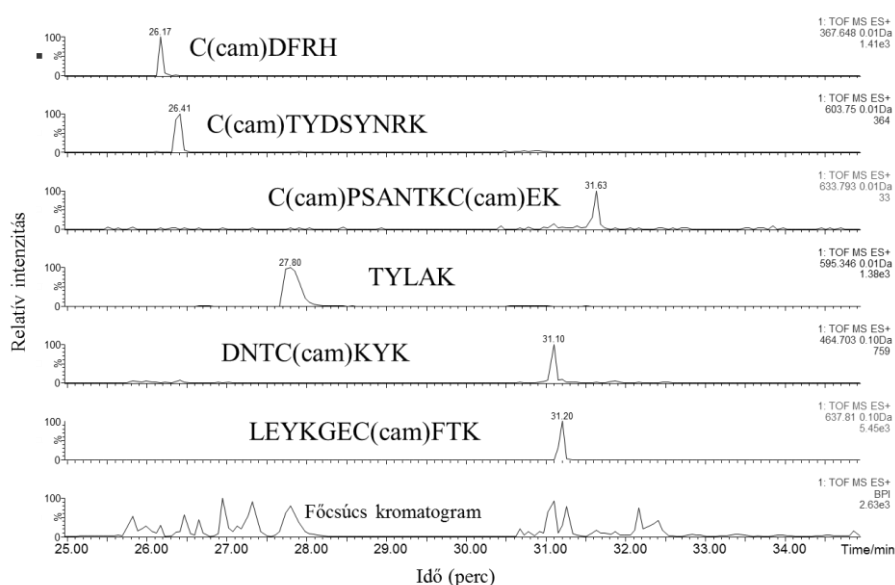
8. Ábra A hNFAP tisztítása Duoflow FPLC készülék (*Duoflow Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) System, Bio-Rad*) segítségével. Kék vonal: UV₂₈₀ abszorpció. Piros vonal: konduktivitás (mS/cm). Piros nyíllal jelöltük a hNFAP-t tartalmazó 17-19. frakciókból származó csúcsot.



9. Ábra A pPICZuAnfap vektort hordozó *P. pastoris* KM71H fermentlevének 3 párhuzamos tisztításából származó egyesített 17-19. frakciók fehérjetartalma SDS-PAGE-en vizsgálva. hNFAP: Három párhuzamos termelés kationcserés kromatográfiás tisztításából származó egyesített hNFAP 17-19. frakció. M: molekulásúly marker (*SeeBluePlus2 Pre-Stained Standard, Invitrogen-Life Technologies*). NFAP: A *Neosartorya fischeri* NRRL 181 fermentlevéből tisztított NFAP.

A hNFAP azonosítását gélkockából történő enzimatis élesztésen alapuló Q-TOF tömegspektrometriás analízissel végeztük el. A tripszines élesztést követően hat

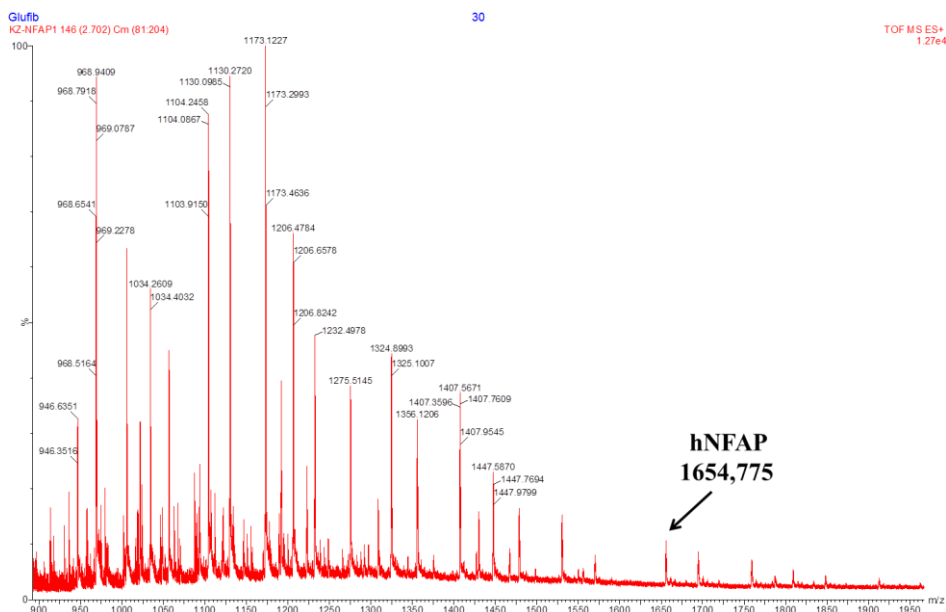
peptidfragmentumot azonosítottunk (**10. Ábra**). Az azonosított fragmentumok az érett NFAP UniProt-ban (UniProt azonosító: D4YWE1) található aminosav-szekvenciájának 89,5%-át lefedték (**11. Ábra**). Két peptidfragmentumot nem sikerült azonosítanunk (DGNK és VK). Ezek vélhetően túl kicsi méretűek, vagy túl polárosak, így ezeket a fragmentumokat nem sikerült detektálnunk az általunk alkalmazott azonosítási módszerrel. Tömegspektrometria segítségével meghatároztuk a hNFAP pontos monoizotópos moláris tömegét (6615,10 Da) (**12. Ábra**), ami azonos az NFAP *in silico* módszerrel meghatározott monoizotópos moláris tömegével.



10. Ábra A hNFAP tripszines emésztéséből származó hat peptidfragmentum tömegspektruma. Az egyes csúcsok mellett a fragmentumok tömege alapján azonosított aminosav-szekvenciák találhatóak. cam: karbamidometil (Ábra: Dr. Kele Zoltán, SZTE, ÁOK, Orvosi Vegytani Intézet.)

LEYKGECFTKDNTCKYKIDGKTYLAKCPSAANTKCEKDGNKCTYDSYNRKVKCDFRH

11. Ábra. A tömegspektrometriával azonosított peptidfragmentumok szekvenciája. Aláhúzással jelöltük a hNFAP emésztéséből származó, azonosított fragmentumok aminosav-szekvenciáit, melyek az érett NFAP aminosav-szekvenciáját 89,5%-ban lefedik (Ábra: Dr. Kele Zoltán, SZTE, ÁOK, Orvosi Vegytani Intézet.)



12. Ábra A hNFAP tömegspektruma 900 és 1950 közötti m/z tartományban. B: A hNFAP tömegspektruma 1655 és 1657 közötti m/z tartományban. A hNFAP monoizotópos tömege 1654,775-nek bizonyult. A hNFAP töltése +4 (pH=7,0). Az eredmények alapján a hNFAP moláris tömege 6615,1 Da (Ábra: Dr. Kele Zoltán, SZTE, ÁOK, Orvosi Vegytani Intézet.)

Annak érdekében, hogy megállapítsuk a plazmidon található, extracelluláris szekréciót biztosító α -faktor szignálszekvencia helyes lehasadását a hNFAP szekréciója során, Edman-féle szekvenálással meghatároztuk a fehérje első öt N-terminális aminosavát (LEYKG), ami megfelelt az NFAP esetében meghatározott első 5 N-terminális aminosavnak (Kovács és mtsai., 2011).

A hNFAP amid régióinak $^1\text{H-NMR}$ jeleloszlásai alapján a *P. pastoris* KM71H által termelt hNFAP a natív NFAP-hoz hasonlóan feltekeredett állapotot vesz fel. A natív NFAP és a hNFAP közötti szerkezetbeli azonosság bebizonyítása további vizsgálatokat igényel. (Az $^1\text{H-NMR}$ vizsgálatokat Prof. Dr. Batta Gyula és Fizil Ádám [DE, TTK, Szerves Kémiai Tanszék] végezték el.)

A fonalgombák által termelt defenzinszerű fehérjék vizsgálatához, valamint gyakorlati alkalmazásukhoz elengedhetetlen a nagy mennyiségben történő előállításuk. Az eredeti termelők csak kis mennyiségben szekretálják ezeket a fehérjéket (Marx, 2004; Meyer 2008), így célszerű azokat egy biztonságos, nagyobb fehérjekihozattal és egyszerűbb tisztítást lehetővé tevő heterológ expressziós rendszerben megtermeltetni. A szakirodalom a mai napig csak az AFP, a PAF, valamint az NFAP heterológ expressziójáról számolt be (Batta és mtsai.,

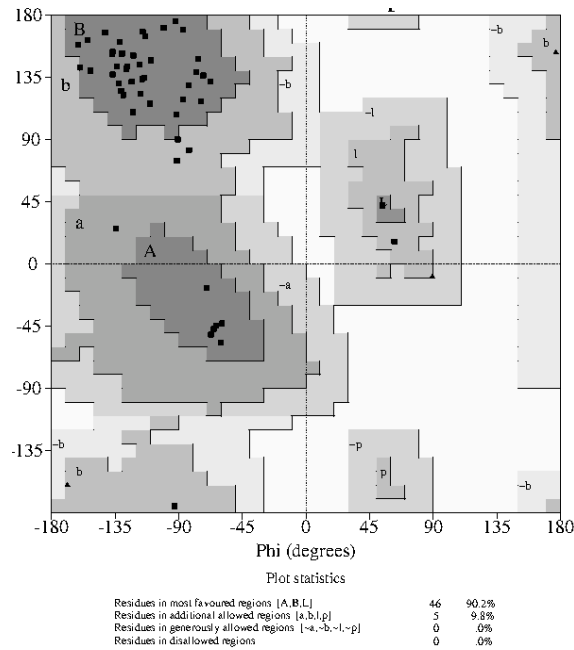
2009; López-Garcia és mtsai., 2010; Galgóczy és mtsai., 2013; Binder és mtsai., 2015). Az AFP-t és a PAF-ot *P. pastoris*-alapú heterológ expressziós rendszerben, míg az NFAP-t *Aspergillus nidulans*-ban termeltették meg. A PAF heterológ expressziós rendszerrel elért fehérjekihozataláról a szakirodalom nem közöl adatokat. Az AFP heterológ expressziójával elérhető maximális fehérjekihozatal 2500 µg/l volt (López-Garcia és mtsai., 2010). Az általunk mért fehérjekihozatal 5978±236 µg/l volt, ami hatszorosa a natív termelővel (*N. fischeri* NRRL 181) általunk elért maximális fehérjekihozatalnak (978±201 µg/l), ötszöröse a Kovács és mtsai. (2011) által elért maximális fehérjekihozatalnak (1250±125 µg/l), és négyszerese az NFAP *A. nidulans*-szal történő heterológ expressziójával elérhető hozamnak (1680±223 µg/l) (Galgóczy és mtsai., 2013). A tömlősgombák által termelt defenzinszerű fehérjék fontos érési folyamatokon mennek keresztül a szekréciójuk során, és mind a szignál- vagy proszekvencia hiánya, mind a helytelen fehérjeérés csökkenti, vagy megszünteti a fehérje aktivitását (Marx és mtsai., 2005; López-Garcia és mtsai., 2010). A 3.3 fejezetben leírt AFP-variánsokhoz hasonló, nem megfelelően érett hNFAP-variánsok megjelenésének elkerülése érdekében az érett NFAP-t kódoló gént a Kex2 és a Ste13 endoproteáz hasítóhelyéhez (Q-K-R) képest *upstream* irányban lévő *XhoI* restrikciós endonukleáz hasítóhelyére klónoztuk a Kex2 endoproteáz hasítóhelyével kiegészítve, így biztosítva a szignálszekvencia megfelelő lehasadását. Az általunk létrehozott heterológ expressziós rendszerben termeltetett hNFAP első öt N-terminális aminosavának meghatározásával meggyőződünk arról, hogy az NFAP heterológ expressziójakor az α-faktor szignálszekvencia megfelelően lehasad és a *P. pastoris* KM71H képes egy 57 aminosav hosszúságú, NFAP-vel megegyező hNFAP megtermelésére. Az így megtermelt fehérje feltekeredett állapotot vesz fel, ami elősegíti a stabilitását (ld. 6.4.3. fejezet).

6.2 Az NFAP/hNFAP szerkezetének vizsgálata *in silico* módszerekkel

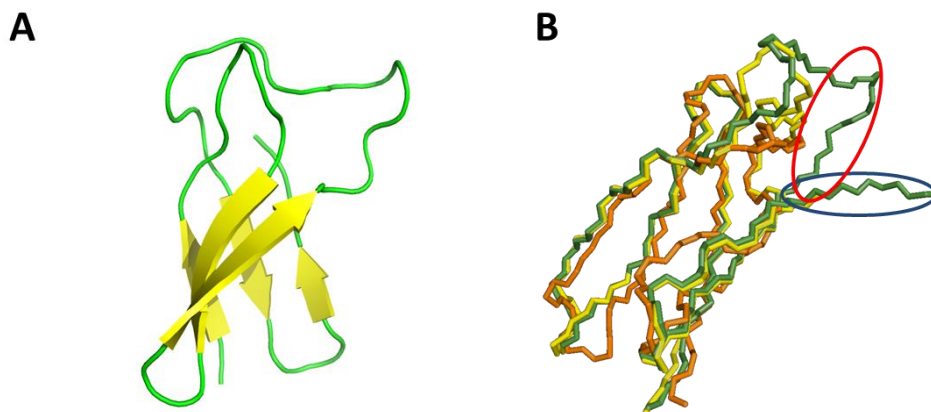
Az NFAP/hNFAP térszerkezetét homológia-modellezéssel jeleztük előre a *MODELLER* 9.1 (Sali és Blundell, 1993) szoftver használatával. Templátként az NFAP aminosav-szekvenciájával 44,5%-os hasonlóságot mutató AFP térszerkezeti modelljét (PDB azonosító: 1 afp) használtuk. Az általunk generált száz modell közül a *Procheck* szoftver (<http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/PROCHECK/>) (Laskowski és mtsai., 1993) segítségével kiválasztottuk a legmegfelelőbbet, amit ezután a *MODELLER loop refine* funkciójával finomítottunk. A végső modell Ramachandran plotján a hNFAP-t alkotó aminosavak 90,2%-a a preferált régiókban található, 9,8%-a pedig a megengedett régióban

(**13. Ábra**). Becsült térszerkezeti képe alapján az NFAP a PAF és az AFP szerkezetéhez hasonló térszerkezettel rendelkezik (**14. Ábra A és B**) (Campos-Olivas és mtsai., 1995; Batta és mtsai., 2009): öt antiparallel lefutású β -redő, melyeket az L1-G5, N12-I18, K21-C27, K41-S46, K50-A54 tartó aminosav-szekvenciaregiók alkotnak, 2 egymásra merőleges ortogonális β -lemezt hoz létre egy β -hordó-szerű szerkezetet kialakítva (**15. Ábra**). A molekula szerkezetét a 7., 14., 27., 35., 42. és 53. pozíciójában található ciszteinek által alkotott 3 diszulfid-híd stabilizálja, melyek mintázatát (*abcabc*) (**15. Ábra**) a DISULFIND szerver (<http://omictools.com/disulfind-s5190.html>) (Ceroni és mtsai., 2006) segítségével határoztuk meg. Az NFAP kompakt N-terminális régióval rendelkezik, amit az első β -redőt létrehozó L1-G5 aminosavrégió alkot. A fehérje tartalmaz továbbá egy nagyméretű belső hurokrégiót (P28-N40) és egy rövid, pozitív töltésű C-terminális farokrégiót (F55-H57). Az NFAP az AFP, a PAF és az AcAFP esetében leírtakhoz hasonlóan (Campos-Olivas és mtsai., 1995.; Batta és mtsai., 2009; Skouri-Gargouri és mtsai., 2009) amfipatikus struktúrát vesz fel, ami felszíni pozitívan töltött régiójának (K10, K34, K37) (**16. Ábra A**), és a mellette elhelyezkedő hidrofób régióknak (Y44, V51) köszönhető (**16. Ábra B**). Az NFAP lizinekből álló, pozitívan töltött felszíni régiójának (**16. Ábra A**) a PAF esetében megfigyeltekhez hasonlóan szerepe lehet a molekula antifungális aktivitásában, ugyanis a PAF esetében igazolták a pozitív töltésű felszíni régió antifungális aktivitásban betöltött szerepét: a 9., 35. és 38. pozícióban lévő lizinek bármelyikének a cseréje jelentősen csökkentette a PAF aktivitását (Batta és mtsai., 2009; Binder és mtsai., 2015). Az NFAP a PAF-hoz és az AFP-hez hasonlóan (Campos-Olivas és mtsai., 1995; Batta és mtsai., 2009) rendelkezik egy központi hidrofób maggal (Y3, I18, Y16, Y23, Y44 által alkotva), amit a PAF és AFP esetében is a konzervált pozícióban lévő Y3, Y16, I18 és T44 aminosavak alkotnak.

Az NFAP előrejelzett szerkezete a következőkben tér el a PAF és az AFP szerkezetétől: az NFAP C-terminális végén rendelkezik egy pozitívan töltött „farokrégióval” (F55-H57), ami az AFP és a PAF esetében hiányzik. A molekula belső hurokrégiójának egy része (T33-D38) kinyúlik a kompakt β -hordó szerkezetből (**14. és 15. Ábra**). Az NFAP nem rendelkezik sem kitin-, sem oligonukleotid/oligoszacharid-kötőhellyel az AFP esetében becsültekkel ellentétben (Meyer, 2008).



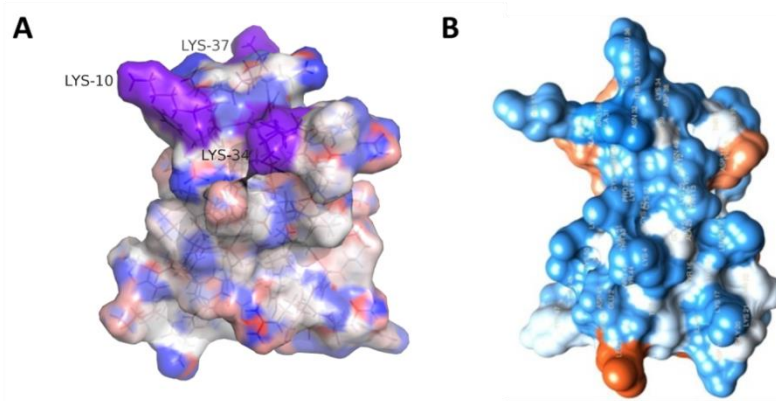
13. Ábra A hNFAP MODELLER szoftver segítségével becsült térszerkezetének Ramachandran plotja. A Ramachandran plot-ot a *Procheck* szoftver (<http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/PROCHECK/>) segítségével készítettük el. A hNFAP-t alkotó aminosavak 90,2%-a a preferált régiókban, 9,8%-a pedig a megengedett régiókban található, míg nem találhatóak aminosavak az általánosan megengedett és a nem megengedett régiókban.



14. Ábra Az NFAP homológia-modellezéssel előrejelzett térszerkezeti képe. **A**, Az NFAP térszerkezeti képe. A β -redőket sárga nyilak jelzik. **B**, Az NFAP, az AFP (PDB azonosító: 1afp) és a PAF (PDB azonosító: 2 kn) szuperpozíciója. Zöld: NFAP, sárga: PAF, narancssárga: AFP. Az NFAP belső hurokrégióját pirossal, a pozitívan töltött C-terminális „farkrégiót” kékkel karikáztuk be. A molekulák vizualizálását a PyMol szoftver (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.7.4 Schrödinger, LLC) segítségével végeztük el. (B. Ábra: Fizil Ádám, DE, TTK, Szerves Kémiai Tanszék).



15. Ábra Az NFAP aminosav-szekvenciája, másodlagos szerkezeti elemei és töltéseloszlása. A diszulfid-hidakat alkotó ciszteinpárokat sárga vonallal kötöttük össze. Sárga nyíllal jelöltük a β -redőket alkotó aminosav-szekvencia-részleteket. A hidrofób régiókat piros vonal, a hidrofil régiókat kék vonal, a hidrofób és hidrofil régiókat pedig narancssárga vonal jelzi. Az egyes régiók töltöttségi értékét a vonalak alatt jelöltük.



16. Ábra Az NFAP elektrosztatikus- és hidrofobicitás-felšíne. **A**, Az NFAP elektrosztatikus felšíne. A molekula felšíni töltéseloszlását a PyMol szoftver segítségével tettük láthatóvá (PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.7.4 Schrödinger, LLC) (<https://www.pymol.org/>). A felšíni pozitívan töltött régiót alkotó lizineket (K10, K34, K37) lilával jelöltük. **B**, Az NFAP hidrofobicitás-felšíne. A molekula hidrofobicitás-felšínét az UCSF Chimera programcsomag (<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/docs/credits.html>, Pettersen és mtsai., 2004) használatával tettük láthatóvá (**A ábra**: Dr. Borics Attila, MTA,SzBK, Biokémiai Intézet).

6.3 Az NFAP és a hNFAP antifungális spektrumának összehasonlítása

Annak igazolására, hogy a heterológ expressziós rendszerből származó hNFAP ugyanolyan mértékben és hatékonysággal képes gátolni az NFAP-re érzékeny fonalgombák növekedését, *in vitro* mikrodilúciós tesztekben összehasonlítottuk az antifungális aktivitásukat. Mindkét protein hatékonyan gátolta nyolc, humán fertőzésből származó fonalgombafaj izolátum növekedését. A két fehérje növekedésre gyakorolt hatásában nem volt szignifikáns különbség (**5. Táblázat**), ami azt jelzi, hogy a *P. pastoris* KM71H képes a hNFAP-t biológiailag aktív formában megtermelni, és hogy a fehérje keresztül megy az antifungális hatás kialakulásának szempontjából szükséges érési folyamatokon.

A nyolc érzékenynek bizonyult fonalgombából hat az *Aspergillus* nemzetség tagja, (*Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus nomius*, *Aspergillus tamarii*, *Aspergillus tubingensis*, *Aspergillus welwitschiae*), míg kettő a *Fusarium* nemzetséghez tartozott (*Fusarium incarnatum*, *Fusarium solani* fajkomplex SZMC 11412). Az *Aspergillus*-ok közül a legérzékenyebbnek az *A. tubingensis* bizonyult, melynek növekedését már 12,5 µg/ml fehérje jelenléte hatékonyan gátolta (**5. Táblázat**). A legerősebb növekedésgátló hatást is az *A. tubingensis* esetében figyeltük meg: 200 µg/ml NFAP és hNFAP 68±5,4%-kal, illetve 79±6,4%-kal gátolta a növekedését. A vizsgálatba bevont *Fusarium* izolátumok mérsékelten érzékenynek bizonyultak az NFAP mindkét formájával szemben, szignifikáns növekedésgátló hatást csak 200 µg/ml NFAP és hNFAP jelenlétében figyeltünk meg (**5. Táblázat**). Az NFAP és a hNFAP 96 óra inkubáció után is kifejtették antifungális hatásukat az érzékeny izolátumokkal szemben. A vizsgált járomspórás gombák (*Absidia corymbifera*, *Rhizomucor miehei*, *Rhizomucor pusillus*, *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis*, *Rhizopus oryzae*), valamint további hat vizsgált tömlősgombafaj (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus terreus*, *F. solani* fajkomplex SZMC 11427, *Fusarium sporotrichioides*, *Trichoderma longibrachiatum* UAMH 7955 és *T. longibrachiatum* UAMH 9515) rezisztensnek bizonyult az NFAP-vel és a hNFAP-vel szemben a vizsgált koncentráció-tartományban.

5. Táblázat Az NFAP-re és hNFAP-re érzékenyek bizonyult fonalas tömlősgombák növekedési százalécai és a hozzájuk tartozó szórásértékek különböző proteinkoncentrációk jelenlétében *in vitro* mikrodilúciós tesztben, 48 óra, 37 °C-on történt inkubáció után.

Fehérjekoncentráció/ izolátum	200 µg/ml		100 µg/ml		50 µg/ml		25 µg/ml		12,5µg/ml		0 µg/ml	
	NFAP	hNFAP	NFAP	hNFAP	NFAP	hNFAP	NFAP	hNFAP	NFAP	hNFAP	NFAP	hNFAP
<i>Aspergillus fumigatus</i> (SZMC 2394)	58±2,9% ^{***}	55±3,2% ^{***}	77±1,8% [*]	74±2,9% ^{**}	82±1,4% [*]	82±1,8% [*]	90±3,4% ^{ns}	94±5,6% ^{ns}	93±2,9% ^{ns}	100%	100%	100%
<i>Aspergillus niger</i> (SZMC 2402)	50±8,0% ^{***}	42±3,4% ^{***}	61±7,0% ^{***}	62±5,8% ^{***}	68±2,1% ^{**}	67±3,3% ^{**}	73±1,5% ^{**}	76±2,3% ^{**}	80±6,4% [*]	83±6,8% ^{nsz}	100%	100%
<i>Aspergillus nomius</i> (SZMC 2441)	46±2,6% ^{***}	47±0,9% ^{***}	65±3,8% ^{**}	67±2,2% ^{**}	75±8,0% [*]	77±4,4% [*]	81±8,7% [*]	83±7,7% ^{nsz}	94±0,4% ^{nsz}	96±2,3% ^{nsz}	100%	100%
<i>Aspergillus tamarii</i> (SZMC 2482)	53±2,8% ^{***}	54±5,4% ^{***}	70±4,6% ^{**}	67±3,6% ^{**}	78±7,0% [*]	79±6,4% [*]	86±4,8% ^{nsz}	84±2,9% ^{ns}	92±0,8% ^{nsz}	98±1,2% ^{nsz}	100%	100%
<i>Aspergillus tubingensis</i> (SZMC 2503)	31±4,6% ^{***}	20±3,6% ^{***}	42±2,6% ^{***}	36±4,3% ^{***}	56±3,5% ^{**}	56±6,3% ^{***}	63±45% ^{**}	67±5,8% ^{**}	76±2,3% ^{**}	76±3,1% ^{**}	100%	100%
<i>Aspergillus welwitschiae</i> (SZMC2390)	53±9,9% ^{***}	47±5,7% ^{***}	62±9,4% ^{**}	67±7,3% ^{**}	74±4,5% ^{**}	75±2,0% ^{**}	84±3,8% ^{ns}	83±1,8% ^{ns}	92±1,6% ^{ns}	100%	100%	100%
<i>Fusarium incarnatum</i> (SZMC 11403)	74±2,2% ^{**}	59±7,9% ^{***}	82±0,7% [*]	83±3,1% [*]	90±1,8% ^{nsz}	93±2,0% ^{nsz}	100%	100%	100%	100%	100%	100%
<i>Fusarium solani</i> fajkomplex (SZMC 11412)	78±4,3% [*]	72±1,2% ^{**}	86±1,9% ^{nsz}	84±4,3% ^{nsz}	92±2,0% ^{nsz}	96±3,7% ^{nsz}	100%	100%	100%	100%	100%	100%

A kezeletlen kontroll (0 µg/ml NFAP) növekedését tekintettük 100%-nak. A zárójelben feltüntetett számok a szórást jelentik (N=3). A szignifikancia-értékeket a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva határoztuk meg. ***p<0,0001, **p<0,005, *p<0,05, ^{nsz}: nem szignifikáns különbség.

Eredményeink összhangban vannak az NFAP-vel korábban elvégzett *in vitro* antifungális érzékenységvizsgálatok eredményeivel, ahol az NFAP hatékonyan gátolta 2 *Aspergillus* faj növekedését, de hatástalannak bizonyult járomspórás gombákkal szemben. Kivételt a *R. miehei* képzett, aminek a natív NFAP kismértékben gátolta a növekedését agardiffúziós lyuktesztben (Kovács és mtsai., 2011). A *R. miehei* érzékenységbeli különbsége valószínűleg az általunk és a Kovács és mtsai. (2011) által alkalmazott vizsgálati módszer különbözőségével magyarázható.

Szakirodalmi adatok alapján a tömlősgombák által termelt defenzinszerű fehérjék antifungális spektruma eltér egymástól, és az egyes fajok különböző fehérjékkel szembeni érzékenysége is különbözik (Marx, 2004; Galgóczy és mtsai., 2005, 2010, 2013; Lee és mtsai., 1999; Geisen és mtsai., 2000; Kaisere és mtsai., 2003; Theis és mtsai., 2003; Skouri-Gargouri és mtsai., 2008; Hajji és mtsai., 2010; Binder és mtsai., 2011). Az NFAP és a hNFAP antifungális spektruma eltér a más fonalas tömlősgombák által termelt defenzinszerű fehérjék antifungális spektrumától. Fontos megjegyeznünk, hogy az AFP, az AnAFP, a PAF és az AcAMP antifungális hatásukat már az NFAP és a hNFAP esetében megfigyelteknél jóval alacsonyabb koncentrációban is kifejtették (Marx, 2004; Galgóczy és mtsai., 2005, 2013; Lee és mtsai., 1999; Geisen és mtsai., 2000; Kaiserer és mtsai., 2003; Theis és mtsai., 2003; Skouri-Gargouri és mtsai., 2008; Hajji és mtsai., 2010; Binder és mtsai., 2011).

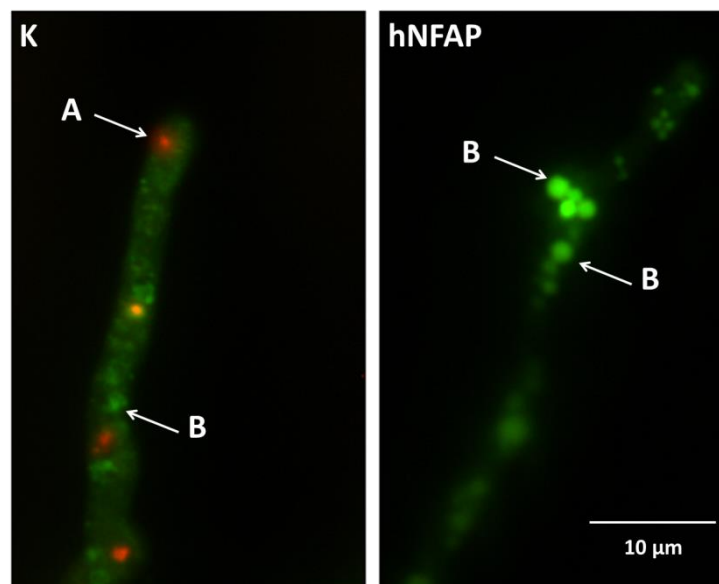
Az NFAP-vel és hNFAP-vel szemben az *Aspergillus* nemzetség tagjai bizonyultak a legérzékenyebbek. Az *Aspergillus* nemzetségbe tartozó humán patogén gombák a leggyakoribb humán kórokozó fonalassgombák. Az invazív aszpergillózis esetek 30-50%-a halállal végződik, és egyre növekszik a konvencionális antifungális szerekekkel szemben rezisztens *Aspergillus* törzsek száma (Denning és Bromley, 2015). Az NFAP hatásmechanizmusának és szerkezetének megismerése után, ígéretes jelöltként jöhet szóba egy *Aspergillus*-ellenes terápia alapjaként. Ezt a feltételezést támasztja alá, hogy az NFAP-hez hasonló PAF-ot sikeresen alkalmazták már *in vivo* egérmodell-kísérletben indukált tüdőaszpergillózis kezelésére (Palicz és mtsai., 2013).

6.4 A hNFAP hatására rövid és hosszú időn belül bekövetkező fenotipikus változások

A natív NFAP korábbi tesztek alapján hatékonyan gátolta az *A. nidulans* növekedését, MIC₅₀ értéke 200 µg/ml (Kovács és mtsai., 2011). A hNFAP előzetes vizsgálataink alapján szintén hatékonyan gátolta az *A. nidulans* FGSC A4 növekedését, ezért a hNFAP hatására rövid és hosszú időn belül bekövetkező fenotipikus változásokat *A. nidulans* FGSC A4 és *A. nidulans* Actin-GFP törzseken vizsgáltuk.

6.4.1 A hNFAP hatása az *A. nidulans* metabolikus aktivitására

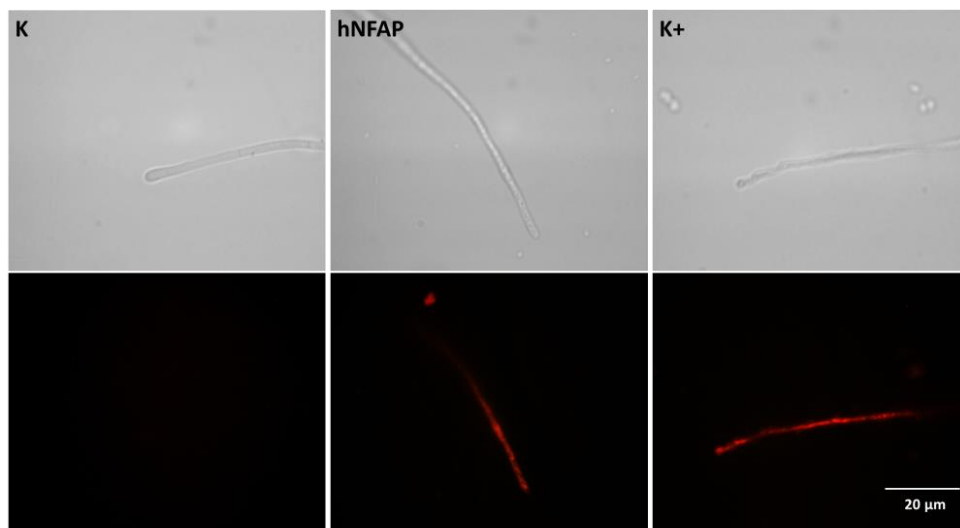
A hNFAP hatását az *A. nidulans* FGSC A4 metabolikus aktivitására *FUN-1* fluoreszcens festékekkel vizsgáltuk. Ez a festék passzív diffúzióval képes bejutni a citoplazmába és ott a metabolikusan aktív vakuólumokat pirosra, míg a metabolikusan inaktívakat zöldre festeni. Harminc perces hNFAP-kezelés (25 µg/ml) után kizárólag zöld vakuólumokat tartalmazó *A. nidulans* FGSC A4 hifákat figyeltünk meg, míg a kezeletlen kontroll esetében piros vakuólumokat is észleltünk. (17. Ábra). Ugyanez a hatás 60 perces és 16 órás hNFAP-kezelés után is megfigyelhető volt.



17. Ábra. Az *A. nidulans* FGSC A4 metabolikus aktivitásának vizsgálata *FUN-1* festéssel 30 perces, 37 °C-on történő hNFAP-kezelés után. K: kezeletlen kontroll, hNFAP: hNFAP-vel (25 µg/ml) kezelt *A. nidulans* FGSC A4 hifa. A piros vakuólumok (A) metabolikusan aktívak, míg a zöldek (B) inaktívak.

6.4.2 A hNFAP hatása az *A. nidulans* membránjának integritására

A hNFAP membránkárosító hatását propídium-jodid (PI) festékkel vizsgáltuk. A PI nem képes áthatolni az intakt sejtmembránon. A membrán integritásának megszűnése után a PI már képes áthatolni a membránon és a DNS-hez kötődve a sejteket pirosra festeni. *A. nidulans* FGSC A4 esetében 30 és 60 percig történő hNFAP-kezelés után nem detektáltunk pirosan festődő sejteket számottevő mértékben, ami arra enged következtetni, hogy a sejtek membránja még 60 perces hNFAP-kezelés után is intakt maradt. 16 órás hNFAP-kezelés után az etanollal kezelt pozitív kontrollhoz hasonlóan szinte kizárólag pirosan festődő sejteket detektáltunk (18. Ábra).



18.Ábra. Az *A. nidulans* FGSC A4 PI-vel történő festése, 16 órás, 37 °C-on történő hNFAP-kezelés után. A piros festődés membránkárosodást jelez. K: kezelt *A. nidulans* FGSC A4 hifa. hNFAP: hNFAP-vel (25 µg/ml) kezelt *A. nidulans* FGSC A4 hifa. K+: pozitív PI-festődési kontroll, *A. nidulans* FGSC A4 hifa 10 perces, 4 °C-on, 70% etanollal történő kezelés után.

6.4.3 A hNFAP-kezelés hatására bekövetkező apoptotikus/nekrotikus események vizsgálata *A. nidulans*-on

Annak érdekében, hogy megállapítsuk, hogy a 16 órás hNFAP kezelés hatására bekövetkező membránintegritás megszűnése apoptózis, és/vagy nekrozis következménye, *Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit*-tel vizsgáltuk az *A. nidulans* FGSC A4 törzsén hNFAP hatására bekövetkező apoptotikus és nekrotikus eseményeket.

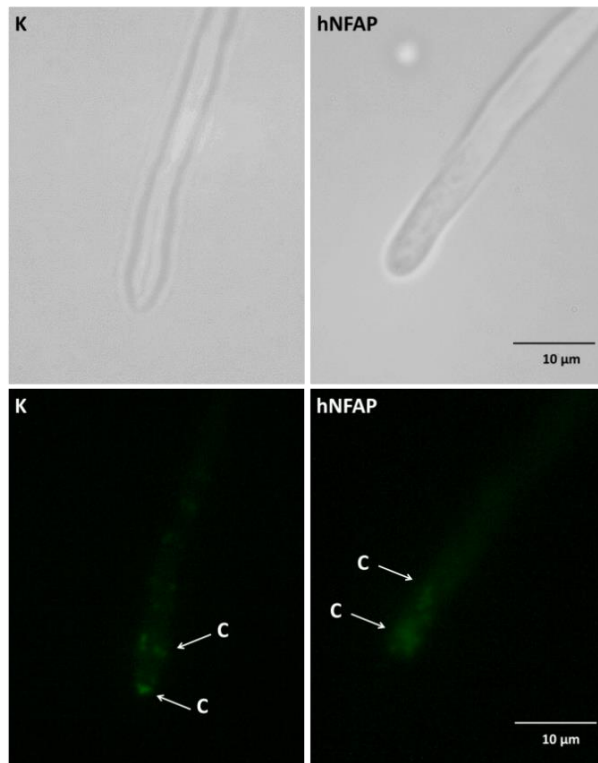
Ez a kit két festéket tartalmaz: a fluoreszcein-izotiocianát (FITC) kromofórral konjugáltatott Annexin V-öt és a PI-t. Az egészséges sejtekben a foszfatidil-szerin a sejtmembrán intracelluláris oldalán található. Az Annexin V-FITC képes az apoptózis korai szakaszában a sejtmembrán extracelluláris felszínére transzlokálódott foszfatidil-szerinhez kötődni és a sejtet zöldre festeni. Az előző fejezetben (6.4.2) említésre került, hogy a PI csak a membrán integritásának megszűnése után képes bejutni a sejtekbe és ott a DNS-hez kötődve azokat pirosra festeni. Húsz-húsz látómezőt vizsgálva számoltuk az apoptotikus (zöld) és a nekrotikus (piros) jeleket mutató csírázó konídiumokat 30 és 60 perces, valamint 16 órás hNFAP-kezelés (25 µg/ml) után. Harminc és hatvan percig történő hNFAP-kezelés hatására szignifikáns növekedés következett be az apoptotikus fenotípust mutató csíratömlők számában (26,1±7,5% és 31,8±8,8%; p<0,0001) a kezeletlen kontrollhoz (3,5±1,2% és 2,2±1,3%) viszonyítva. A hNFAP-vel kezelt csíratömlőknek csak kis hányada mutatott nekrotikus jeleket ugyanezekben az időpontokban (4,8±3,7% - 30 perc és 5,2±0,9% - 60 perc). A kezeletlen kontrollban 30 perc után nem detektáltunk nekrotikus jeleket, míg 60 perc után a nekrotikus jeleket mutató sejtek aránya 6,0±2,3%-nak bizonyult. Tizenhat órás hNFAP-kezelés után azonban közel az összes sejt (98,9±1,1%) pirosan festődött, a sejtek halálát jelezve. A kezeletlen kontrollban a nekrotikus sejtek aránya 5,2±1,9% volt.

Összefoglalva megállapíthatjuk, hogy a hNFAP már rövid időn belül (30 percig történő kezelés) gátolta az *A. nidulans* metabolikus aktivitását és apoptózist indukált. A metabolikus aktivitás megszűnése feltétlenül az apoptózis következménye. Ez az eredmény összeegyeztethető a szakirodalomban már leírt megfigyelésekkel, miszerint az NFAP-t termelő transzformáns *A. nidulans* csírázó konídiumai 8 óráig tartó növesztés után apoptotikus fenotípust mutattak (Galgóczy és mtsai., 2013). A PAF esetében is megfigyelték a fehérje metabolizmus-gátló (Kaiserer és mtsai., 2003) és apoptózis-indukáló hatását (Leiter és mtsai., 2005) *A. nidulans*-ban. A hNFAP közvetlenül nem károsította az *A. nidulans* FGSC A4 hifák membránintegritását, a 16 óráig történő hNFAP-kezelés következtében létrejövő membránintegritás-megszűnés valószínűleg a hosszú időn belül bekövetkező sejthalál eredménye. Ezzel szemben az NFAP-rokon AFP esetében kimutatták, hogy a fehérje rövid időn belül, közvetlenül képes megszünteti az *A. niger* membránjának integritását (Theis és mtsai., 2003). Megfigyeléseink alapján megállapítottuk, hogy a hNFAP antifungális hatásmódja inkább a PAF-éhoz állhat közelebb, mint az AFP-jéhez.

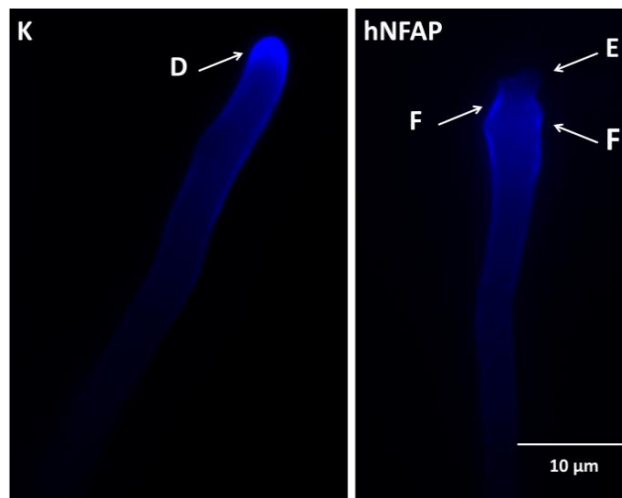
6.4.4 A hNFAP hatása az aktin eloszlására és a kitin elhelyezkedésére *A. nidulans* hifában

Az NFAP-t termelő transzformáns *A. nidulans* CS2902 törzsek csírázó konídiumai esetében 12 és 24 órás inkubációt követően már korábban megfigyelték a fejlődő hifák sejtfalának deformálódását és a kitinfilamentumok sérült, szórt elrendeződését a hifavégeken (Galgóczy és mtsai., 2013). Ezek a jelenségek a sejtfal kiépülésének a zavarát jelzik. Az aktinhálózat szerkezete és dinamikája nagymértékben befolyásolja a gomba sejtfalának kiépülését és ezáltal a polarizált növekedést (Torralba és mtsai., 1998). A hNFAP hatását az *A. nidulans* aktinmintázatára zöld fluoreszcens proteinnel (GFP) konjugáltatott aktint expresszáló *A. nidulans* törzsön (*A. nidulans* Actin-GFP) vizsgáltuk. Egészséges *A. nidulans* hifákban az aktin filamentumok az apikális régióban, a hifacsúctól mintegy 1-2 μm -re, gyűrű alakban helyezkednek el, valamint megfigyelhető egy „aktin-folt” a hifa csúcsán is (Taheri-Talesh, 2008). A kezeletlen kontroll esetében mi is hasonló mintázatot figyeltünk meg (**19. Ábra A**). Már 30 perces hNFAP-kezelés (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) hatására rendezetlen aktin-mintázat megjelenését észleltük a hifákban (**19. Ábra A**). Mivel az aktin filamentumok megfelelő szerkezete elengedhetetlen a kitin sejtfalba történő beépüléséhez, *Calcofluor white* (CFW) festéssel vizsgáltuk az *A. nidulans* FGSC A4 hifavégeinek kitinmintázatát. Egészséges sejtekben a kitin sapkaszzerűen helyezkedik el a hifák apikális régiójában, mint azt mi is megfigyeltük a kezeletlen kontroll esetében (**19. Ábra B**). Harminc perces hNFAP-kezelés hatására viszont a kitinmintázat megváltozik, a sapkaszzerű struktúra megszűnik és a kitin a duzzadt hifavégék szubapikális régiójában lokalizálódik (**19. Ábra B**). Ezek az eredményeink jelzik, hogy a hNFAP már viszonylag rövid időn belül megváltoztatja az egészséges hifákban megfigyelhető aktineloszlást és kitinmintázatot, ami hatással van a sejtfal megfelelő kiépülésére.

A,



B,

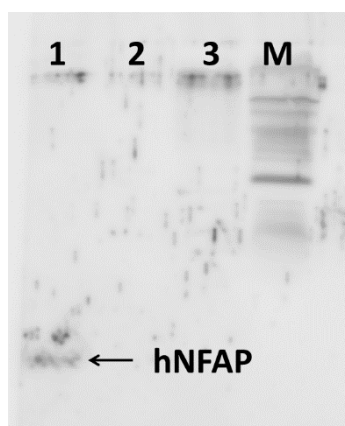


19. Ábra A, Az *A. nidulans* Actin-GFP törzs aktinmintázata 30 perces, 30 °C-on történő hNFAP-kezelés után. K: kezeletlen *A. nidulans* Actin-GFP hifa. hNFAP: hNFAP-vel (25 μg/ml) kezelt *A. nidulans* Actin-GFP hifa. A: aktin-foltok. A felső képek fénymikroszkópos, az alsó képek fluoreszcens mikroszkópos fevételek. **B, A. nidulans FGSC A4 CFW-tal történő festése 30 perces, 37 °C-on történő hNFAP-kezelést követően.** K: kezeletlen kontroll *A. nidulans* FGSC A4. hNFAP: hNFAP-vel (25 μg/ml) *A. nidulans* FGSC A4. B: „sapkaszerű” kitinelrendeződés. C: a „sapkaszerű” kitinelrendeződés hiánya. D: a megduzzadt hifavégék szubapikális régiójában lokalizálódó kitin.

A hNFAP-nek az *A. nidulans* aktin- és kitinmintázatára gyakorolt hatásának vizsgálata során kapott eredményeinkhez hasonlóan a PAF esetében is igazolták már, hogy a fehérje megváltoztatja az *A. nidulans* aktinmintázatát és csökkenti a sejtfalet tartalmazó kitin tartalmát, valamint zavarja a kitin sejtfaletban való megfelelő lokalizációját (Binder és mtsai., 2010b). Az *A. nidulans* polarizált növekedése során a sejtfalet-prekurzorokat és a sejtfalet-bioszintézisért felelős enzimeket tartalmazó szekretórikus vezikulákat kinezinek szállítják a mikrotubulusokon, melyekről közvetlenül, vagy miozin segítségével a hifa apikális régiójában felhalmozódó aktin filamentumokra kerülnek, és a tartalmuk kiürül (Taheri-Talesh és mtsai., 2008). Az aktin a sejtfaletkiépülés és a polarizált növekedés folyamatának egyik kulcsfontosságú eleme és szerepe van a polarizált növekedést biztosító rendszer összetartásában, továbbá a sejtfaletkiépüléséhez szükséges prekurzorok és enzimek szállításában. A korábban már jól leírt, az érzékeny gombák hifáiban az NFAP hatására bekövetkező morfológiai változások, úgymint a többszörösen elágazó hifák, a duzzadt hifavégek (Kovács és mtsai., 2011; Galgóczy és mtsai., 2013) valószínűleg a megváltozott aktinrendeződés és kitinelhelyezkedés következményei.

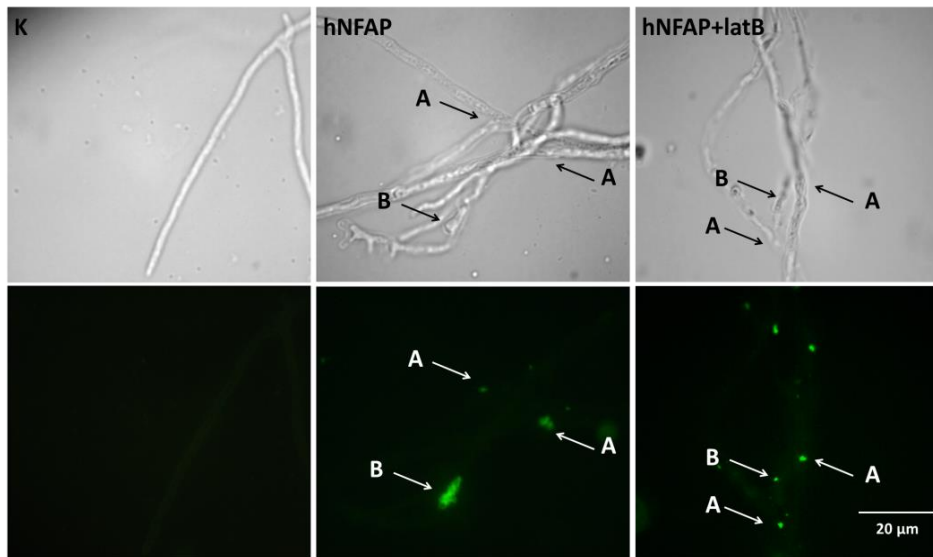
6.4.5 A hNFAP lokalizációja *A. nidulans* FGSC A4 sejtekben

A hNFAP *A. nidulans* FGSC A4-ben való lokalizációját immunfluoreszcens festéssel vizsgáltuk, amihez poliklonális hNFAP elleni antiszérumot termeltettünk hím Wistar patkányokkal. Western blot-tal ellenőriztük a hNFAP-re specifikus antitest jelenlétét a vérérszérumban. A 3. patkányból származó hNFAP-antiszérum specifikusan reagált az hNFAP-vel, míg a nem immunizált állatból származó vérérszérum esetében nem detektáltunk hNFAP-re specifikus jelet (**20. Ábra**).

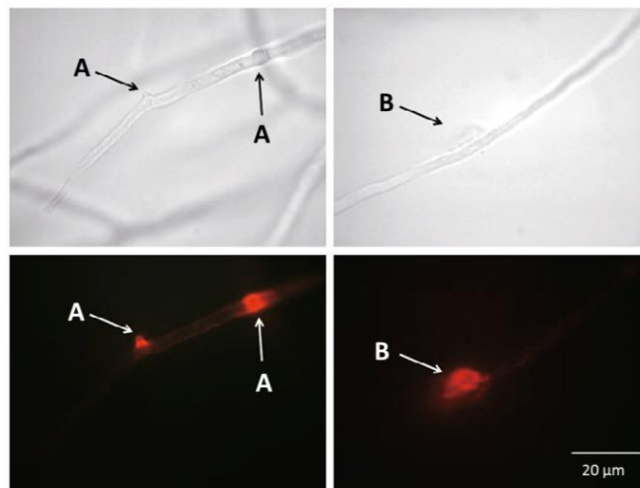


20. Ábra. A hNFAP elleni poliklonális antiszérum Western-blot analízise. 1: 100 ng hNFAP, 2: 10 ng hNFAP, 3: Üres pPICZ α A plazmidot hordozó *P. pastoris* KM71H fermentleve. M: molekulásúly marker (*ProSieve QuadColor Protein Marker*, Lonza).

A hNFAP lokalizációját indirekt immunfluoreszcens festési eljárással vizsgáltuk. Harminc és hatvan perces, 37 °C-on történő hNFAP-kezelés (25 μ g/ml) után nem tudtuk kimutatni a fehérjét *A. nidulans* FGSC A4 hifákban (**21. Ábra**). Tizenhat órás hNFAP-kezelés után azonban hNFAP-specifikus fluoreszcens jeleket észleltünk a hifák törési pontjainál és a sejtfal kitüremkedéseiben (**21. Ábra**). Annak érdekében, hogy megállapítsuk, hogy a fehérje aktív endocitotikus folyamat során, vagy a sejtfal és a membrán sérülésein át történő passzív diffúzióval jut be a hifába, az indirekt immunfluoreszcens festést megismételtük latrunculin B (latB) jelenlétében is. A latB specifikusan gátolja az aktin-polimerizációt, így megakadályozza az endocitotikus folyamatokat. Tizenhat órás hNFAP-kezelés után latB jelenlétében is detektáltunk hNFAP-specifikus jeleket a hifákban (**21. Ábra**), amiből arra következtethetünk, hogy a protein passzív diffúzióval jut be a hifákba, annak sérülésein keresztül. PI festéssel igazoltuk, hogy a sérülési helyeknél (töréspontok és sejtfallakitüremkedések) 90 perces hNFAP-kezelés után a membránintegritás megszűnik, így ezeken keresztül képes a hNFAP a hifába bejutni (**22. Ábra**).



21. Ábra *A. nidulans* FGSC A4 indirekt immunfluoreszcens festése patkányban termeltetett hNFAP elleni poliklonális antiszérummal és kecske által termelt anti patkány IgG-vel 37 °C-on történő 16 órás hNFAP-kezelés után. K: kontroll - kezeletlen *A. nidulans* FGSC A4 hifa. hNFAP: hNFAP-vel (25 µg/ml) kezelt *A. nidulans* FGSC A4 hifák. A: hifatörési pontok. B: sejtfolkítüremkedések. NFAP+latB: hNFAP-vel (25 µg/ml) és latB-vel (5µg/ml) kezelt *A. nidulans* FGSC A4 hifák.



22. Ábra *A. nidulans* FGSC A4 hifák propídium-jodiddal történő festése 37°C-on történő 90 perces hNFAP-kezelés után. A piros fluoreszcencia a sejtfolkítüremkedéseknél (A) és a hifa törési pontjainál (B) a membránkárosodást és az ennek következtében létrejövő citoplazma kifolyását jelzik.

A hNFAP passzív diffúziójával ellentétben a PAF és az AFP_{NN5353} aktív módon, feltételezhetően receptormediált endocitózissal jut be az *A. nidulans* hifákba (Oberparleiter és

mtsai., 2003; Binder és mtsai., 2011). PAF esetében immunfluoreszcens festéssel megfigyelték, hogy a fehérje már 15 perc után bejut a sejtekbe és a citoplazmában lokalizálódik. A fehérje aktív transzporttal történő sejtbe jutását latB (5-50 µg/ml) jelenlétében végzett immunfluoreszcens festéssel igazolták: PAF-kezelés után, 50 µg/ml latB jelenlétében nem detektáltak PAF-specifikus jeleket *A. nidulans*-ban (Oberparleiter és mtsai., 2003). Hasonló jelenséget figyeltek meg az AFP_{NN5353} esetében is (Binder és mtsai., 2011). Ezzel szemben az AFP_{NN5353}-mal közeli rokon AFP esetében *A. niger*-ben *immunogold*-jelölt fehérje és transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálatok segítségével megállapították, hogy az AFP nagyobb hányada az érzékeny sejtek sejtfalának külső rétegében, a kisebb hányada pedig a sejtmembrán extracelluláris oldalán, míg az AFP-re nem érzékeny sejtekben intracellulárisan lokalizálódik (Theis és mtsai., 2005).

A hNFAP hatására rövid és hosszú időn belül létrejövő fenotipikus változásokat és a hNFAP lokalizációjának vizsgálata során tapasztaltakat a **6. Táblázat** foglalja össze.

6. Táblázat A hNFAP hatására rövid (30 és 60 perc) és hosszú (16 óra) időn belül létrejövő fenotipikus változások.

Festési módszer	Idő			Vizsgált változás
	30 perc	60 perc	16 óra	
Aktin-GFP	✓	✓	✓	Az aktinmintázat megváltozása a hifavégeken.
<i>Calcofluor white</i>	✓	✓	✓	Csökkent kitintartalom és megváltozott kitinelrendeződés.
FUN-1	✓	✓	✓	Csökkent metabolikus aktivitás.
Propídium-jodid	✗	✗	✓	Membrán-permeabilizáció.
Annexin V-FITC/PI	✓	✓	✗	Apoptotikus markerek megjelenése.
Annexin V-FITC/PI	✗	✗	✓	Nekrotikus markerek megjelenése.
Immunfluoreszcens festés	✗	✗	✓	hNFAP felhalmozódása a sejtalkitüremkedéseknél és a hifák törési pontjainál.

GFP: *green fluorescent protein* (zöld fluoreszcens protein), PI: propídium-jodid, FITC: fluoreszcein-izotiocianát.

Elképzelhetőnek tartjuk, hogy a hNFAP nem detektálható koncentrációban bejut a hifákba, ami már elegendő ahhoz, hogy intracelluláris célpontokkal kölcsönhatva megváltoztassa az aktin filamentumok és a kitin elrendeződését, ahogyan azt a **6.3.4** fejezetben leírtuk. Korábbi szakirodalmi adatok alapján feltételezzük, hogy a megfigyelt változások nem a hNFAP közvetlen hatásának a következményei (Leiter és mtsai., 2005; Hagen és mtsai., 2007; Binder és mtsai., 2010a, 2011) és mivel a hNFAP nem rendelkezik az AFP-re jellemző kitin-kötő doménnel (Hagen és mtsai., 2007), nem is a kitin-szintáz specifikus gátlása révén valósul meg. A hNFAP egy sejtfelszíni receptorhoz kötődve aktiválhat vagy gátolhat eltérő szignalizációs útvonalakat, melyek apoptózishoz és a polarizált növekedés megzavarásához vezetnek.

6.5 A hNFAP hatásmechanizmusának vizsgálata

A hNFAP hatásmechanizmusára különböző fluoreszcens festési eljárások és *in vitro* mikrodilúciós teszt alkalmazásával következtettünk. Vizsgálatainkba az *A. nidulans* FGSC A4 törzset és különböző, jelátviteli utakban mutáns *A. nidulans* törzseket vontunk be.

6.5.1 A hNFAP heterotrimer G-protein-kapcsolt jelátviteli útvonalon keresztül aktiválja a cAMP/Pka szignáltranszdukciós útvonalat

Az *A. nidulans* FGSC 1035 törzse egy domináns negatív mutációt hordoz a FadA heterotrimer G-protein guanidin nukleotid-kötő doménjében (*fadA*^{G203R}). A mutáció következtében a heterotrimer G-protein α -alegysége (G_{α}) nem képes disszociálni a $\beta\gamma$ ($G_{\beta\gamma}$) alegységről, ennek következtében az általa aktivált szignalizációs útvonal konstitutívan inaktív állapotban van. *In vitro* mikrodilúciós tesztünkben az *A. nidulans* FGSC 1035 kevésbé bizonyult érzékenynek a hNFAP-vel szemben, mint az FGSC 116 szülői törzse (**7. Táblázat**). Ez alapján arra következtettünk, hogy a hNFAP antifungális hatásának kiváltásához szükséges a FadA heterotrimer G-protein kapcsolt szignalizációs útvonal.

Korábbi tanulmányok kimutatták, hogy az *A. nidulans*-ban a cAMP/protein kináz A (PkaA) útvonal szerepet játszik a vegetatív növekedés és a csírázás szabályozásában (Shimizu és Keller, 2001) és az apoptózis indukciójában (Semighini és mtsai., 2006). A cAMP/PkaA útvonal szabályozása heterotrimer G-protein-kapcsolt szignalizációs útvonalon keresztül valósul meg. Annak érdekében, hogy kiderítsük, hogy a hNFAP antifungális hatásában szerepe van-e a G-protein aktiválta cAMP/PkaA útvonalnak, megvizsgáltuk egy *pkaA* deléciós ($\Delta pkaA$) *A. nidulans* törzs érzékenységét különböző koncentrációjú hNFAP-vel

szemben. Az *A. nidulans* $\Delta pkaA$ kevésbé bizonyult érzékenynek a hNFAP-vel szemben, mint a szülői RKIS1 törzs (**7. Táblázat**). Ebből arra következtetünk, hogy a hNFAP egy feltételezhetően G-protein-kapcsolt jelátviteli útvonalon keresztül aktiválja a cAMP/PkaA szignalizációs kaszkádot és azon keresztül apoptózist indukál (Semighini és mtsai., 2006), továbbá gátolja az aktin filamentumok megfelelő összerendeződését a hifa növekvő, csúcsi részén (Shimizu és Keller, 2001; Bencina és mtsai., 2005) (**15. Ábra**).

Ezt az utóbbi feltételezésünket megerősítettük *A. nidulans* FGSC A4 törzsön elvégzett szerkombinációs kísérletekkel. Az *in vitro* érzékenységi tesztben ilyenkor a hNFAP-t eltérő koncentrációjú 8-bromoadenozin 3',5'-ciklikus monofoszfáttal (8-Br-cAMP), és koffeinnel kombináltuk (**8. Táblázat**). A 8-Br-cAMP a cAMP/PkaA útvonal aktivátora (Gorovits és Yarden 2003), míg a koffein a cAMP szintjének csökkentésével represszálja a PkaA szignalizációt (Kuranda és mtsai., 2006). Öt mM 8-Br-cAMP jelenlétében a hNFAP nagyobb mértékben gátolta az *A. nidulans* FGSC A4 növekedését, mint amikor a hNFAP-t önmagában alkalmaztuk, ezzel jelezve a két szer között fellépő szinergista kölcsönhatást (**8. Táblázat**). Ezzel a megfigyeléssel ellentétben 20 mM koffein jelenlétében az *A. nidulans* FGSC A4 rezisztensebbnek bizonyult hNFAP-vel szemben, mint amikor a proteint önmagában adtuk a kísérleti rendszerhez (**8. Táblázat**). Az *A. nidulans* $\Delta pkaA$ a szülői törzshöz (RKIS1) viszonyítva hiperszenzitívnek bizonyult a koffeinnel szemben, viszont a hNFAP és a 20mM koffein kombinációjának jelenlétében erőteljesebb növekedést mutatott, mint a kezeletlen kontroll (**8. Táblázat**). A jelenség hátterében feltételezhetően az áll, hogy az eltérő célponttal rendelkező sejtfal-stresszorok hatására a gombában a sejtfal integritásának megőrzésére irányuló stresszválaszok indukálódnak (Ouedraogo és mtsai., 2011). Eredményeink alapján feltételezhető, hogy a hNFAP és a koffein ellentétes módon hatnak a cAMP/PkaA szignalizációs útvonalra.

7. Táblázat. A vizsgált *A. nidulans* törzsek növekedése *in vitro* mikrodilúciós tesztekben különböző koncentrációjú hNFAP jelenlétében 48 óra 30 (*alcA*-PkcA, R153) vagy 37 °C-on történt inkubáció után.

hNFAP konc./ törzs	200 µg/ml	100 µg/ml	50 µg/ml	Típus
RhoA ^{G14V}	48±15,2% ^{nsz}	57±4,5% ^{nsz}	86±15,5% ^{nsz}	mutáns
<i>AmpkA</i>	108±9,1% ^{***}	105±6,7% ^{***}	103±0,9% ^{nsz}	mutáns
GR5	47±7,5%	58±5,4 %	83±11,9%	a Rho ^{G14V} és a <i>AmpkA</i> szülői törzse
<i>alcA</i> -pkcA ^a	48±10,6% ^{***}	57±0,6%	64±12,5% ^{***}	mutáns
<i>alcA</i> -pkcA ^b	74±7,6% ^{nsz}	77±0,5% ^{nsz}	99±0,2% ^{nsz}	mutáns
R153	72±2,8%	83±4,4%	102±1,8%	az <i>alcA</i> -PkcA szülői törzse
<i>ΔpkaA</i>	56±6,1% ^{***}	69±5,3% ^{***}	83±11,5% ^{**}	mutáns
RKIS1	40±2,7%	48±1,6%	66±4,0%	a <i>ΔpkaA</i> szülői törzse
FGSC 1035	52±1,9% [*]	78±0,2% ^{***}	101±0,4% ^{***}	mutáns
FGSC 116	42±6,7%	59±1,9%	75±2,3%	az FGSC 1035 szülői törzse

A kezeletlen kontroll törzs növekedését tekintettük 100%-nak. Az egyes cellákban a kontrollhoz viszonyított növekedési százalékokat és a hozzájuk tartozó szórás-értékeket tüntettük fel. A szignifikancia-értékeket (p-érték) a kezeletlen kontrollokhoz viszonyítva határoztuk meg. ***: p<0.0001, **: p<0.005, *: p<0.05, ^{nsz}: nem szignifikáns különbség. a: *A. nidulans alcA*-pkcA glükóz jelenlétében. b: *A. nidulans alcA*-PkcA glicerol jelenlétében.

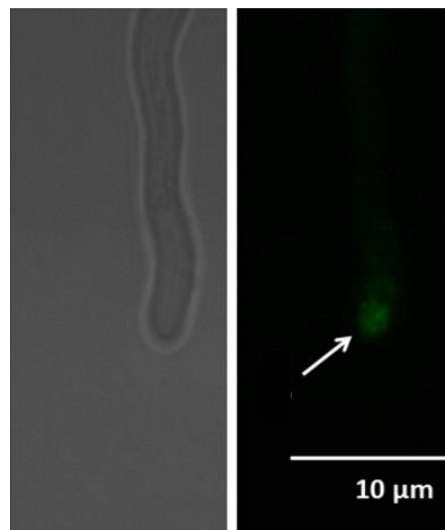
8. Táblázat *A. nidulans* FGSC A4 és *ΔpkaA* törzsek érzékenysége különböző koncentrációjú hNFAP és hNFAP - 5 mM 8-Br-cAMP/20 mM koffein kombinációk jelenlétében 48 óráig 37 °C-on történt inkubáció után.

hNFAP / egyéb hatóanyagok	0 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml	200 µg/ml
FGSC A4				
NFAP	100%	91±6,0%	67±6,7%	52±3,2%
NFAP + 5 mM 8-Br-cAMP	70±1,6%	58±4,2% ^{***}	57±3,8% ^{***}	41±3,2% ^{***}
NFAP + 20 mM koffein	71±2,1%	74±3,7% ^{nsz}	61±2,6% ^{***}	108±1,5% ^{***}
<i>ΔpkaA</i>				
NFAP	100%	83±11,5%	69±5,3%	56±6,1%
NFAP + 20 mM koffein	63±6,5%	123±7,9% ^{***}	195±30,6% ^{***}	196±3,0% ^{***}

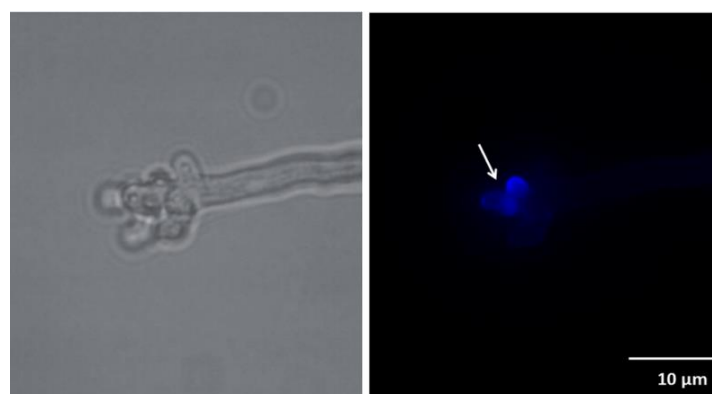
A kezeletlen kontroll törzs növekedését tekintettük 100%-nak. Az egyes cellákban a kontrollhoz viszonyított növekedési százalékokat és a hozzájuk tartozó szórás-értékeket tüntettük fel. A szignifikancia-értékeket (p-érték) a kezeletlen kontrollokhoz viszonyítva határoztuk meg. ***: p<0.0001, **: p<0.005, *: p<0.05, ^{nsz}: nem szignifikáns különbség

Fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk a 8-Br-cAMP hatását az *A. nidulans* Actin-GFP törzs aktin filamentumainak az elhelyezkedésére és az *A. nidulans* FGSC A4 hifáinak

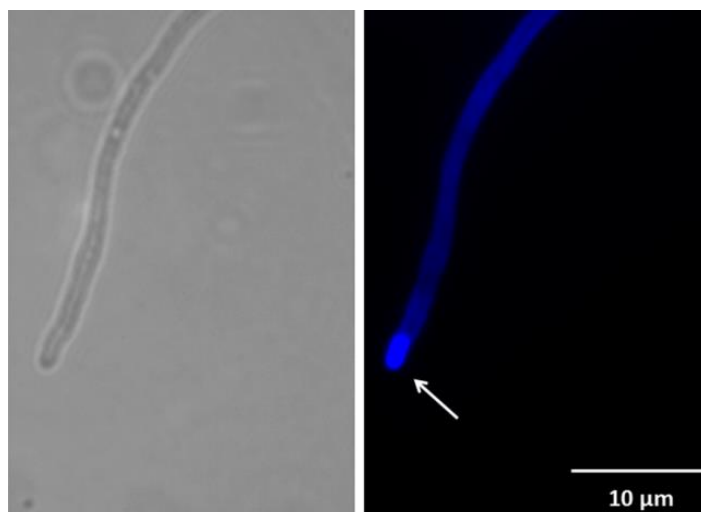
kitineloszlására. A 8-Br-cAMP hatására a hNFAP-hez hasonló módon az *A. nidulans* Actin-GFP törzsben megváltozott aktin filamentum-mintázatot (**23. Ábra**) az *A. nidulans* FGSC A4 törzsben CFW-vel történő festéssel pedig megváltozott kitineloszlást (**24. Ábra**) figyeltünk meg. Ezzel ellentétben, hasonló kísérletek során nem észleltünk semmiféle változást a hNFAP-vel szemben rezisztensnek mutakozó *A. nidulans* $\Delta pkaA$ (**25. Ábra**) és FadA^{G203R} hifáinak kitin-lokalizációjában (**26. Ábra**).



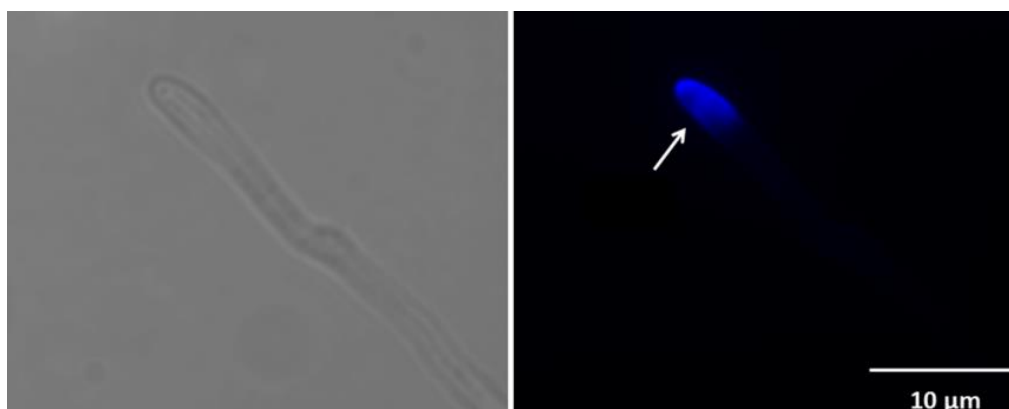
23. Ábra Az *A. nidulans* Actin-GFP hifa 60 percig, 37 °C-on történő 8-Br-cAMP-kezelés után. A nyíl a hifa apikális régiójában megjelenő rendezetlen aktinmintázatot jelzi. A bal oldali kép fénymikroszkópos, a jobb oldali fluoreszcens mikroszkópos felvétel.



24. Ábra Az *A. nidulans* FGSC A4 CFW festése 60 percig, 37 °C-on történő 8-Br-cAMP-kezelés után. A nyíl a kitinfilamentumok megváltozott elrendeződését jelzi. A bal oldali kép fénymikroszkópos, a jobb oldali kép fluoreszcens mikroszkópos felvétel.



25. Ábra Az *A. nidulans* $\Delta pkaA$ törzsének CFW festése 60 percig, 37 °C-on történő hNFAP-kezelés után. A nyíl a kitinfilamentumok megváltozott elrendeződését jelzi. A bal oldali kép fénymikroszkópos, a jobb oldali kép fluoreszcens mikroszkópos felvétel.



26. Ábra Az *A. nidulans* FGSC 1035 törzsének CFW festése 60 percig, 37 °C-on történő hNFAP-kezelés után. A nyíl a kitinfilamentumok megváltozott elrendeződését jelzi. A bal oldali kép fénymikroszkópos, a jobb oldali kép fluoreszcens mikroszkópos felvétel.

6.5.2 A hNFAP egy sejtfalintegritás-útvonaltól független, mitogén által aktivált protein kináz A célponton keresztül is kifejti antifungális hatását

A RhoA GTP-áz fehérje az *A. nidulans*-ban fontos szerepet játszik a polarizált növekedés fenntartásában és a sejtfalbioszintézis szabályozásában (Guest és mtsai., 2004). Az *A. nidulans* RhoA^{G14V} mutáns törzsben a RhoA által szabályozott szignalizációs útvonal konstitutívan aktív. Az *A. nidulans* RhoA^{G14V} ugyanolyan mértékben bizonyult érzékenynek hNFAP-vel és CFW-vel szemben, mint a szülői, GR5 törzs, ugyanakkor érzékenyebbnek

bizonyult koffeinnel szemben (**7. és 8. Táblázat**), ami alapján feltételezhetjük, hogy a RhoA közvetlenül nem játszik szerepet a hNFAP toxicitásában. A hNFAP feltehetően a RhoA valamelyik célpontjának aktiválása/represszálása révén fejti ki a hatását. Ilyen célpont lehet a protein kináz C (Pkc), ami fontos szerepet játszik az apoptózis szupressziójában a mitogén-aktivált protein kináz (Mpk) kaszkád aktiválása révén. Az *A. nidulans*-ban a Pkc az Mpk-útvonaltól függetlenül a polarizált növekedés szabályzásában is szerepet játszik (Katayama és mtsai., 2012). A Pkc/Mpk szignalizációs útvonal szerepét a hNFAP antifungális hatásmechanizmusában az *A. nidulans alcA-PkcA* és *ΔmpkA* mutánsok hNFAP-vel szembeni érzékenységeivel vizsgáltuk. Az *alcA-PkcA* mutáns törzsben a Pkc/Mpk útvonalat a glükóz represszálja, míg a glicerol aktiválja (Ronen és mtsai., 2007). Az *A. nidulans alcA-PkcA* esetében glükóz jelenlétében nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget ($p > 0,05$) a különböző koncentrációjú hNFAP-vel szembeni érzékenységekben, ellentétben a szülői R153 törzssel, ahol az egyes hNFAP koncentrációknál mért érzékenységi adatok szignifikánsan különböztek egymástól ($p < 0,0001$). Glicerol jelenlétében (ami revertálja a represszált fenotípust) az *alcA-PkcA* mutáns törzs a szülői R153 törzssel megegyező mértékben volt érzékeny a hNFAP-vel szemben és az egyes hNFAP-koncentrációkon mért érzékenységi adatok között a szülői törzsnél megfigyelt szignifikáns különbség ($p < 0,0001$) volt észlelhető (**7. Táblázat**). Ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy a hNFAP nem befolyásolja a hifa polarizált növekedésében és az apoptózis szupressziójában szerepet játszó PkcA/MpkA szignalizációs útvonalat (Katayama és mtsai., 2012). Megfigyeléseinket megerősítették az MpkA deléciós *A. nidulans*-szal elvégzett *in vitro* antifungális érzékenységi tesztjeink eredményei is. Az MpkA szerepet játszik az *A. nidulans* polarizált növekedésének és sejtfalintegritási útvonalának (*cell wall integrity pathway*, CWI) szabályozásában (Bussink és Osmani, 1999; Fujioka és mtsai., 2007). A sejtfalra ható stresszorok, mint a CFW és a koffein a Pkc és az Mpk foszforilációs szintjének megemelése révén indukálják a CWI-útvonalat. Az *A. nidulans alcA-PkcA* és *ΔmpkA* törzsek hiperszenzitívnek bizonyultak CFW-vel és koffeinnel szemben a szülői, GR5 törzshöz képest (**9. Táblázat**). Meglepő módon a *ΔmpkA* törzs viszont rezisztensnek bizonyult a hNFAP-vel szemben, míg a szülői GR5 törzs érzékeny volt (**7. Táblázat**). Ezek alapján feltételezzük, hogy a hNFAP nem a PkcA, és nem az MpkA aktiválása/gátlása révén fejti ki antifungális hatását, hanem egy, az MpkA által aktivált, a CWI-útvonaltól független célponton keresztül (**27. Ábra**).

9. Táblázat. Különböző szignalizációs útvonalakban sérült *A. nidulans* törzsek növekedése koffein és CFW jelenlétében *in vitro* mikrodilúciós tesztekben, 48 óra, 30 (*alcA*-PkcA, R153) vagy 37 °C-on (RhoA^{G14V}, *ΔmpkA*, GR5) történt inkubáció után.

Hatóanyagok / Törzs	koffein		CFW		Típus
	10 mM	20 mM	10 µg/ml	20 µg/ml	
RhoA ^{G14V}	78±1,2% ^{***}	60±8,4% [*]	92±7,1% ^{nsz}	55±7,7% ^{nsz}	mutáns
<i>ΔmpkA</i>	17±3,9% ^{***}	15±2,6% ^{***}	76±2,5% ^{***}	49±4,0% ^{**}	mutáns
GR5	59±1,1%	48±2,7%	97±2,1%	60±3,3%	az RhoA ^{G14V} és a <i>ΔmpkA</i> szülői törzse
<i>alcA</i> -PkcA	29±0,3% ^{***}	21±4,4% ^{***}	44±5,9% ^{***}	22±5,2% ^{***}	mutáns
R153	87±2,9%	79±14,4%	95±3,0%	74±2,6%	az <i>alcA</i> -PkcA szülői törzse

A kezeletlen kontroll törzs növekedését tekintettük 100%-nak. Az egyes cellákban a kontrollhoz viszonyított növekedési százalékot és a szórást tüntettük fel. A szignifikancia-értékeket (p-érték) a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva határoztuk meg. ^{***}: p<0.0001, ^{**}: p<0.005, ^{*}: p<0.05, ^{nsz}: nem szignifikáns különbség.

6.5.3 A hNFAP nem aktiválja a CWI-útvonalat

Fenti eredményeink alapján feltételeztük, hogy a hNFAP a PAF-hoz hasonlóan (Binder és mtsai., 2010b) és az AFP-vel ellentétben (Binder és mtsai., 2011) nem aktiválja a CWI-útvonalat. Ennek bizonyítására vizsgáltuk az *A. nidulans* FGSC A4 érzékenységét 100 µg/ml CFW-vel és ennek 200 µg/ml hNFAP-vel történő kombinációjával szemben. Az önmagában alkalmazott CFW és hNFAP jelenlétében az *A. nidulans* FGSC A4 9%±0,3% és 52%±3,2% növekedést mutatott, míg a két szer kombinációjával szemben rezisztensebbnek mutatkozott, ebben az esetben 61,3%±1,3% növekedést figyeltünk meg a kezeletlen kontrollhoz képest, melynek növekedését 100%-nak tekintettük. A növekedés mértékének változása feltehetően a két szer antagonist köcsönhatását jelzi, amiből arra következtethetünk, hogy a hNFAP nem aktiválja a CWI-útvonalat.

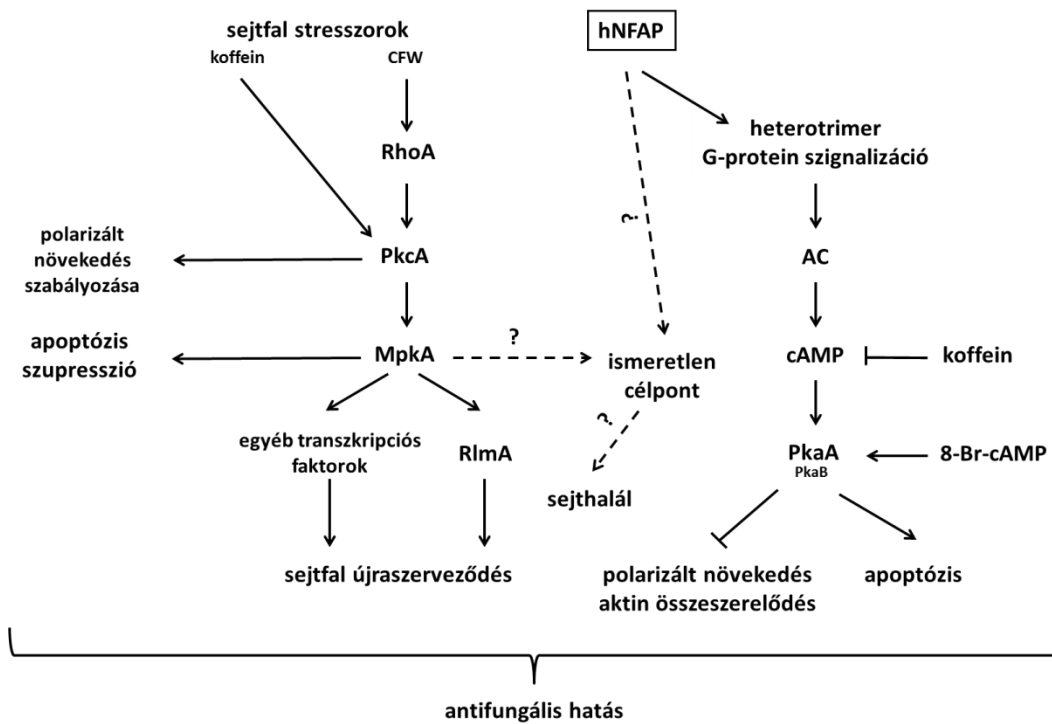
Az előző fejezetekben (6.5.1 és 6.5.2 fejezet) tárgyalt eredményeink összefoglalásaként a következőket állapíthatjuk meg: a hNFAP antifungális hatása független az CWI-útvonalban szerepet játszó RhoA és PkcA fehérjéktől, melyek a polarizált növekedés szabályozásában (Guest és mtsai., 2004; Katayama és mtsai., 2012) vesznek részt. A PkcA az MpkA fehérjén keresztül még szerepet játszik az apoptózis szupressziójában is (Katayama és mtsai., 2012). A PAF a hNFAP-hez hasonlóan a RhoA-tól független módon fejt ki aktivitását (Binder és mtsai., 2010b), viszont valószínűleg aktiválja a Pkc szignalizációt (Binder és mtsai., 2010b). Binder és mtsai. (2011) szerint az AFP_{NN5353} antifungális aktivitása is

független a RhoA fehérjétől, és valószínűleg a RhoA-GTP-áz aktiváló protein (GAP) valamely célpontjával kölcsönhatva fejt ki hatását. A hNFAP a PAF esetében megfigyeltekhez (Binder és mtsai., 2010b) hasonlóan nem indukálja a CWI-útvonalat *A. nidulans*-ban. Ezzel ellentétben az AFP és az AFP_{NN5353} képesek a CWI-útvonal aktiválására *A. niger*-ben az MpkA/RlmA által aktivált α -glükán szintáz kódoló *agsA* gén expressziós szintjének növelésével (Hagen és mtsai., 2007; Binder és mtsai., 2011).

Eredményeink alapján feltételezzük, hogy a hNFAP számos más antifungális fehérjéhez és hatóanyaghoz hasonlóan (Van Dijck, 2009; Hegedűs és Marx, 2013) egy G-protein-kapcsolt receptorhoz kötődve indukálja a cAMP/Pka szignalizációs útvonalat, ami gátolja a polarizált növekedést (Bencina és mtsai., 2005) és programozott sejthalált indukál (Semighini és mtsai., 2006) (**27. Ábra**). A hNFAP-hez hasonlóan a PAF is egy heterotrimer G-protein által mediált jelátviteli úton keresztül aktiválja a cAMP/Pka szignalizációs útvonalat, így szintén gátolja a polarizált növekedést és sejthalált indukál (Binder és mtsai., 2010b).

A hNFAP antifungális aktivitásában vélhetően szerepet játszik még egy, a CWI-útvonaltól független, MpkA által aktivált eddig ismeretlen célpont is, aminek szerepe lehet az apoptózis indukációjában. Ezt a feltételezésünket alátámasztják Colabardini és munkatársainak (2010) az *A. nidulans*-on, a farnezol által indukált apoptózis vizsgálata során tett megfigyelései. Ez a kuatócsoport is egy MpkA által aktivált, eddig ismeretlen apoptózisfaktor meglétét feltételezi, kísérleti rendszerükben ugyanis az *A. nidulans* Δ *mpkA* törzs rezisztensebbnek mutatkozott a farnezol által kiváltott sejthalállal szemben, mint a Δ *mpkC* és a Δ *hogA* törzsek (Colabardini és mtsai., 2010). Ez az ismeretlen célpont valószínűsíthetően ugyanaz lehet, mint amelyik szerepet játszik a hNFAP antifungális hatásának a létrejöttében. A hNFAP-vel ellentétben a PAF nem aktiválja az Mpk fehérjét (Binder és mtsai., 2010b), míg az AFP_{NN5353} az antifungális hatását a Pkc/Mpk útvonalon keresztül fejt ki (Binder és mtsai., 2011).

A hNFAP hatásmechanizmusával kapcsolatos eredményeink megerősítik azokat az eddigi megfigyeléseket, miszerint a tömlősgombák által termelt defenzinszerű fehérjék számos hasonló fizikai-kémiai tulajdonságuk, hasonló szerkezetük és az általuk kiváltott antifungális hatás hasonlósága ellenére különböző módon fejtik ki antifungális aktivitásukat. Eredményeink alapján a hNFAP antifungális mechanizmusa nagyon hasonló a PAF-éhoz, de egy MpkA-aktivált, az apoptózis indukációjában szerepet játszó, eddig ismeretlen célpontot is feltételezünk. A hNFAP feltételezett hatásmechanizmusát a **27. Ábra** mutatja be.



27. Ábra A hNFAP antifungális hatásmechanizmusának feltételezett modellje *A. nidulans*-ban a PAF és az AFP_{NNS353} hatásmodellje alapján (Binder és mtsai., 2010b; 2011). 8-Br-cAMP: 8-bromoadenozin 3'5'-ciklikus monofoszfát. AC: adenilát cikláz. cAMP: ciklikus adenozin-monofoszfát, CFW: *calcofluor white*, Mpk: mitogén által aktivált protein kináz, PkaA: protein kináz A A, PkcA: protein kináz C A, RhoA: GTP-kötő fehérje, RlmA: transzkripció faktor.

7. TARTALMI ÖSSZEFOGLALÓ

Napjainkban a fonalagombák által okozott fertőzések esetszámának emelkedése miatt jelentősen megnőtt az új antifungális szerek kifejlesztése iránti igény. Az ilyen szerekkel szemben támasztott legfontosabb követelmények a következők: biztonságos alkalmazhatóság, széles hatásspektrum, gazdaságos előállíthatóság. A tömlőgombák által termelt, defenzinszerű fehérjék megfelelhetnek ezeknek a feltételeknek, így új antifungális stratégiák potenciális alapjául szolgálhatnak. Gyakorlatban való alkalmazhatóságuk előfeltétele a hatásmechanizmusuk és szerkezetük megismerése, valamint a nagy mennyiségben való gazdaságos előállíthatóságuk biztosítása.

Az eddigi eredmények alapján a *Neosartorya fischeri* NRRL 181 által termelt antifungális protein (NFAP) megfelel ezeknek a követelményeknek. Hatékonyan gátolja számos orvosi szempontból is jelentős fonalagomba növekedését, aktivitását széles pH- és hőmérséklet-tartományban kifejti, és ellenálló proteináz-kezeléssel szemben. Hatására sérül a rá érzékeny sejtek sejtfalszerveződése, valamint sejthalált indukál. A *N. fischeri* NRRL 181 még a termelődés szempontjából figyelembe vehető transzkripciós faktorok kötőhelyeinek az indukciója ellenére is csak kis mennyiségben szekretálja az NFAP-t a tápközegbe. A hatásmechanizmus pontos megismerése és egy, a fehérje nagy mennyiségben való előállítását lehetővé tevő expressziós rendszer kidolgozása után az NFAP potenciális jelöltként szolgálhat protein-alapú antifungális szerek kifejlesztéséhez.

Munkánk során célul tűztük ki a *N. fischeri* antifungális protein (NFAP) nagy mennyiségben történő heterológ expresszióját, az így termelt heterológ NFAP (hNFAP) tisztítását és azonosítását, valamint a hNFAP és a natív NFAP antifungális spektrumának összehasonlítását. Vizsgáltuk továbbá a hNFAP-re érzékeny gombákban a fehérje hatására rövid és hosszú időn belül bekövetkező fenotipikus változásokat: az aktin filamentumok elrendeződésének és a kitineloszlásnak a változását, a membránintegritás sérülését, az apoptotikus fenotípus megjelenését. Vizsgáltuk a hNFAP érzékeny hifákon belüli lokalizációját, továbbá hatásmechanizmusát jelátviteli utakban mutáns *A. nidulans* törzsek segítségével, valamint a NFAP szerkezetét *in silico* módszerekkel.

1. Az NFAP heterológ expressziója, tisztítása és azonosítása

Mivel az NFAP részletes tanulmányozásához nagy mennyiségű fehérjére van szükség, munkánk első lépéseként létrehoztunk egy metanol által indukálható, *Pichia pastoris* KM71H-alapú heterológ expressziós rendszert, mely lehetővé tette az NFAP nagy mennyiségben történő előállítását. A hNFAP-kihozatal átlaga 5958 ± 236 $\mu\text{g/l}$ volt, mely az eredeti termelő *N. fischeri* NRRL 181-gyel elérhető fehérjekihozatal hatszorosa (978 ± 201 $\mu\text{g/l}$). A hNFAP-t termelő *P. pastoris* KM71H fermentlevéből az általunk alkalmazott tisztítási eljárással homogenitásig tudtuk tisztítani a fehérjét. A hNFAP azonosítása Q-TOF tömegspektrometria segítségével történt. Az emésztéses módszeren alapuló azonosítás során a kapott 6 peptidfragmentum 89,5%-ban lefedte az NFAP aminosav-szekvenciáját. A termelt hNFAP monoizotópos tömege 6615,1 Da-nak bizonyult, amely megfelel az NFAP *in silico* módszerrel becsült tömegének. Edman-féle szekvenálással meghatároztuk a tisztított hNFAP első öt N-terminális aminosavát (LEYKG), melyek azonosnak bizonyultak a natív NFAP első öt N-terminális aminosavával. Mindezekkel bizonyítottuk, hogy a *P. pastoris* KM71H képes a *N. fischeri* NRRL 181 által termelt NFAP-vel szekvencia szinten megegyező proteint szekretálni.

2. Az NFAP és a hNFAP szerkezetvizsgálata

In silico módszerekkel előrejeleztük az NFAP térszerkezeti képét. A becsült szerkezeti kép alapján az NFAP a többi tömlőgomba által termelt defenzinszerű fehérjéhez hasonlóan 5 β -redő által alkotott β -hordó struktúrát alakít ki. Az AFP-vel és a PAF-fal ellentétben az NFAP rendelkezik egy pozitívan töltött C-terminális „farokrégióval” (F55-H57) és a belső hurokrégiójának egy része (T33-D38) kinyúlik a kompakt β -hordó szerkezetből. Az NFAP rendelkezik egy pozitív töltésű felszíni régióval, melyet a 10., 34., és 37. pozícióban lévő lizinek alkotnak. Ez a régió szakirodalmi adatok alapján szerepet játszhat a fehérje antifungális aktivitásában. *In silico* módszerrel meghatároztuk a fehérje diszulfidhid-mintázatát is, amely a többi közeli rokon fehérjére jellemző *abcabc* motívumot mutatja.

A hNFAP és a natív NFAP amidrégiói $^1\text{H-NMR}$ spektrumainak hasonlóságával is bizonyítottuk, hogy a *P. pastoris* KM71H által termelt hNFAP egy antifungálisan aktív, feltekeredett térszerkezetet vesz fel.

3. Az NFAP és a hNFAP antifungális spektrumának összehasonlítása

In vitro mikrodilúciós tesztekben összehasonlítottuk a natív NFAP és a hNFAP antifungális spektrumát. A két fehérje azonos mértékben gátolta a vizsgálatba bevont fonalgombák növekedését. Hatékonyan gátolták hat, az *Aspergillus* nemzetségbe (*A. fumigatus*, *A. niger*, *A. nomius*, *A. tamarii*, *A. tubingensis*, *A. welwitschiae*) és kettő, a *Fusarium* nemzetségbe (*F. incarnatum*, *F. solani* fajkomplex) tartozó humán fertőzésből származó izolátum növekedését. Az NFAP-vel és hNFAP-vel szemben a legérzékenyebb fajnak az *A. tubingensis* bizonyult. A vizsgált járomspórás gombák (*Absidia corymbifera*, *Rhizomucor miehei*, *Rh. pusillus*, *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis*, *R. oryzae*), valamint további hat vizsgált tömlősgombatorzs (*A. flavus*, *A. terreus*, *F. solani* fajkomplex SZMC 11427, *F. sporotrichioides*, *Trichoderma longibrachiatum*) rezisztenciát mutatott az NFAP-vel és a hNFAP-vel szemben. Érzékenységi tesztjeinkkel bizonyítottuk, hogy a *P. pastoris* KM71H képes antifungálisan aktív hNFAP-t termelni és a hNFAP antifungális hatékonysága megegyezik a natív NFAP-jével.

3. A hNFAP hatására bekövetkező rövid- és hosszútávú fenotipikus változások

NFAP-érzékeny *Aspergillus nidulans* FGSC A4 és *A. nidulans* Actin-GFP törzseken vizsgáltuk a hNFAP hatására rövid és hosszú időintervallumon belül bekövetkező fenotipikus változásokat. FUN-1 festéssel bizonyítottuk, hogy már 30 perces szubletális koncentrációjú (25 µg/ml) hNFAP-kezelés hatására csökken, vagy megszűnik az *A. nidulans* FGSC A4 metabolikus aktivitása. Vizsgáltuk továbbá az *A. nidulans* FGSC A4 törzs membránjának integritását, ami 30 és 60 percig történő hNFAP-kezelés után is intakt maradt, viszont 16 órás kezelés után a membránintegritás megszűnt. Annak érdekében, hogy kiderítsük, hogy a membrán integritásának megszűnése apoptotikus, vagy nekrotikus folyamat eredménye, *Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit*-tel vizsgáltuk az *A. nidulans* FGSC A4 törzsén hNFAP hatására bekövetkező apoptotikus és nekrotikus eseményeket. Harminc és hatvan perces szubletális koncentrációjú (25 µg/ml) hNFAP-kezelés hatására apoptotikus markerek megjelenését figyeltük meg *A. nidulans* FGSC A4 hifákon, nekrozisra utaló jeleket viszont nem detektáltunk. Ezzel ellentétben, 16 óra hosszan tartó hNFAP-kezelés után kizárólag propidium-jodiddal festődő, hifákat figyeltünk meg, ami valószínűleg az apoptózis kései szakaszában fellépő membránkárosodás következménye. Mindebből arra következtetünk, hogy a hNFAP apoptózist indukál a rá érzékeny hifákban, viszont a sejtmembránt közvetlenül nem károsítja.

Vizsgáltuk a hNFAP hatását *A. nidulans* sejtek aktin- és kitinmintázatára. *A. nidulans* Actin-GFP sejtekben már 30 perces szubletális koncentrációjú (25 µg/ml) hNFAP-kezelés hatására a normális, apikális régióban lévő, gyűrű-szerű aktinmintázat rendezetlenné vált. Az aktinnak fontos szerepe van a kitin sejtfalba történő beépülésében, így vizsgáltuk a hNFAP hatására bekövetkező változásokat a kitinelrendezésben az *A. nidulans* FGSC A4 törzsön. A hNFAP hatására a sejtek kitintartalmának csökkenését, és a normális „sapkaszerű” mintázat helyett a hifák szubapikális régiójában való lokalizációját figyeltük meg.

Mindebből arra következtettünk, hogy a hNFAP már rövid időn belül, közvetlen módon hatást gyakorol a növekvő hifa apikális régiójának aktinmintázatára, így a kitineloszlásra is, ami a polarizált növekedés megzavarását vonja maga után. Ez magyarázatul szolgálhat a korábban már jól leírt és általunk is megfigyelt torzult, többszörösen elágazó hifanövekedésre (h)NFAP jelenlétében.

4. A hNFAP lokalizációja érzékeny sejtekben

Indirekt immunfluoreszcens festéssel vizsgáltuk a hNFAP lokalizációját a rá érzékeny hifákban. Harminc és hatvan perces hNFAP-kezelés után nem észleltünk intracelluláris, hNFAP-specifikus jeleket az *A. nidulans* FGSCA4 hifáiban. Tizenhat órás hNFAP-kezelés után viszont intracellulárisan, a sejtfal kitüremkedéseinél és a hifák törési pontjainál lokalizálódott hNFAP-t figyeltünk meg. Latrunculin B (endocitotikus folyamatok gátlója) jelenlétében megismételve a kísérletet arra a megállapításra jutottunk, hogy a hNFAP sejtbe történő bejutása nem egy aktív transzportfolyamat, hanem a passzív diffúzió eredménye a sérült hifarészeknél (úgy mint a sejtfal kitüremkedései és a hifák törési pontjai). Ezeknél a hNFAP-felhalmozódási pontoknál PI-festéssel igazoltuk a membránintegritás megszűnését.

5. A hNFAP hatásmechanizmusának vizsgálata

In vitro mikrodilúciós tesztekkel vizsgáltuk az *A. nidulans* FGSCA4 és különböző jelátviteli utakban sérült *A. nidulans* törzsek hNFAP-érzékenységét. Az érzékenységi adatokból következtetéseket vontunk le a hNFAP által befolyásolt szignáltranszdukciós útvonalakra és így a protein lehetséges antifungális hatásmechanizmusára. Eredményeink alapján a hNFAP vélhetően egy heterotrimer G-protein-kapcsolt receptorhoz kötődve indukálja a cAMP/Pka szignalizációs útvonalat, ami révén gátolja a polarizált növekedést és apoptózist indukál. A hNFAP antifungális hatása a sejtfalintegritás-útvonaltól (*cell wall*

integrity pathway) függetlennek bizonyult, azonban egy MpkA által aktivált, eddig ismeretlen, apoptózist indukáló célpont hNFAP által történő aktivációját is feltételezzük.

Munkánk során létrehoztunk egy heterológ expressziós rendszert, mely a fehérjetermelés további optimalizálása után alkalmas lehet a hNFAP ipari mennyiségben történő termelésére is. A hNFAP hatásmechanizmusának vizsgálata során elért eredményeink alapján kijelenthetjük, hogy a hNFAP hasonlóságokat és különbségeket is mutat a két legintenzívebben tanulmányozott, fonalas tömlősgomba által termelt defenzinszerű fehérje, a *Penicillium chrysogenum* PAF és az *Aspergillus giganteus* AFP hatásmechanizmusához. Eredményeink jelentős mértékben hozzájárulnak az NFAP és más, fonalas tömlősgombák által termelt defenzinszerű fehérjék hatásmechanizmusának megértéséhez.

8. SUMMARY

The increased incidence of severe fungal infections and the fast development of drug resistant filamentous fungi causing mycoses, plant infections or damage to cultural heritages strongly demand for the development of new antifungal strategies. Small, cysteine-rich, highly stable, defensin-like antifungal proteins secreted by filamentous Ascomycetes have great potential for application in these fields, and also have significant commercial potential on the global market for antifungals. The *Neosartorya fischeri* antifungal protein (NFAP) produced by *N. fischeri* NRRL 181 is a novel member of this protein group. Features of NFAP (such as effective inhibitory potential against filamentous fungi, pH- and thermal stability, resistance to degradation by proteases) render it exceptionally suitable as potential commercial preservative, biopesticide and drug against moulds. In spite of the available knowledge of the nature of 5'-upstream transcriptional regulation elements, the bulk production of analytically pure NFAP has not been resolved yet and a detailed study of antifungal mechanism of NFAP is still missing, however, they represent essential prerequisites for the practical application in the future.

Therefore in the present study:

1. the heterologous expression and bulk production of NFAP by *Pichia pastoris*,
 2. the antifungal spectra of the heterologous NFAP (hNFAP) produced by *Pichia pastoris* KM71H and of the native NFAP secreted by *N. fischeri* NRRL 181,
 3. the cell viability and apoptotic/necrotic processes, the membrane permeabilization, the actin and chitin distribution after hNFAP treatment in a sensitive mold,
 4. the localization of hNFAP in a sensitive mold,
 5. the antifungal mechanism of hNFAP,
 6. and the *in silico* structure of NFAP
- were investigated.

1. Heterologous expression, purification and identification of NFAP

Investigation of protein structure and antifungal mechanism require pure protein in the range of milligrams. For this purpose we carried out the heterologous expression of NFAP in the yeast *P. pastoris* KM71H. *P. pastoris* KM71H transformant strain harboring the pPICZ α A plasmid with the mature NFAP encoding gene produced the protein. The final yield of the hNFAP from three independent productions was 5958 ± 236 μ g/l which is six-fold compared to

the native producer *N. fischeri* NRRL 181 where it was 978 ± 201 $\mu\text{g/l}$. After purification to homogeneity with cation-exchange chromatography, presence of any other proteins was not detected beside the 6.6 kDa hNFAP. Mass spectrometric molar mass measurement of mature hNFAP resulted in a monoisotopic molecular weight of 6615.1 Da which correlates with the *in silico* calculated molecular weight of NFAP. The peptides identified by the mass spectrometric analysis of enzyme-digested sample cover 89.5 % of the total sequence. The cleavage of the *P. pastoris* extracellular signal (α -factor) during the expression of hNFAP was efficient, because N-terminal sequencing experiments revealed that the first five amino acid residues of the purified hNFAP are LEYKG, which corresponds well to the first five N-terminal amino acids of the native NFAP. Based on these results we concluded that *P. pastoris* KM71H can produce hNFAP in a properly matured form in amino acid sequence level.

2. *In silico* predicted structure of hNFAP and NFAP

The 3D structure of NFAP was predicted with *in silico* methods. The putative 3D structure of NFAP is very similar to the other defensin-like antifungal proteins produced by filamentous Ascomycetes. hNFAP adopts a β -barrel structure consisting of five antiparallel β -strand. Three lysins in the positions of 10., 34. and 37. form a positively charged surface region, which, according to the literature could play a role in the antifungal mechanism. Unlike PAF and AFP, NFAP has a negatively charged C-terminal tail region (F55-H57) and a part of its large internal loop region (T33-D38) elongates from the β -barrel topology. We also predicted the disulfide bond pattern of hNFAP, which shows the *abcabc* motif.

3. Comparison of the antifungal spectrum of hNFAP and NFAP

The purified hNFAP effectively inhibited the growth of fungal isolates belonging to the genus *Aspergillus* (*A. fumigatus*, *A. niger*, *A. nomius*, *A. tamarii*, *A. tubingensis*, *A. welwitschiae*) and *Fusarium* (*F. incarnatum*, *F. solani* species complex), but all investigated zygomycetous strains (*Absidia corymbifera*, *Rhizomucor miehei*, *Rh. pusillus*, *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis*, *R. oryzae*) and six ascomyceteous isolates (*A. flavus*, *A. terreus*, *F. solani* species complex SZMC 11427, *F. sporotrichioides*, *Trichoderma longibrachiatum* UAMH 7955 and *T. longibrachiatum* UAMH 9515) proved to be unsusceptible. There was no significant difference between the growth inhibition effect

exerted by the native NFAP and the hNFAP. These data indicated that *P. pastoris* KM71H can produce the NFAP in an antifungally active form.

4. Short- and long-term phenotypic changes in the presence of hNFAP in a sensitive mould

After short-term exposure (30 minutes) to sublethal concentration of hNFAP (25 µg/ml), reduced cellular metabolism was detected with FUN-1 staining in *A. nidulans* FGSC A4 hyphae compared to the untreated control. This phenomenon was also observed after 60 minutes and 16 hours of NFAP-treatment.

The membrane-disrupting activity of hNFAP was also investigated by applying propidium iodide (PI) stain. Most of the *A. nidulans* FGSC A4 hyphae did show intact membrane after a 30 and 60 minutes-long incubation in the presence of hNFAP (25 µg/ml). After 16 hours almost all of the hyphae showed massive membrane disruption in the hNFAP-treated sample presumably as a consequence of the long-time cell killing effect of hNFAP.

In order to decide if the loss of the membrane integrity of *A. nidulans* FGSC A4 is the consequence of apoptosis or necrosis, we investigated the possible apoptotic/necrotic events in the presence of hNFAP (25 µg/ml) by the application of the Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit. After 30 and 60 minutes a significant increase in the number of apoptotic germlings was observed in the hNFAP-treated samples compared to the untreated control. Only few cells with disrupted membrane integrity were detected in the untreated and hNFAP-treated samples after 30 and 60 minutes. These results suggest that hNFAP exerts its antifungal effect through induction of apoptosis. After 16 hours, however, almost all germlings showed necrotic phenotype.

To study the morphological aberrations of hNFAP-exposed *A. nidulans* hyphae, we analysed the actin distribution and the deposition of chitin at the hyphal tips. Actin-GFP expressing *A. nidulans* showed typical actin patch distribution at the hyphal tips clustered near the apical region and scattered behind the tips. In contrast, actin patches were disturbed in hyphae that were treated with 25 µg/ml of hNFAP for 30 minutes only. Calcofluor white (CFW) staining revealed delocalized chitin deposition at hyphal tips of *A. nidulans* FGSC A4 after hNFAP treatment (25 µg/ml) for 30 minutes. In contrast, the untreated control sample exhibited a characteristic cap-like CFW fluorescence. These effects in actin and chitin delocalization were also observed after 60 minutes and 16 hours of incubation with hNFAP.

These results indicate that in the presence of hNFAP the normal actin polarization/localization and chitin distribution are disturbed in *A. nidulans*.

5. Localization of hNFAP in a susceptible mould

An indirect immunofluorescence staining method was applied to study the localization of hNFAP in *A. nidulans* FGSC A4. hNFAP did not enter the fungal cell in detectable concentration levels after 30 and 60 minutes of exposure, but after 16 hours hNFAP-specific fluorescence signals accumulated at hyphal fractures, twists and in cell-wall bubbles. To clarify whether the hNFAP internalization was the consequence of an endocytotic mechanism, the indirect immunofluorescence staining was repeated in the presence of latrunculin B (latB). LatB selectively inhibits the actin polymerization and therefore disturbs endocytosis. hNFAP-specific fluorescence signals appeared in hyphae only after 16 hours of incubation with hNFAP and latB, but not after the exposure for 30 or 60 minutes. Based on these results we conclude that hNFAP is presumably not internalized by endocytosis. Instead, the accumulation of NFAP after 16 hours is possibly a consequence of a passive diffusion at disrupted sites of the cell wall and plasma membrane, that we proved PI staining.

6. Antifungal mechanism of hNFAP

The growth inhibition effect of hNFAP was studied on *A. nidulans* strains carrying mutations in the guanidine nucleotide binding domain of heterotrimeric G-protein α -subunit, cAMP/protein kinase A (Pka) and protein kinase C (Pkc)/mitogen-activated protein kinase (Mpk) signal transduction pathways. Differences in the susceptibility of these mutants towards hNFAP in *in vitro* broth microdilution tests allowed us to postulate the following mode of action: hNFAP binds to a G-protein coupled receptor in the fungal membrane and activates the cAMP/Pka A pathway via G-protein signalling, which leads to inhibition of polar growth and ultimately triggers apoptosis. However, NFAP does not have any influence on the Pkc/Mpk cell wall integrity pathway, but a so far unknown cell wall integrity pathway-independent MpkA-activated target is assumed to be involved in the cell death induction.

Summarising our results: a *P. pastoris*-based heterologus expression system was constructed for bulk production of NFAP. Based on the susceptibility tests and that the

hNFAP exists in a folded structure. We suppose that the hNFAP has the same tertiary protein structure as NFAP, but further investigations (e.g. nuclear magnetic resonance investigations and thermal unfolding experiments) are needed to confirm this hypothesis. With *in silico* methods we predicted the possible tertiary structure of NFAP. We concluded that hNFAP shows similarities, but also differences in the exerted phenotypic changes in a sensitive mold and in its mode of antifungal action compared to the two most investigated NFAP-related proteins from *Aspergillus giganteus* and *Penicillium chrysogenum*. Our present results significantly contribute to the understanding of the antifungal mechanism and structure not only of NFAP, but also of other defensin-like antifungal proteins from Ascomycetes in general.

9. IRODALOMJEGYZÉK

- Adams TH, Wieser JK, Yu JH. Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. Microbiol Mol Biol Rev. 1998;62:35-54
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. J Mol Biol. 1990;215:403-410.
- Antuch W, Güntert P, Wüthrich K. Ancestral beta gamma-crystallin precursor structure in a yeast killer toxin. Nat Struct Biol. 1996;3:662-665.
- Arnold K, Bordoli L, Kopp J, Schwede T. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modeling. Bioinformatics. 2006;22:195-201.
- Barna B, Leiter É, Hegedűs N, Bíró T, Pócsi I. Effect of the *Penicillium chrysogenum* antifungal protein (PAF) on barley powdery mildew and wheat leaf rust pathogens. J Basic Microbiol. 2008;48:516-520.
- Batta Gy, Barna T, Gáspári Z, Sándor Sz, Kövér KE, Binder U, Sarg B, Kaiserer L, Chhillar AK, Eigentler A, Leiter É, Hegedűs N, Pócsi I, Lindner H, Marx F. Functional aspects of the solution structure and dynamics of PAF – a highly-stable antifungal protein from *Penicillium chrysogenum*. FEBS J. 2009;276:2875-2890.
- Bencina M, Legisa M, Read ND. Cross-talk between cAMP and calcium signalling in *Aspergillus niger*. Mol Microbiol. 2005;56:268–281.
- Binder U, Chu M, Read ND, Marx F. The antifungal activity of the *Penicillium chrysogenum* protein PAF disrupts calcium homeostasis in *Neurospora crassa*. Eukaryot Cell. 2010a;9:1374-1382.
- Binder U, Oberparleiter C, Meyer V, Marx F. The antifungal protein PAF interferes with PKC/MPK and cAMP/PKA signalling of *Aspergillus nidulans*. Mol Microbiol. 2010b;75:294-307.

- Binder U, Bencina M, Eigentler A, Meyer V, Marx F. The *Aspergillus giganteus* antifungal protein AFP_{NN5353} activates the cell wall integrity pathway and perturbs calcium homeostasis. *BMC Microbiol.* 2011;11:209.
- Binder U, Benčina M, Fizil Á, Batta G, Chhillar AK, Marx F. Protein kinase A signaling and calcium ions are major players in PAF mediated toxicity against *Aspergillus niger*. *FEBS Lett.* 2015;589:1266-1271.
- Bussink HJ, Osmani SA. A mitogen-activated protein kinase (MpkA) is involved in polarized growth in the filamentous fungus, *Aspergillus nidulans*. *FEMS Microbiol Lett.* 1999;173:117-125.
- Campos-Olivas R, Bruix M, Santoro J, Lacadena J, Martínez del Pozo Á, Gavilanes JG, Rico M. NMR solution structure of the antifungal protein from *Aspergillus giganteus*: evidence for cysteine pairing isomerism. *Biochemistry.* 1995;34:3009-3021.
- Cereghino GPL, Cereghino JL, Ilgen C, Cregg JM. Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. *Curr Opin Biotechnol.* 2002;13:329-332.
- Ceroni A, Passerini A, Vullo A, Frasconi P. DISULFIND: a disulfide bonding state and cysteine connectivity prediction server. *Nucleic Acids Res.* 2006;34:177-181.
- Chen Z, Ao J, Yang W, Jiao L, Zheng T, Chen X. Purification and characterization of a novel antifungal protein secreted by *Penicillium chrysogenum* from an Arctic sediment. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2013;97:10381-10390.
- Chothia C, Lesk, AM. The relation between the divergence of sequence and structure in proteins *EMBO J.* 1986;5: 823-826.
- Coca M, Bortolotti C, Rufat M, Penas G, Eritja R, Tharreau D, Martínez del Pozo Á, Messeguer J, San Segudo B. Transgenic rice plants expressing the antifungal AFP protein from *Aspergillus giganteus* show enhanced resistance to the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Plant Mol Biol.* 2004;54:245-259.
- Colabardini AC, De Castro PA, De Gouvêa PF, Savoldi M, Malavazi I, Goldman MH, Goldman GH. Involvement of the *Aspergillus nidulans* protein kinase C with farnesol

- tolerance is related to the unfolded protein response. *Mol Microbiol.* 2010;78: 1259–1279.
- Delgado J, Acosta R, Rodríguez-Martín A, Bermúdez E, Núñez F, Asensio MA. Growth inhibition and stability of PgAFP from *Penicillium chrysogenum* against fungi common on dry-ripened meat products. *Int J Food Microbiol.* 2015;205:23-29.
- Denning DW, Bromley MJ. Infectious Disease. How to bolster the antifungal pipeline. *Science.* 2015;347:1414-1416.
- Epstein, CJ. Relation of protein evolution to tertiary structure. *Nature.* 1964;203:1350-1352.
- Eswar N, Eramian D, Webb B, Shen MY, Sali A. Protein structure modeling with MODELLER. *Methods Mol Biol.* 2008;426:145-159.
- Fischer R, Timberlake WE. *Aspergillus nidulans* *apsA* (anucleate primary sterigmata) encodes a coiled-coil protein required for nuclear positioning and completion of asexual development. *J Cell Biol.* 1995 ;128:485-98.
- Fisher MC, Henk DA, Briggs CJ, Brownstein JS, Madoff LC, McCraw SL, Gurr SJ. Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature.* 2012;484:186-194.
- Fujioka T, Mizutani O, Furukawa K, Sato N, Yoshimi A, Yamagat Y, Nakajima T, Abe K. MpkA-dependent and independent cell wall integrity signaling in *Aspegillus nidulans*. *Eukaryot Cell.* 2007;6:1497-1510
- Galgóczy L, Papp T, Leiter É, Marx F, Pócsi I, Vágvölgyi Cs. Sensitivity of different Zygomycetes to the *Penicillium chrysogenum* antifungal protein (PAF). *J Basic Microbiol.* 2005;45:136-141.
- Galgóczy L, Papp T, Lukács Gy, Leiter É, Pócsi I, Vágvölgyi Cs. Interactions between statins and *Penicillium chrysogenum* antifungal protein (PAF) to inhibit the germination of sporangiospores of different sensitive Zygomycetes. *FEMS Microbiol Lett.* 2007;270:109-115.

- Galgóczy L, Papp T, Pócsi I, Hegedűs N, Vágvölgyi Cs. *In vitro* activity of *Penicillium chrysogenum* antifungal protein (PAF) and its combination with fluconazole against different dermatophytes. *Anton Leeuw Int J G*. 2008;94:463-470.
- Galgóczy L, Kovács L, Karácsony Z, Virágh M, Hamari Zs, Vágvölgyi Cs. Investigation of the antimicrobial effect of *Neosartorya fischeri* antifungal protein (NFAP) after heterologous expression in *Aspergillus nidulans*. *Microbiol-SGM*. 2013a;159:411-419.
- Galgóczy L, Virágh M, Kovács L, Tóth B, Papp T, Vágvölgyi Cs. Antifungal peptides homologous to the *Penicillium chrysogenum* antifungal protein (PAF) are widespread among *Fusaria*. *Peptides*. 2013b;39:131-137.
- Geisen R. *P. nalgiovense* carries a gene which is homologous to the *paf* gene of *P. chrysogenum* which codes for an antifungal peptide. *Int J Food Microbiol*. 2000;62:95-101.
- Gilquin B, Roumestand C, Zinn-Justin S, Ménez A, Toma, F. Refined three-dimensional solution structure of a snake cardiotoxin: analysis of the side-chain organization suggests the existence of a possible phospholipid binding site. *Biopolymers*. 1993;33:1659-1675.
- Girgi M, Breese WA, Lörz H, Oldach KH. Rust and downy mildew resistance in pearl millet (*Pennisetum glaucum*) mediated by heterologous expression of the *afp* gene from *Aspergillus giganteus*. *Transgenic Res*. 2006;15:313-324.
- Gorovits R, Yarden O. Environmental suppression of *Neurospora crassa* cot-1 hyperbranching: a link between COT1 kinase and stress sensing. *Eukaryot Cell*. 2003;2:699-707.
- Guest GM, Lin X, Momany M. *Aspergillus nidulans* RhoA is involved in polar growth, branching, and cell wall synthesis. *Fungal Genet Biol*. 2004;41:13-22.
- Guex N, Peitsch MC. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*. 1997;18:2714-2723
- Hagen S, Marx F, Ram AF, Meyer V. The antifungal protein AFP from *Aspergillus giganteus* inhibits chitin synthesis in sensitive fungi. *Appl Environ Microbiol*. 2007;73:2128-2134.

- Hajji M, Jellouli K, Hmidet N, Balti R, Sellami-Kamoun A, Nasri M. A highly thermostable antimicrobial peptide from *Aspergillus clavatus* ES1: biochemical and molecular characterization. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2010;37:805-813.
- Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser.* 1999;41:95-98
- Han KH, Seo JA, Yu JH. Regulators of G-protein signalling in *Aspergillus nidulans*: RgsA downregulates stress response and stimulates asexual sporulation through attenuation of GanB (Galpha) signalling. *Mol Microbiol.* 2004;53:529-540
- Hancock RE, Sahl HG. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat Biotechnol.* 2006;24:1551-1557.
- Hegedűs N, Leiter É, Kovács B, Tomori V, Kwon NJ, Emri T, Marx F, Batta G, Csernoch L, Haas H, Yu JH, Pócsi I. The small molecular mass antifungal protein of *Penicillium chrysogenum* – a mechanism of action oriented review. *J Basic Microbiol.* 2011;51:561-571.
- Hegedűs N, Marx F. Antifungal proteins: More than antimicrobials? *Fung Biol Rev.* 2013;26:132-145.
- Kaiserer L, Oberparleiter C, Weiler-Görz R, Burgstaller W, Leiter É, Marx F. Characterization of the *Penicillium chrysogenum* antifungal protein PAF. *Arch Microbiol.* 2003;180:204-210.
- Katayama T, Uchida H, Ohta A, Horiuchi H. Involvement of protein kinase C in the suppression of apoptosis and in polarity establishment in *Aspergillus nidulans* under conditions of heat stress. *PLoS One.* 2012;11:e0050503.
- Kovács L. A *Neosartorya fischeri* által termelt defenzinszerű antifungális protein azonosítása és jellemzése. 2014 Doktori Értekezés. Mikrobiológiai Tanszék, Szegedi Tudományegyetem.
- Kovács L, Virágh M, Takó M, Papp T, Vágvolgyi Cs, Galgóczy L. Isolation and characterization of *Neosartorya fischeri* antifungal protein (NFAP). *Peptides.* 2011;32:1724-1731.

- Kim DE, Chivian D, Baker D. Protein structure prediction and analysis using the Robetta server. *Nucleic Acids Res.* 2004;32:W526-531.
- Krieger E, Nabuurs SB, Vriend G. Homology modeling. *Methods Biochem Anal.* 2003;44:509-523.
- Kuranda K, Leberre V, Sokol S, Palamarczyk G, François J. Investigating the caffeine effects in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* brings new insights into the connection between TOR, PKC and Ras/cAMP signalling pathways. *Mol Microbiol.* 2006;61:1147-1166.
- Lacadena J, Martínez del Pozo Á, Gasset M, Patino B, Campos-Olivas R, Vazquez C, Martinez-Ruiz A, Mancheno JM, Onaderra M, Gavilanes JG. Characterization of the antifungal protein secreted by the mould *Aspergillus giganteus*. *Arch Biochem Biophys.* 1995;324:273-281.
- Laskowski RA, MacArthur MW, Moss DS, Thornton JM. PROCHECK - a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J App Cryst.* 1993;26:283-291.
- Lee GD, Shin SY, Maeng CY, Jin ZZ, Kim KL, Hahm KS. Isolation and characterization of a novel antifungal peptide from *Aspergillus niger*. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;263:646-651.
- Leiter É, Szappanos H, Oberparleiter C, Kaiserer L, Csernoh L, Pusztahelyi T, Emri T, Pócsi I, Salvenmoser W, Marx F. Antifungal protein PAF severely affects the integrity of the plasma membrane of *Aspergillus nidulans* and induces an apoptosis-like phenotype. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49:2445-2453.
- Liu RS, Huang H, Yang Q, Liu WY. Purification of α -sarcin and an antifungal protein from mold (*Aspergillus giganteus*) by chitin affinity chromatography. *Protein Expr Purif.* 2002;25:50-58.
- López-García B, Moreno AB, San Segundo B, De los Ríos V, Manning JM, Gavilanes JG, Martínez del Pozo Á. Production of the biotechnologically relevant AFP from *Aspergillus giganteus* in the yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif.* 2010;70:206-210.

- Macauley-Patrick S, Fazenda ML, McNeil B, Harvey LM. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast*. 2005;22:249-270.
- Magan N, Medina A, Aldred D. Possible climate-change effects on mycotoxin contamination of food crops pre- and postharvest. *Plant Pathol*. 2011;60:150-163.
- Martín-Urdiroz M, Martínez-Rocha AL, Di Pietro A, Martínez del Pozo Á, Roncero MI. Differential toxicity of antifungal protein AFP against mutants of *Fusarium oxysporum*. *Int Microbiol*. 2009;12:115-121.
- Martínez del Pozo Á, Lacadena V, Mancheno JM, Olmo N, Onaderra M, Gavilanes JG. The antifungal protein AFP of *Aspergillus giganteus* is an oligonucleotide/oligosaccharide binding (OB) fold-containing protein that produces condensation of DNA. *J Biol Chem*. 2002;277:46179-46183.
- Martínez-Ruiz A, Martínez del Pozo Á, Lacadena J, Mancheño JM, Oñaderra M, Gavilanes JG. Characterization of a natural larger form of the antifungal protein (AFP) from *Aspergillus giganteus*. *Biochim Biophys Acta*. 1997;1340:81-87.
- Marx F, Haas H, Reindl M, Stöffler G, Lottspeich F, Redl B. Cloning, structural organization and regulation of expression of the *Penicillium chrysogenum paf* gene, encoding an abundantly secreted protein with antifungal activity. *Gene*. 1995;167:167-171.
- Marx F. Small, basic antifungal proteins secreted from filamentous Ascomycetes: a comparative study regarding expression, structure, function and potential application. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2004;65:133-142.
- Marx F, Salvenmoser W, Kaiserer L, Graessle S, Weiler-Görz R, Zadra I, Oberparleiter C. Proper folding of the antifungal protein PAF is required for optimal activity. *Res Microbiol*. 2005;156:35-46.
- Marx F, Binder U, Leiter É, Pócsi I. The *Penicillium chrysogenum* antifungal protein PAF, a promising tool for the development of new antifungal therapies and fungal cell biology studies. *Cell Mol Life Sci*. 2008;65:445-454.
- Meyer V, Stahl U. The influence of co-cultivation on expression of the antifungal protein in *Aspergillus giganteus*. *J Basic Microbiol*. 2003;43:68-74.

- Meyer V. A small protein that fights fungi: AFP as a new promising antifungal agent of biotechnological value. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2007;78:17-28.
- Miceli MH, Lee SA. Emerging moulds: epidemiological trends and antifungal resistance. *Mycoses.* 2011;54:e666-678.
- Molnár Z, Emri T, Zavaczki E, Pusztahelyi T, Pócsi I. Effects of mutations in the GanB/RgsA G protein mediated signalling on the autolysis of *Aspergillus nidulans*. *J Basic Microbiol.* 2006;46:495-503.
- Moreno AB, Martínez del Pozo Á, Borja M, San Segundo B. Activity of the antifungal protein from *Aspergillus giganteus* against *Botrytis cinerea*. *Phytopathology.* 2003;93:1344-1353.
- Moreno AB, Peñas G, Rufat M, Bravo JM, Estopa M, Messeguer J, San Segundo B. Pathogen-induced production of the antifungal AFP protein from *Aspergillus giganteus* confers resistance to the blast fungus *Magnaporthe grisea* in transgenic rice. *Mol Plant Microbe Interact.* 2005;18:960-972.
- Moreno AB, Martínez del Pozo Á, Segundo BS. Antifungal mechanism of the *Aspergillus giganteus* AFP against the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2006;72:883-895.
- Nucci M, Marr KA. Emerging fungal diseases. *Clin Infect Dis* 2005;15:521-526.
- Oberparleiter C, Kaiserer L, Haas H, Ladurner P, Andratsch M, Marx F. Active internalization of the *Penicillium chrysogenum* antifungal protein PAF in sensitive aspergilli. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47:3598-3601.
- Oldach KH, Becker D, Lörz H. Heterologous expression of genes mediating enhanced fungal resistance in transgenic wheat. *Mol Plant Microbe Interact.* 2001;14:832-838.
- Olsen JG, Flensburg C, Olsen O, Bricogne G, Henriksen A. Solving the structure of the bubble protein using the anomalous sulfur signal from single-crystal in-house Cu K α diffraction data only. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2004;60(Pt 2):250-255.

- Ouedraogo JP, Hagen S, Spielvogel A, Engelhardt S, Meyer V. Survival strategies of yeast and filamentous fungi against the antifungal protein AFP. *J Biol Chem.* 2011;286:13859-13868.
- Palicz Z, Jenes A, Gáll T, Miszti-Blasius K, Kollár S, Kovács I, Emri M, Márián T, Leiter E, Pócsi I, Csósz E, Kalló G, Hegedűs C, Virág L, Csernoch L, Szentesi P. *In vivo* application of a small molecular weight antifungal protein of *Penicillium chrysogenum* (PAF). *Toxicol Appl Pharmacol.* 2013;269:8-16.
- Parachin NS, Mulder KC, Viana AA, Dias SC, Franco OL. Expression systems for heterologous production of antimicrobial peptides. *Peptides.* 2012;38:446-456.
- Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE. UCSF Chimera – a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem.* 2004;13:1605-1612
- Pócsi I, Prade RA, Penninckx MJ. Glutathione, altruistic metabolite in fungi. *Adv. Microb. Physiol.* 2004;49:1–76.
- Rodríguez-Martín A, Acosta R, Liddell S, Núñez F, Benito MJ, Asensio MA. Characterization of the novel antifungal protein PgAFP and the encoding gene of *Penicillium chrysogenum*. *Peptides.* 2010;31:541-547.
- Ronen R, Sharon H, Levdansky E, Romano J, Shadkchan Y, Osherov N. The *Aspergillus nidulans* *pkcA* gene is involved in polarized growth, morphogenesis and maintenance of cell wall integrity. *Curr Genet.* 2007;51:321-329.
- Sali A, Blundell TL. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol.* 1993;234:779-815.
- Sander C, Schneider R. Database of homology-derived protein structures and the structural meaning of sequence alignment. *Proteins.* 1991;9:56-68.
- Schwede, T, Kopp, J, Guex, N, Peitsch, MC. SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res.* 2003;31:3381-3385.
- Seibold M, Wolschann P, Bodevin S, Olsen O. Properties of the bubble protein, a defensin and an abundant component of a fungal exudate. *Peptides.* 2011;32:1989-1995.

- Semighini CP, Hornby JM, Dumitru R, Nickerson KW, Harris SD. Farnesol-induced apoptosis in *Aspergillus nidulans* reveals a possible mechanism for antagonistic interactions between fungi. *Mol Microbiol.* 2006;59:753-764.
- Shimizu K, Keller NP. Genetic involvement of a cAMP dependent protein kinase in a G protein signaling pathway regulating morphological and chemical transitions in *Aspergillus nidulans*. *Genetics.* 2001;157:591-600.
- Skouri-Gargouri H, Gargouri A. First isolation of a novel thermostable antifungal peptide secreted by *Aspergillus clavatus*. *Peptides.* 2008;29:1871-1877.
- Skouri-Gargouri H, Ben Ali M, Gargouri A. Molecular cloning, structural analysis and modelling of the AcAFP antifungal peptide from *Aspergillus clavatus*. *Peptides.* 2009;30:1798-1804.
- Sterflinger K, Pinzari F. The revenge of time: fungal deterioration of cultural heritage with particular reference to books, paper and parchment. *Environ Microbiol.* 2012;14:559-566.
- Szappanos H, Szigeti GyP, Pál B, Rusznák Z, Szűcs G, Rajnavölgyi É, Balla J, Balla Gy, Nagy E, Leiter É, Pócsi I, Hagen S, Meyer V, Csernoch L. The antifungal protein AFP secreted by *Aspergillus giganteus* does not cause detrimental effects on certain mammalian cells. *Peptides.* 2006;27:1717-1725.
- Szappanos H, Szigeti GyP, Pál B, Rusznák Z, Szűcs G, Rajnavölgyi É, Balla J, Balla Gy, Nagy E, Leiter É, Pócsi I, Marx F, Csernoch L. The *Penicillium chrysogenum*-derived antifungal peptide shows no toxic effects on mammalian cells in the intended therapeutic concentration. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2005;371:122-132.
- Taheri-Talesh N, Horio T, Araujo-Bazán L, Dou X, Espeso EA, Peñalva MA, Osmani SA, Oakley BR. The tip growth apparatus of *Aspergillus nidulans*. *Mol Biol Cell.* 2008;19:1439-1449.
- Theis T, Wedde M, Meyer V, Stahl U. The antifungal protein from *Aspergillus giganteus* causes membrane permeabilization. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47:588-593.

- Theis T, Marx F, Salvenmoser W, Stahl U, Meyer V. New insights into the target site and mode of action of the antifungal protein of *Aspergillus giganteus*. *Res Microbiol.* 2005;156:47-56.
- Thevissen K, Ferket KK, Francois IE, Cammue BP. Interactions of antifungal plant defensins with fungal membrane components. *Peptides.* 2003;24:1705-1712.
- Torralba S, Raudaskoski M, Pedregosa AM, Laborda F. Effect of cytochalasin A on apical growth, actin cytoskeleton organization and enzyme secretion in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology.* 1998;144:45-53.
- Van Dijck P. Nutrient sensing G protein-coupled receptors: interesting targets for antifungals? *Med Mycol.* 2009; 47:671-680.
- Váradi G, Tóth GK, Kele Z, Galgóczy L, Fizil Á, Batta G. Synthesis of PAF, an antifungal protein from *P. chrysogenum*, by native chemical ligation: native disulfide pattern and fold obtained upon oxidative refolding. *Chemistry.* 2013;19:12684-12692.
- Vila L, Lacadena V, Fontanet P, Martínez del Pozo Á, San Segundo B. A protein from the mold *Aspergillus giganteus* is a potent inhibitor of fungal plant pathogens. *Mol Plant Microbe Interact.* 2001;14:1327-1331.
- Wnendt, S, Ulbrich, N, Stahl U. Molecular cloning, sequence analysis and expression of the gene encoding an antifungal-protein from *Aspergillus giganteus*. *Curr Genet.* 1994;25:519-523.

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt köszönettel tartozom Prof. Dr. Vágvölgyi Csabának, hogy lehetővé tette szakdolgozóként és doktoranduszként végzett munkámat az SZTE TTIK Mikrobiológiai Tanszékén. Köszönetemet fejezem ki témavezetői munkájáért, hasznos szakmai tanácsaiért, támogatásáért.

Külön köszönet illeti témavezetőmet, Dr. Galgóczi Lászlót, hogy folyamatosan és lelkiismeretesen figyelemmel kísérte és segítette munkámat, áldozatos munkája, szakmai tanácsai és bátorítása nagyban hozzájárultak a dolgozat elkészüléséhez.

Köszönettel tartozom Dr. Takó Miklósnak (SZTE TTIK Mikrobiológiai Tanszék), Dr. Maróti Gergőnek és Dr. Lakatos Gergelynek (MTA SzBK Biokémiai Intézet) a fehérjetisztításban nyújtott segítségükért.

Köszönet illeti Dr. Kele Zoltánt (SZTE ÁOK Orvosi Vegytani Intézet) a fehérjeazonosításban nyújtott segítségéért.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Batta Gyulának és Fizil Ádámnak (DE TTK Szerves Kémiai Tanszék) és Dr. Borics Attilának (MTA SzBK Biokémiai Intézet) a fehérjeszerkezet-vizsgálatban nyújtott segítségükért.

Köszönet illeti Prof. Dr. Florentine Marx-Ladurnert (Innsbrucki Orvosi Egyetem, Molekuláris Biológiai Tanszék) a jelátviteli utakban mutáns *Aspergillus* törzsek rendelkezésünkre bocsátásáért és a velük kapott eredmények értelmezéséért.

Köszönet illeti továbbá Dr. Kovács Laurát, Homa Mónikát, Tóth Liliánát, Nacsafarkas Elvirát és Vörös Dórát a kísérletes munkák során nyújtott segítségükért, valamint Dr. Kocsubé Sándort a mikroszkópos képek elkészítésénél nyújtott segítségéért.

Köszönettel tartozom a 312-es labor és a Mikrobiológiai Tanszék összes munkatársának.

Külön köszönettel tartozom családomnak és páromnak, akik támogatásukkal biztosították a dolgozat elkészülését.