

DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**A *NEOSARTORYA FISCHERI* ANTIFUNGÁLIS PROTEIN 2 (NFAP2)
IZOLÁLÁSA ÉS JELLEMZÉSE**

TÓTH LILIÁNA

TÉMAVEZETŐK:

DR. GALGÓCZI LÁSZLÓ
TUDOMÁNYOS MUNKATÁRS

PROF. DR. VÁGVÖLGYI CSABA
TANSZÉKVEZETŐ EGYETEMI TANÁR

BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA



SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS INFORMATIKAI KAR
MIKROBIOLÓGIAI TANSZÉK

SZEGED

2018

BEVEZETÉS

Az utóbbi néhány évtizedben a gombafertőzések esetszáma folyamatosan emelkedik, ami egyre nagyobb kihívást jelent az egészségügy számára. Jelenleg is a *Candida* nemzetség tagjai állnak leggyakrabban az invazív gombafertőzések háttérében. Ezek az élesztők általában könnyen kezelhető, önmaguktól megszűnő nyálkahártya candidiázist okoznak immunkompetens egyénekben, azonban a legyengült immunrendszerű páciensekben ez magas halálozási rátát mutató, szisztémás fertőzéssé alakulhat. A kezelés során alkalmazott antifungális szerekkel (elsősorban azol és echinokandin) szemben egyre több rezisztens, illetve multirezisztens *Candida* törzsről számolnak be a szakirodalomban. Mindezek alapján szükségessé vált, a gyógyászatban rutinszerűen alkalmazott, gombaellenes szerek mellett új, alternatív antifungális stratégiák bevezetése.

Az antifungális aktivitással rendelkező természetes eredetű peptidok és proteinek, illetve szintetikus származékaik új, a gombafertőzések kezelésére alkalmazható szerek alapjául szolgálhatnak. Erre a célra, a fonalas tömlősgomba-eredetű ciszteinben gazdag antifungális proteinek (cgAFP) kedvező tulajdonságaik alapján (széles antifungális spektrum, stabilitás extrém környezeti körülmények között, alacsony vagy nem létező toxicitás emlős- és növénysejtekkel szemben) megfelelhetnek. A jelenleg 13 izolált és jellemzett képviselővel rendelkező csoport elsősorban a mezőgazdasági és egészségügyi szempontból fontos patogén fonalgombákkal szemben mutat növekedésgátló hatást, míg az élesztőgombák ellen csupán néhány esetben írtak le gyenge antifungális aktivitást. Ezek alapján a fehérjecsoport élesztőgombákkal szembeni gyakorlati alkalmazása megkérdőjelezhető.

CÉLKITŰZÉSEK

Előzetes kísérleteinkben megfigyeltük, hogy a minimál tápoldatban tenyésztett *Neosartorya fischeri* NRRL 181 fermentleve és annak fehérjetartalma gátolja az élesztőgombák növekedését. Doktori munkám témájaként az élesztőellenes, antifungális hatás háttérében álló protein azonosítását és jellemzését választottuk, amelyet *Neosartorya fischeri* antifungális protein 2-nek (NFAP2) neveztünk el. Az NFAP2 tanulmányozása tovább bővítheti a cgAFP-kről már meglévő ismereteinket és a *Candida* fajok okozta fertőzések kezelésére hatékonyan alkalmazható új terápiás stratégiák kifejlesztését teheti lehetővé.

Mindezek alapján a következő konkrét célokat fogalmaztuk meg:

- A *Neosartorya fischeri* NRRL 181 jelű izolátum által termelt élesztőellenes protein (NFAP2) izolálása, azonosítása és *in silico* vizsgálata.
- Az NFAP2 filogenetikai kapcsolatainak feltárása.
- Az NFAP2 hatékonyságának és hatásmechanizmusának tanulmányozása.
- Az NFAP2 hőstabilitásának és szerkezetének vizsgálata.
- Az NFAP2 nagy mennyiségben történő előállítása *Penicillium chrysogenum*-alapú heterológ expressziós rendszerben.
- Az NFAP2 kémia szintézise.
- A rekombináns és szintetikus NFAP2 antifungális hatásának vizsgálata.
- Az NFAP2 funkcionális térképezése.
- A rekombináns és szintetikus NFAP2 szerkezetének vizsgálata.

ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

DNS alapú technikák

- Genomi DNS tisztítása
- Agaróz gélelektroforézis
- Polimeráz láncreakció (PCR)
- Transzformáló vektor építése
- Fonalasgomba-transzformáció

Fehérje alapú technikák

- Heterológ expresszió
- Kémia peptidszintézis (szilárd fázisú)
- Kationcserés kromatográfia
- Nátrium-lauril-szulfát poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE)
- Fordított fázisú nagy teljesítményű folyadékkromatográfia (RP-HPLC)
- Elektrospray ionizációs tömegspektrometria (ESI-MS)
- Kvadrupól repülési idő-tömegspektrometria (Q-TOF MS)
- Mágneses magrezonancia spektroszkópia (NMR)
- Cirkuláris dikroizmus spektroszkópia (ECD)
- *In silico* fehérje tulajdonság meghatározás (BioEdit, ExPASy ProtParam tool, Protein Calculator, PSIPRED, DISULFIND, SignalP1)
- Filogenetikai analízis (BLAST, PRANK, FastGap, Maximum-Likelihood)

***In vitro* antifungális proteinek és hatóanyag-kombinációk iránti érzékenység vizsgálata:**

- Mikrodilúciós módszer (CLSI M27-A3)
- *Checkerboard* titrálás

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)

EREDMÉNYEK

1. A *Neosartorya fischeri* NRRL 181 jelű izolátum által termelt élesztőellenes protein (NFAP2) izolálása, azonosítása és *in silico* vizsgálata

Munkánk első lépéseként a *Neosartorya fischeri* NRRL 181 fermentlevéből egy, a korábbi vizsgálatok során élesztőellenes aktivitást mutató, 5,6 kDa méretű fehérjét izoláltunk. A Q-TOF tömegspektrometria segítségével végzett móltömeg-mérés alapján a fehérje pontos monoizotópos molekulatömege 5555,5513 Da-nak adódott. Az enzimatikusan emésztett protein MS analíziséből származó tömegadatokat felhasználásával elvégzett vizsgálatok eredményeként egy nem-jellemzett hipotetikus fehérjét azonosítottunk, amit *Neosartorya fischeri* antifungális protein 2-nek (NFAP2) neveztünk el. Az *in silico* vizsgálatok során kimutattuk, hogy az érett NFAP2 52 aminosavból álló, 5564,3 Da átlagos molekulatömegű, ciszteiben gazdag bázikus (pI=9,02), hidrofíl (GRAVY = -0,731) és pozitívan töltött molekula (nettó töltése pH 7,0 = +5,2), amit három, „*abcabc*” mintázatba rendeződő diszulfid-híd stabilizál.

2. Az NFAP2 filogenetikai kapcsolatainak feltárása

Az érett NFAP2 aminosav-szekvenciája 11-23%-os azonosságot mutat a fonalas tömlősgombákból már leírt és izolált PAF- és BP-klasztert tartalmazó, cgAFP-vel. Az NFAP2 homológok keresése során a publikált Ascomycota genomokban 32 olyan fehérjeszekvenciát találtunk, amelyek nagymértékű hasonlóságot mutatnak az NFAP2-vel. A homológ NFAP2 fehérjék feltételezett érett formái 35-98%-os azonosságot mutatnak az NFAP2 aminosav-szekvenciájával. Filogenetikai analízisünk alapján a cgAFP-k és azok feltételezett homológjai három nagy csoportot alkotnak: a PAF-klasztert, a BP-klasztert, illetve az NFAP2-klasztert hordozó fehérjék csoportját.

3. Az NFAP2 hatékonyságának és hatásmechanizmusának tanulmányozása

Antifungális érzékenységi vizsgálataink során az NFAP2 9 élesztőgomba és 3 fonalagomba izolátum közül hatékonyan gátolta a 7 *Candida* izolátum (*C. albicans* ATCC 10231, *C. glabrata* CBS 138, *C. guilliermondii* CBS 566, *C. krusei* CBS 573, *C. lusitaniae*

CBS 6936, *C. parapsilosis* CBS 604, *C. tropicalis* CBS 94), a *Saccharomyces cerevisiae* SZMC 0644 és a *Schizosaccharomyces pombe* SZMC 0142 növekedését dózisfüggő módon. Ugyanakkor, a fonalagombák (*Aspergillus nidulans* FGSC A4, *Aspergillus niger* SZMC 601, *Rhizomucor miehei* CBS 360.92) rezisztensnek bizonyultak vele szemben. Legérzékenyebbnek a *S. cerevisiae* SZMC 0644 mutatkozott 24 óra inkubációt követően.

A letális és szubletális koncentrációban alkalmazott NFAP2 *mid-log* fázisú *S. cerevisiae* SZMC 0644 sejteken kiváltott antifungális hatásának mikroszkópos vizsgálata során a protein nem indukált apoptózist és nem okozott változást a metabolikus aktivitásban rövid időtartamon belül, viszont roncsolta a plazmamembránt. A szubletális koncentrációjú NFAP2-kezelt mintákban a PI-pozitív sejtek száma 16 órát követően szignifikánsan magasabb volt a kezeletlen kontrollhoz képest, míg az élesztősejtek letális koncentrációjú NFAP2-vel történő kezelése során, a kontroll és a kezelt mintákban jelenlévő piros fluoreszcenciát mutató sejtek száma között már 10 perces inkubációt követően szignifikáns különbség volt megfigyelhető.

4. Az NFAP2 hőstabilitásának és szerkezetének vizsgálata

Az NFAP2 oldat hőmérsékletének 25 °C-ról folyamatosan 95 °C-ra történő emelését követően az NFAP2 megőrizte a *S. cerevisiae*-vel szemben mutatott antifungális aktivitását, azonban a minimális gátló koncentráció (MIC) érték egy felező hígítási léptékkel növekedett.

A fehérje diszulfid-hidakkal stabilizált, kompakt szerkezetét RP-HPLC analízissel bizonyítottuk, amely során az NFAP2 a PAF-hoz hasonlóan hamar lemosódott a fordított fázisú oszlopról, ami arra utal, hogy a kompakt PAF-éval megegyező diszulfid-híd mintázattal („*abcabc*”) rendelkezik. Az ECD spektroszkópiával végzett szerkezeti és hőstabil tulajdonságok vizsgálata során az NFAP2 25 °C-on mért ECD spektruma a PAF és más, diszulfid-hidakkal stabilizált, β -szerkezetű fehérjék spektrumával megegyező tulajdonságokat mutatott. A fehérjeoldat 25 °C-ra történő visszahűtését követően a protein mérsékelt szerkezeti visszarendeződése volt megfigyelhető, azonban ez a visszarendeződés még négy héttel a hőkezelés után sem volt teljes. A termális letekeredési görbék alapján a protein feltekeredett szerkezete 70 °C-ig sértetlen marad, azonban a termális denaturáció irreverzibilis.

5. Az NFAP2 nagy mennyiségben történő előállítás *Penicillium chrysogenum*-alapú heterológ expressziós rendszerben

Munkánk során létrehoztunk egy *P. chrysogenum*-alapú heterológ expressziós rendszert, amely lehetővé tette a rekombináns NFAP2 (rNFAP2) nagy mennyiségben történő

előállítását. Az rNFAP2-kihozatal átlaga $15 \pm 1,2$ mg/l ($n=2$) volt, amely az eredeti termelő *N. fischeri* NRRL 181-gyel elérhető fehérjekihozatal negyvenszerese (368 ± 19 μ g/l, $n=5$). Az NFAP2-termelő *P. chrysogenum* fermentlevéből tisztított rNFAP2 ESI-MS analízise megerősítette, hogy a tisztított fehérje monoizotópos molekulatömege 5555,5 Da, ami megfelel az NFAP2 korábban mért monoizotópos molekulatömegének (5555,6 Da).

6. Az NFAP2 kémiai szintézise

Az NFAP2 további vizsgálatához szilárd fázisú peptidszintézissel létrehozott NFAP2 fragmensek natív kémiai ligációval történő összekapcsolásával szintetikus NFAP2-t (szNFAP2) állítottunk elő. Az szNFAP2 létrejöttét ESI-MS analízissel ellenőriztük, ami kimutatta, hogy a ligáció során kapott termék monoizotópos molekulatömege 5554,7 Da, ami megfelel a három diszulfid-hidat tartalmazó natív NFAP2 monoizotópos molekulatömegének.

7. A rekombináns és szintetikus NFAP2 antifungális hatásának vizsgálata

Az rNFAP2 és szNFAP2 antifungális hatásának vizsgálatába az előbbi esetében 9, míg az utóbbinál 4 élesztőgomba izolátumot vontuk be. Mind a két protein az élesztőgombák teljes növekedésgátlását okozta alacsony ionerősségű tápoldatban, és nem volt különbség a két fehérje azonos gomba izolátummal szemben meghatározott MIC értéke között, ami megegyezett a natív NFAP2 esetében megfigyelttel. Az rNFAP2 MIC értékeit sztenderd klinikai mikrobiológiai körülmények között (CLSI M27-A3 módszer) is meghatároztuk RPMI 1640 tápoldatban, ami során a vizsgált koncentrációtartományon belül nem minden izolátumnál figyeltünk meg teljes növekedésgátlást (*C. glabrata* CBS 138, *C. guilliermondii* CBS 566, *C. parapsilosis* CBS 604), viszont jelentős 30-50%-os csökkenést igen (*C. albicans* ATCC 10231, *C. lusitaniae* CBS 6936, *C. tropicalis* CBS 94). Az rNFAP2 FLK-val végzett kombinációs kísérlete során *C. albicans* (ATCC 10231) és *C. parapsilosis* (CBS 604) esetében a két szer között szinergista, míg *C. krusei* (CBS 573) esetében indifferens kölcsönhatást figyeltünk meg.

8. Az NFAP2 funkcionális térképezése

Az NFAP2 funkcionális térképezéséhez szilárd fázisú peptidszintézis alkalmazásával szintetikus peptidfragmenseket állítottunk elő. A két fél (Fragmens 1 és 2, Fr-1 és Fr-2) és a négy negyed (Fragmens 3-6, Fr-3-6) peptidfragmens teljes egészében lefedte az érett NFAP2 teljes szekvenciáját. A szintetikus peptidfragmensek gombaellenes hatásának *in vitro* mikrodilúciós tesztben elvégzett vizsgálata során csak az Fr-2 és az Fr-4 peptidfragmensek mutattak dóziszfüggő, antifungális aktivitást a vizsgálatba bevont 4 élesztőgomba izolátum ellen (*C. albicans* ATCC 10231, *C. krusei* CBS 573, *C. parapsilosis* CBS 604, *S. cerevisiae*

SZMC 0644), azonban magasabb MIC értékeket figyeltünk meg, mint a teljes hosszúságú NFAP2 esetében. További vizsgálatokhoz előállítottuk az Fr-2 és az Fr-4 kevert aminosavsorrendű változatait is (Kr-Fr-2 és Kr-Fr-4) és vizsgáltuk az antifungális hatékonyságukat. Mindkét változat az Fr-2 és Fr-4 esetében megfigyelt gátló potenciált és MIC értéket mutatta.

Az NFAP2 plazmamembránroncsoló hatásának bizonyítására PI-festéssel vizsgáltuk az Fr-2, Fr-4, kevert változataik (Kr-Fr-4 és Kr-Fr-2) és az Fr-3 (evolúciósan konzervált γ -core régió, ami a növényi és állati antimikrobiális peptidekben és proteinekben funkcionális vagy szerkezeti szerepet játszik) *C. albicans* ATCC 10231 sejtekre gyakorolt hatását, összehasonlítva a teljes hosszúságú proteinnel. A MIC értéknél alkalmazott Fr-2, Fr-4 és kevert aminosavsorrendű változataik 10 percen belül plazmamembránroncsoló hatást fejtettek ki a sejteken, hasonlóan a szintén MIC értéknél alkalmazott natív NFAP2-höz. Ezzel szemben az NFAP2 γ -core régiót tartalmazó Fr-3 peptidfragens nem mutatott plazmamembránroncsoló hatást. Az eredmények alapján feltételezhetően az NFAP2 N-terminális középső régiója felelős az antifungális hatás kiváltásáért. *In silico* másodlagos szerkezetvizsgálatok alapján ez a régió feltekeredett harmadlagos szerkezet esetén is egy, a molekula külső részén elhelyezkedő, könnyen hozzáférhető hurkot hoz létre, ami képes lehet elektrosztatikusan kapcsolódni az érzékeny gomba sejtmembránjának negatívan töltött részeihez.

9. A rekombináns és szintetikus NFAP2 szerkezetének vizsgálata

Az rNFAP2 és szNFAP2 feltekeredett szerkezetének és az NFAP2-ével megegyező diszulfid-híd mintázatának igazolására alkalmazott RP-HPLC analízis eredményeként az rNFAP2 és az szNFAP2 esetében ugyanazt a retenciós időt észleltük, mint a natív protein esetében, ami egyértelműen igazolja, hogy a rekombináns és szintetikus NFAP2 is a natívra jellemző feltekeredett szerkezettel és diszulfid-híd mintázattal rendelkezik.

A rekombináns és szintetikus NFAP2 másodlagos szerkezeti elemeinek, diszulfid-híd mintázatának és hőstabilitásának ECD spektroszkópia segítségével történő meghatározása során az NFAP2 minták ECD spektruma nagymértékű hasonlóságot mutatott a korábban vizsgált cgAFP-k spektrumához, ami alapján a fehérjék azonos másodlagos szerkezeti elemeket tartalmaznak eredettől függetlenül. Ezzel ellentétben a funkcionális térképezés során használt szintetikus peptidfragmensek ECD spektroszkópiás vizsgálata során megállapítottuk, hogy a fragmensek nem rendelkeznek másodlagos szerkezeti elemekkel. A termális letekeredési vizsgálatok alapján a natív, a rekombináns és a szintetikus NFAP2 natív

feltekeredett szerkezete 70 °C-ig intakt marad, és az ezután következő termális denaturáció reverzibilis.

A harmadlagos szerkezet és a szerkezeti dinamika nagyfelbontású vizsgálatához az előzetes NMR analízis során jelöletlen szNFAP2 és ¹³C/¹⁵N-jelölt rNFAP2 mintákat használtunk. A két vegyület ¹³C-HSQC típusú ujjenyomat-spektrumának vizsgálata alapján a két fehérje azonos felépítéssel és nagyon hasonló, feltekeredett térszerkezettel rendelkezik.

ÖSSZEFOGLALÁS

1. Izoláltunk és azonosítottunk egy új, ciszteinben gazdag élesztőellenes hatást mutató antifungális proteint a *Neosartorya fischeri* NRRL 181 fermentlevéből, amit NFAP2 neveztünk el.
2. Az NFAP2 és feltételezett homológjai a fonalas tömlősgomba-eredetű ciszteinben gazdag antifungális fehérjék egy új csoportját képezi, aminek az NFAP2 az első izolált és jellemzett képviselője.
3. Megállapítottuk, hogy a protein már kis koncentrációban alkalmazva hatékonyan gátolja klinikai szempontból jelentős, a *Candida* nemzetségbe tartozó fajok növekedését.
4. Az NFAP2 a korábban izolált és jellemzett ciszteinben gazdag antifungális proteinnel megegyező szerkezettel, diszulfid-híd mintázattal és hőstabilitással rendelkezik.
5. Sikeresen elkészítettünk egy, a rekombináns NFAP2 nagymennyiségű termelésére képes *P. chrysogenum*-alapú heterológ expressziós rendszert és kémiai szintézissel előállítottuk a szintetikus NFAP2-t.
6. A rekombináns és szintetikus protein összehasonlítása érdekében elvégzett vizsgálatok alapján a két protein a natív fehérjével megegyező tömeggel, másodlagos szerkezettel és antifungális hatással rendelkezik.
7. Megállapítottuk, hogy a rNFAP2 RPMI 1640 tápoldatban nagyobb minimális gátló koncentráció értékeket mutat, azonban a flukonazollal kombinációban alkalmazva képes szinergista kölcsönhatásba lépni.
8. A funkcionális térképezés alapján, az NFAP2 középső-N-terminális régiója felelős az antifungális aktivitásért, ami inkább függ a régió töltésétől és hidrofilitásától, mint az elsődleges szerkezetétől és a γ -core motívumot tartalmazó fehérjeszakasznak feltételezhetően szerkezetkialakító-szerkezetstabilizáló szerepe lehet.

A DOLGOZAT ALAPJÁT KÉPEZŐ PUBLIKÁCIÓK

Tóth Liliána MTMT azonosító: 10040828

Referált folyóiratban megjelent publikációk:

Tóth L, Kele Z, Borics A, Nagy LG, Váradi G, Virágh M, Takó M, Vágvölgyi C, Galgóczy L. (2016) NFAP2, a novel cysteine-rich anti-yeast protein from *Neosartorya fischeri* NRRL 181: isolation and characterization. AMB EXPRESS 6: Paper 75. (IF₂₀₁₆: 1,825)

Tóth L*, Váradi G*, Borics A, Batta G, Kele Z, Vendrinszky Á, Tóth R, Ficze H, Tóth KG, Vágvölgyi C, Marx F, Galgóczy L. (2018) Heterologous expression, chemical synthesis, anti-candidal activity and functional mapping of *Neosartorya fischeri* antifungal protein 2 (NFAP2). FRONTIERS IN MICROBIOLOGY, *submitted*, Manuscript ID: 350087

A dolgozat témájához kapcsolódó konferencia összefoglalók:

Váradi G, **Tóth L**, Nedeczky K, Vendrinszky Á, Borics A, Kele Z, Tóth KG, Vágvölgyi C, Marx F, Galgóczy L. (2017) Synthesis and functional mapping of the *Neosartorya fischeri* anti-yeast protein (NFAP2). ACTA MICROBIOLOGICA ET IMMUNOLOGICA HUNGARICA 64(1):186-187.

Tóth L, Váradi G, Nedeczky K, Vágvölgyi C, Marx F, Galgóczy L. (2017) A *Neosartorya fischeri* NFAP2 γ -core motívuma alapján tervezett peptidek élesztőellenes aktivitása. MIKOLÓGIAI KÖZLEMÉNYEK-CLUSIANA 56(1):147-148.

Tóth L, Tóth R, Borics A, Váradi G, Kele Z, Fekete L, Vágvölgyi C, Marx F, Galgóczy L. (2017) *Penicillium chrysogenum*-alapú heterológ expressziós rendszerben termelt rekombináns *Neosartorya fischeri* antifungális protein 2 (NFAP2) jellemzése. MIKOLÓGIAI KÖZLEMÉNYEK-CLUSIANA 56(1):24-26.

Tóth L, Tóth R, Fekete L, Kele Z, Vágvölgyi C, Marx F, Galgóczy L. (2017) Bulk production of the anti-yeast protein NFAP2 in *Penicillium chrysogenum*. 19th Danube-Kris-Mures-Tisa (DKMT) Euroregional Conference on Environment and Health: Program and abstracts. 65 p. (ISBN:978-963-306-535-8)

Tóth L, Kele Z, Nagy LG, Virágh M, Takó M, Vágvölgyi C, Galgóczy L. (2016) NFAP2, an anti-yeast protein from *Neosartorya fischeri* NRRL 181. In: A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2016. évi nagygyűlése és a XII. Fermentációs Kollokvium: absztraktkötet p. 61.

Galgóczy L, **Tóth L**, Kele Z, Nagy LG, Virágh M, Takó M, Vágvölgyi C. (2016) Isolation of a novel, cysteine-rich antifungal protein with anti-yeast activity from *Neosartorya fischeri* NRRL 181. IV International Conference on Antimicrobial Research - ICAR2016: Book of Abstracts. p. 21.

Tóth L, Borics A, Váradi G, Virágh M, Vágvölgyi C, Galgóczy L. (2016) Structural investigation of a novel cysteine-rich, anti-yeast protein from *Neosartorya fischeri* NRRL 181. 18th Danube-Kris-Mures-Tisa (DKMT) Euroregional Conference on Environment and Health: Book of abstracts pp. 59-60. (ISBN:978-86-6253-059-2)

Egyéb referált folyóiratban megjelent közlemények:

Homa M, Galgóczy L, Tóth E, **Tóth L**, Papp T, Chandrasekaran M, Kadaikunnan S, Alharbi NS, Vágvölgyi C. (2015) In vitro antifungal activity of antipsychotic drugs and their combinations with conventional antifungals against *Scedosporium* and *Pseudallescheria* isolates. MEDICAL MYCOLOGY 53(8):890-895. (IF₂₀₁₅: 2,644)

Virágh M, Marton A, Vizler C, **Tóth L**, Vágvölgyi C, Marx F, Galgóczy L. (2015) Insight into the antifungal mechanism of *Neosartorya fischeri* antifungal protein. PROTEIN & CELL 6(7):518-528. (IF₂₀₁₅: 3,817)

Galgóczy L, Virágh M, Kovács L, **Tóth L**, Vágvölgyi C. (2013) Potential applications of filamentous fungus derived β -defensin-like antifungal proteins in agriculture. REVIEW ON AGRICULTURE AND RURAL DEVELOPMENT 2(1):217-223. (IF₂₀₁₃:0,000)

Galgóczy L, **Tóth L**, Virágh M, Papp T, Vágvölgyi C. (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 BIOLOGICA HUNGARICA 63(4):490-500. (IF₂₀₁₂: 0,504)

Összesített impakt faktor: 8,79

TÁRSSZERZŐI NYILATKOZAT

Alulírott Dr. Váradi Györgyi kijelentem, hogy Tóth Liliána szerepe meghatározó jelentőségű volt a

Tóth L*, Váradi G*, Borics A, Batta G, Kele Z, Vendrinszky Á, Tóth R, Ficze H, Tóth KG, Vágvölgyi C, Marx F, Galgóczy L. (2018) Heterologous expression, chemical synthesis, anti-candidal activity and functional mapping of *Neosartorya fischeri* antifungal protein 2 (NFAP2). FRONTIERS IN MICROBIOLOGY, *submitted*, Manuscript ID: 350087

címmel megjelenő közleményben, így az értekezésben és a publikációban közölt eredményeket tudományos fokozat megszerzésére nem használtuk fel és ezt a jövőben sem teszem.

Szeged, 2018. január 22.

.....

Dr. Váradi Györgyi