

Doktori Értekezés Tézisei

**A *Neosartorya fischeri* antifungális protein heterológ expressziója
és hatásmechanizmusának vizsgálata**

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

BEVEZETÉS

Az utóbbi két évtizedben folyamatosan emelkedett a fonalaszombák által okozott fertőzések esetszáma, aminek a háttérében a legyengült immunrendszerrel rendelkező betegek számának emelkedése és az antimikotikumokkal szemben rezisztens fonalaszomba-törzsek megjelenése áll. Annak ellenére, hogy napjainkban számos új fejlesztésű antifungális szert alkalmaznak terápiás célból, az immuszupresszált betegek fonalaszombák által okozott fertőzéseinek halálozási aránya az alkalmazott szertől és az immunszupresszió mértékétől függően 14% és 100% közé tehető. A patogén fonalaszombák hasonló felépítésbeli és fiziológiai tulajdonságokkal rendelkeznek, mint a humán gazda sejtjei, ami nagymértékben korlátozza a konvencionális antifungális szerek terápiás célú alkalmazhatóságát a lehetséges azonos támadáspontok és mellékhatások miatt. A fonalaszombák által okozott fertőzések az állatvilág számára is komoly problémát jelentenek, veszélyeztetve ezzel a biodiverzitást. A mezőgazdaság és az élelmiszeripar számára is nehézségeket okoz a fonalaszombák elleni küzdelem: a növénypatogén fonalaszombák évről évre jelentős termésveszteségeket okoznak, valamint az általuk termelt toxinok veszélyt jelenthetnek az emberek és állatok egészségére. Mindezekon felül a fonalaszombák kulturális örökségeink legfőbb kártevőiként léphetnek fel a múzeumokban, raktárakban és könyvtárakban. Károsíthatják a faszobrokat, festményeket, pergameneket. 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. Mindezek alapján napjainkban megnőtt az igény új, széles spektrumú, biztonságosan alkalmazható antifungális szerek kifejlesztése iránt.

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. 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. 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.

CÉLKITŰZÉSEK

Az utóbbi néhány évtizedben a fonalassgombák 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 tömlősgombák által termelt defenzinszerű antifungális proteinek.

A *Neosartorya fischeri* NRRL 181 jelű törzse által termelt *N. fischeri* antifungális protein (NFAP) hatékonyan gátlja néhány orvosi és mezőgazdasági szempontból fontos fonalassgomba 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.
2. Az NFAP szerkezetének vizsgálata *in silico* módszerekkel.
3. A *N. fischeri* által termelt NFAP és a *P. pastoris* által termelt hNFAP antifungális spektrumának összehasonlítása.
4. A hNFAP hatására létrejövő morfológiai változások és a protein lokalizációjának vizsgálata érzékeny gombafajban.
5. A hNFAP hatásmechanizmusának vizsgálata *A. nidulans* törzseken.

ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

DNS alapú technikák

- Plazmid DNS tisztítása
- Agaróz gélelektroforézis
- Polimeráz láncreakció (PCR)
- DNS fragmentumok tisztítása
- DNS szekvenálás
- Transzformáló vektor építése
- Baktérium transzformáció
- Élesztőgomba transzformáció

Fehérje alapú technikák

- Heterológ expresszió (*Easy Select Pichia Expression Kit*)
- Ioncserés kromatográfia
- Nátrium-lauril-szulfát poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE)
- Tömegspektrometria
- Kvadrupól repülési idő-tömegspektrometria (QTOF-MS)
- N-terminális fehérjeszekvenálás
- hNFAP elleni antiszérum termeltetése
- Western-blot

Nukleotid és aminosav szekvenciák elemzése

- Nukleotid és aminosav szekvenciák illesztése (ClustalW)

- *In silico* fehérje térszerkezetbecslés (MODELLER, Procheck, Disulfind)
- *In silico* fehérje szerkezetvizsgálat (SwissPDB Viewer, Chimera, PyMolx)

***In vitro* antifungális érzékenységvizsgálati technikák**

- Mikrodilúciós teszt

Mikroszkópos vizsgálatok

- Fény- és fluoreszcens mikroszkópos vizsgálatok
 - FUN-1 festés (*FUN-1 Viability Staining*)
 - Propídium-jodid (PI) festés
 - Apoptotikus/nekrotikus események detektálása (*Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit*)
 - Zöld fluoreszcens proteinnel konjugáltatott aktint expresszáló törzs vizsgálata
 - *Calcofluor white* festés
 - Immunfluoreszcens festés

EREDMÉNYEK

Az NFAP heterológ expressziója, tisztítása és azonosítása

Mivel az NFAP részletes tanulmányozásához (szerkezetvizsgálat NMR- és CD-spektroszkópia segítségével, hatásmechanizmus vizsgálata, szerkezet-hatásmód összefüggés vizsgálata) 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 (978 ± 201 $\mu\text{g/l}$) hatszorosa. 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 szekvenica szinten megegyező proteint szekretálni.

Az NFAP és hNFAP szerkezetének vizsgálata *in silico* módszerekkel

In silico módszerekkel előrejeleztük az NFAP térszerkezeti képét. A becsült szerkezeti kép alapján az NFAP a többi tömlősgomba 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 diszulfidhíd-mintázatát is, amely a többi közeli rokon fehérjére jellemző *abcabc* motívumot mutatja.

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 fonalagombák növekedését. Hatékonyan gátolták hat, az *Aspergillus* nemzetségbe (*A. fumigatus*, *A. niger*, *A. nomius*, *A. tamaraii*, *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 tesztejünkkel bizonyítottuk, hogy a *P. pastoris* KM71H képes antifungálisan aktív hNFAP-t termelni és a hNFAP antifungális hatékonysága megegyezik a natív NFAP-jével.

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 az integritás 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, elhaló 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 az *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 sejtalba történő beépülésében, ezért *A. nidulans* FGSC A4 törzsön vizsgáltuk a hNFAP hatására bekövetkező változásokat a kitinelrendeződésben. A hNFAP hatására a sejtek normális „sapkaszerű” kitinmintázata helyett a kitin a hifák szubapikális régiójában lokalizálódott.

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.

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 hifaiban. 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 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.

A hNFAP hatásmechanizmusának vizsgálata

In vitro mikrodilúciós tesztekkel vizsgáltuk az *A. nidulans* FGSC A4 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.

ÖSSZEFOGLALÁS

Eredményeink összefoglalásául megállapíthatjuk, hogy:

1. Az általunk létrehozott *P. pastoris* alapú heterológ expressziós rendszer képes a hNFAP-t nagy mennyiségben, megfelelően érett formában, antifungálisan aktív állapotban megtermelni.
2. Az NFAP/hNFAP *in silico* vizsgálatok alapján β -hordó szerkezetet vesz fel, mely hasonlóságokat és különbségeket is mutat más tömlős fonalassomák által termelt antifungális fehérjékkel.
3. Az NFAP és a hNFAP antifungális hatékonyságában nincs szignifikáns különbség.
4. Már rövid idejű (30 perc), szubletális koncentrációjú (25 μ g/ml) hNFAP kezelés hatására csökken az *A. nidulans* FGSC A4 metabolikus aktivitása, és benne apoptotikus markerek jelennek meg. Tizenhat órán át tartó hNFAP-kezelés után, a sejtek membránjának megszűnik.
5. Már rövid idejű (30 perc), szubletális koncentrációjú hNFAP-kezelés megváltoztatja az *A. nidulans* FGSC A4 hifáinak aktinmintázatát, így a kitineloszlást is.
6. A hNFAP 16 óra után a hifák sejtfalának kitüremkedéseinél és a sejtek „törési pontjainál” intracellulárisan lokalizálódik, és vélhetően passzív transzport útján kerül be a sejtbe.
7. A hNFAP egy heterotrimer G-protein kapcsolt jelátviteli úton keresztül aktiválja a cAMP/Pka szignalizációs útvonalat, ami által zavarja a polarizált növekedést és apoptózist indukál.

8. A hNFAP egy eddig ismeretlen MpkA által aktivált célponton keresztül is képes apoptózist indukálni.

A DOLGOZAT ALAPJÁT KÉPEZŐ PUBLIKÁCIÓK

Referált folyóiratban megjelent publikációk

Virágh M, Marton A, Vizler C, Tóth L, Vágvölgyi C, Marx F, Galgóczy L. Insight into the antifungal mechanism of *Neosartorya fischeri* antifungal protein. *Protein Cell*. 2015;6:518-28. (IF₂₀₁₄=3,247)

Virágh M, Vörös D, Kele Z, Kovács L, Fizil Á, Lakatos G, Maróti G, Batta G, Vágvölgyi C, Galgóczy L. Production of a defensin-like antifungal protein NFAP from *Neosartorya fischeri* in *Pichia pastoris* and its antifungal activity against filamentous fungal isolates from human infections. *Protein Expr Purif*. 2014;94:79-84. (IF₂₀₁₄=1,695)

A dolgozat témájához kapcsolódó konferenciaösszefoglalók

Galgóczy L, **Virágh M**, Marx F, Tóth L, Marton A, Vizler Cs, Vágvölgyi Cs. (2014) Insight into the antifungal mechanism of *Neosartorya fischeri* NFAP. In: Cotoraci C, Ardelean A (szerk.) 16th Danube-Kris-Mures-Tisa (DKMT) Euroregion Conference on Environment and Health: Book of Abstracts. Supplement, 24.

Virágh M, Tóth L, Marx F, Vágvölgyi Cs, Galgóczi L. (2014) Further insight into the antifungal mechanism of *Neosartorya fischeri* NFAP. *Acta Microbiol Immunol Hung* 2015;62:122-123.

Virágh M, Vörös D, Kovács L, Kele Z, Fizil Á, Lakatos, G, Maróti G, Batta Gy, Vágvölgyi Cs, Galgóczy L. (2013) Heterologous expression of *Neosartorya fischeri* antifungal protein in *Pichia pastoris* and its antifungal activity against filamentous fungal isolates

from human infections. Acta Microbiol Immunol Hung 2013;60 Supplement, 259. (IF₂₀₁₃=0,778)

Virágh M, Kovács L , Takó M, Szekeres A, Vágvölgyi Cs, Galgóczy L. (2013) Heterologous expression of *Neosartorya fischeri* antifungal protein (NFAP) in *Pichia pastoris*. Acta Microbiol Immunol Hung 2013;60: 106-107. (IF₂₀₁₃=0,778)

Egyéb referált folyóiratban megjelent közlemények

2. Galgóczy, L., Kovács, L., Karácsony, Z., **Virágh, M.**, Hamari, Zs. and Vágvölgyi, Cs. (2013) Investigation of the antimicrobial effect of *Neosartorya fischeri* antifungal protein (NFAP) after heterologous expression in *Aspergillus nidulans*. Microbiology. 159, 411-419. (IF₂₀₁₂=3,173)

3. Galgóczy, L., **Virágh, M.**, Kovács, L., Tóth, B., Papp, T. and Vágvölgyi, Cs. (2013) Antifungal peptides homologous to the *Penicillium chrysogenum* antifungal protein (PAF) are widespread among Fusaria. Peptides. 39, 131-137. (IF₂₀₁₂=2,522)

4. Galgóczy, L., Tóth, L., **Virágh, M.**, Papp, T. and Vágvölgyi, Cs. (2012) In vitro interactions of amantadine hydrochloride, R-(-)-deprenyl hydrochloride and valproic acid sodium salt with antifungal agents against filamentous fungal species causing central nervous system infection. Acta Biol. Hung. 63, 490-500. (IF₂₀₁₂=0,504)

5. Kovács, L., **Virágh, M.**, Takó, M., Papp, T., Vágvölgyi, Cs. and Galgóczy, L. (2011) Isolation and characterization of *Neosartorya fischeri* antifungal protein (NFAP). Peptides. 32, 1724-1731. (IF₂₀₁₁=2,434)

6. Galgóczy, L., Bácsi, A., Homa, M., **Virágh, M.**, Papp, T. and Vágvölgyi, Cs. (2011) In vitro antifungal activity of phenothiazines and their combination with amphotericin B against different *Candida* species. Mycoses. 54, 737-743. (IF₂₀₁₁=2,247)

7. Galgóczy, L., Ördögh, L., **Virágh, M.**, Papp, T. and Vágvölgyi, Cs. (2009) In vitro susceptibility of clinically important Zygomycetes to combinations of amphotericin B and suramin. J. Mycol. Med. 19, 241-247. (IF₂₀₀₉=0,260)

Összesített impakt faktor: 16,082

Társszerzői nyilatkozat

Kijelentem, hogy Virágh Máté szerepe meghatározó jelentőségű volt a

Virágh M, Marton A, Vizler Cs, Tóth L, Vágvölgyi Cs, Marx F, Galgóczy L*. Insight into the antifungal mechanism of *Neosartorya fischeri* antifungal protein. Protein Cell. 2015;6:518-28.

Virágh M, Vörös D, Kele Z, Kovács L, Fizil Á, Lakatos G, Maróti G, Batta G, Vágvölgyi C, Galgóczy L*. Production of a defensin-like antifungal protein NFAP from *Neosartorya fischeri* in *Pichia pastoris* and its antifungal activity against filamentous fungal isolates from human infections. Protein Expr Purif. 2014;94:79-84.

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

*felelős szerző

.....

Dr. Galgóczi László

Innsbruck, Ausztria, 2015. Szeptember 7.