

ANTIMIKROBIÁLIS PEPTIDEK PATOGÉN ÉLESZTŐGOMBÁKRA GYAKOROLT HATÁSA

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

SZERENCSÉS BETTINA

**TÉMAVEZETŐ: DR. PFEIFFER ILONA
EGYETEMI DOCENS**

BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA



**SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS INFORMATIKAI KAR
MIKROBIOLÓGIAI TANSZÉK**

SZEGED

2024

TARTALOMJEGYZÉK

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	4
2. BEVEZETÉS.....	6
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	8
3.1. Gombák okozta fertőzések jelentősége.....	8
3.2. Gombaellenes szerek	8
3.3. Gombaellenes szerekkel szembeni rezisztencia.....	11
3.3.1. A rezisztencia mechanizmusa.....	12
3.4. Antimikrobiális peptidek.....	15
3.4.1. Az antimikrobiális peptidek forrásai.....	15
3.4.2. Antimikrobiális peptidek szerkezete és hatásmechanizmusa	17
3.4.3. Antimikrobiális peptidek elleni rezisztencia.....	21
3.4.4. Antimikrobiális peptidek felhasználási lehetőségei.....	22
3.5. Gümőspecifikus ciszteinben gazdag peptidek	24
4. CÉLKITŰZÉS.....	26
5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	27
5.1. Felhasznált anyagok	27
5.1.1. Felhasznált törzsek.....	27
5.1.2. Vizsgált sejtvonalak	27
5.1.3. Tenyésztéshez használt tápoldatok, táptalajok, egyéb oldatok	27
5.1.4. Vizsgált peptidek.....	30
5.2. Alkalmazott módszerek	32
5.2.1. Sejtvonalak és élesztőgomba törzsek fenntartása, tenyésztése	32
5.2.2. Peptidek szintézise és elemzése	32
5.2.3. Antifungális hatás vizsgálata.....	33
5.2.4. Peptidek <i>Cr. neoformans</i> sejtek membrán permeabilitására gyakorolt hatásának vizsgálata áramlási citometriával.....	34
5.2.5. Citotoxicitás vizsgálat	35
5.2.6. Peptidek flukonazollal és más peptiddel történő kölcsönhatásának vizsgálata	36
5.2.7. Fertőzés, fagocitózis	37
5.2.8. Mikroszkópos vizsgálatok	37
5.2.9. Biofilm képződésre gyakorolt hatás vizsgálata	38
5.2.10. Peptidek protoplasztokra gyakorolt hatása	39
5.2.11. A peptidek hatása <i>Cr. neoformans</i> sejtek méretére.....	39
5.2.12. A peptidek sejten belüli lokalizációjának meghatározása	40
5.2.13. EMSA (Electrophoretic mobility shift assay)	40
5.2.14. Affinitás kromatográfiai vizsgálatok.....	41
5.2.15. Statisztikai analízis.....	42

5.2.16.	Adatelemzés	42
6.	EREDMÉNYEK	43
6.1.	Peptidek opportunistá humán patogén élesztőgombákra gyakorolt hatása	43
6.2.	<i>C. auris</i> sejtek kombinált kezelése peptid származékokkal és flukonazollal	47
6.3.	Peptidek sejtmembrán permeabilitására gyakorolt hatásának vizsgálata áramlási citometriával	48
6.4.	Peptidek sejten belüli lokalizációjának meghatározása <i>Cr. neoformans</i> sejtekben	49
6.5.	Az NCR peptidek nem, vagy csak mérsékelt citotoxicitást mutatnak humán keratinocitákon 50	
6.6.	Az NCR peptidek citotoxicitásának vizsgálata J774.2 makrofágokon	51
6.7.	Peptidek hatása J774.2 egér makrofágok fagocitáló képességére	53
6.8.	Az NCR335C ₁₇₋₃₃ és NCR169C ₁₇₋₃₈ peptidek gátolják a hifaforma képződését	55
6.9.	A peptidek hatása <i>C. albicans</i> és <i>C. tropicalis</i> biofilm képződésére.....	57
6.10.	Az NCR335C ₁₇₋₃₃ és NCR169C ₁₇₋₃₈ peptidek gátolják a fonális forma kialakulását a biofilmekben.....	59
6.11.	Peptidek hatása <i>Cr. neoformans</i> és <i>C. tropicalis</i> protoplasztokra	61
6.12.	Peptidek <i>Cr. neoformans</i> sejtek méretére gyakorolt hatása	62
6.13.	EMSA (Electrophoretic mobility shift assay).....	64
6.14.	Affinitás kromatográfiai vizsgálatok	65
7.	ÖSSZEFOGLALÁS	66
8.	SUMMARY	72
9.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	78
10.	IRODALOMJEGYZÉK	80
11.	MELLÉKLETEK	89

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ABC	<u>A</u> TP- <u>b</u> inding <u>c</u> assette (ATP-kötő kazetta)
ABELCET	<u>A</u> mphotericin <u>B</u> <u>L</u> ipid <u>C</u> omplex (amfotericin B lipid komplex)
AIM	<u>A</u> ccuracy in <u>M</u> edia
AmB	<u>A</u> mphotericin <u>B</u> (amfotericin B)
AMP	<u>A</u> ntimicrobial <u>P</u> eptide (antimikrobiális peptid)
AMR	<u>A</u> ntimicrobial <u>r</u> esistance (antimikrobiális rezisztencia)
ATCC	<u>A</u> merican <u>T</u> ype <u>C</u> ulture <u>C</u> ollection
ATP	<u>A</u> denozin-5'- <u>t</u> riphosphate (adenozin-5'-trifoszfát)
BALB/c	<u>B</u> agg <u>a</u> lbino
CBS	<u>C</u> entraal <u>b</u> ureau voor <u>S</u> chimmelcultures
CFU	<u>C</u> olony <u>f</u> orming <u>u</u> nit (telepképző egységek száma)
CW	<u>C</u> alcofluor <u>w</u> hite (kalkofluor fehér)
DAPI	4',6- <u>d</u> iamidino-2- <u>p</u> henyl <u>i</u> ndole (4',6-diamidino-2-fenil-indol)
DMEM	<u>D</u> ulbecco's <u>M</u> odified <u>E</u> agle <u>M</u> edium
DMSO	<u>D</u> imethyl <u>s</u> ulfoxide (dimetil-szulfoxid)
DTT	<u>D</u> ithiothreitol (ditiotreitól)
<i>ERG11</i>	<u>E</u> rgosterol gene 11 (lanoszterol 14- α -demetilázt kódoló gén)
ESKAPE	<u>E</u> nterococcus <u>f</u> aecium, <u>S</u> taphylococcus <u>a</u> ureus, <u>K</u> lebsiella <u>p</u> neumoniae <u>A</u> cinetobacter <u>b</u> aumannii, <u>P</u> seudomonas <u>a</u> eruginosa, <u>E</u> nterobacter <u>f</u> aecium
FACS	<u>F</u> luorescence <u>a</u> ctivated <u>c</u> ell <u>s</u> orting (fluoreszcencia-aktivált sejtválogatás)
FBS	<u>F</u> etal <u>b</u> ovine <u>s</u> erum (magzati borjú szérum)
FIC	<u>F</u> ractional <u>i</u> nhibitory <u>c</u> oncentration (frakcionált gátló koncentráció)
FICI	<u>F</u> ractional <u>i</u> nhibitory <u>c</u> oncentration <u>i</u> ndex
FITC	<u>F</u> luorescein <u>i</u> sothiocyante (fluoreszcein-izotiocianát)
<i>FKS1/2</i>	<u>F</u> K506 <u>s</u> ensitivity (β -glükán szintáz komplex egyes tagjait kódoló gének)
Go	<i>Galega orientalis</i>
HaCaT	<u>H</u> uman <u>k</u> eratinocytes (humán keratinocita)
HIV	<u>H</u> uman <u>I</u> mmunodeficiency <u>V</u> irus (humán immundeficiencia vírus)
IFO	<u>I</u> nstitute for <u>F</u> ermentation, <u>O</u> saka, Yodogawa-ku, Osaka, Japan
IFM	Research Center for Pathogenic Fungi and Microbial Toxicoses, Chiba University, Chiba, Japan
J774.2	Egér makrofág sejtvonal neve

MALDI	<u>M</u> atrix- <u>a</u> ssisted <u>l</u> aser <u>d</u> esorption/ <u>i</u> onization
MALDI-TOF	<u>M</u> atrix- <u>a</u> ssisted <u>l</u> aser <u>d</u> esorption/ <u>i</u> onization- <u>t</u> ime <u>o</u> f <u>f</u> light
MDR	<u>M</u> ultidrug <u>r</u> esistance (multidrog rezisztencia)
<i>MDR1</i>	<u>M</u> ultidrug <u>r</u> esistance protein 1 coding gene
MFS	<u>M</u> ajor <u>f</u> acilitator <u>s</u> uperfamily (transzporter család elnevezése)
MIC	<u>M</u> inimal <u>i</u> nhibitory <u>c</u> oncentration (minimális gátló koncentráció)
MOPS	3-(<u>N</u> - <u>M</u> orpholino) <u>p</u> ropane <u>s</u> ulfonic acid
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NCR	<u>N</u> odule-specific <u>C</u> ysteine- <u>R</u> ich peptide (gümő-specifikus cisztein-gazdag peptid)
OD	<u>O</u> ptical <u>D</u> ensity (Optikai denzitás)
PBS	<u>P</u> hosphate <u>b</u> uffered <u>s</u> aline (foszfát pufferelt só oldat)
PI	<u>P</u> ropidium <u>i</u> odide (propídium-jodid)
pI	Izoelektromos pont
PMSF	<u>P</u> henylmethylsulfonyl fluoride (fenil-metil-szulfonil-fluorid)
Ps	<i>Pisum sativum</i>
ROS	<u>R</u> eactive <u>o</u> xygen <u>s</u> pecies (reaktív oxigén szabadgyök)
RP-HPLC	<u>R</u> eversed <u>p</u> hase <u>h</u> igh performance <u>l</u> iquid <u>c</u> hromatography (fordított fázisú nagy teljesítményű folyadékkromatográfia)
rpm	<u>r</u> evolutions <u>p</u> er <u>m</u> inute (fordulat per perc)
RPMI	<u>R</u> oswell <u>P</u> ark <u>M</u> emorial <u>I</u> nstitute
SC	Squibb Institute for Medical Research, New Brunswick, NJ, US
SDS	<u>S</u> odium- <u>d</u> odecyl- <u>s</u> ulphate (nátrium-dodecil szulfát)
SDS-PAGE	<u>S</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfate <u>p</u> olyacrylamide <u>g</u> el <u>e</u> lectrophoresis (nátrium-dodecil-szulfát-poliakrilamid gélelektroforézis)
SEM	<u>S</u> canning <u>E</u> lectron <u>M</u> icroscope (Pásztázó elektronmikroszkóp)
Strep	<u>S</u> treptavidin
SZMC	<u>S</u> zeged <u>M</u> icrobiological <u>C</u> ollection
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane (Tris-(hidroximetil)-aminometán)
UV	<u>U</u> ltraviolet (Ultraviola)
XTT	2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide
YNB	<u>Y</u> east <u>N</u> itrogen <u>B</u> ase (élesztőkivonat-nitrogén-alap)
YPD	<u>Y</u> east <u>p</u> eptone <u>d</u> extrose (élesztőkivonat-pepton-glükóz)

2. BEVEZETÉS

A gombák okozta fertőzések nem csak a humán gyógyászatban, hanem a mezőgazdaságban, valamint az élelmiszer- és a fermentációs iparban is nagy problémát jelentenek, mivel a megbetegedések száma, valamint a patogén gombák elterjedési területének mérete is növekszik a klímaváltozás hatására. A humán fertőzést kiváltani képes gombák nagy része opportunistá patogén, vagyis egészséges immunrendszerrel rendelkező egyéneknél nem okoznak kóros folyamatokat, azonban az immunrendszer bármely okból történő gyengülése lehetőséget jelent betegség kialakulására.

A gombák okozta fertőzések gyakorisága jelentősen megnőtt az elmúlt évtizedekben, viszont az ismert gombaellenes szerek száma változatlanul kevés és hosszan tartó alkalmazásuk során káros mellékhatások léphetnek fel, illetve használatukat gyakran korlátozza a velük szemben fellépő rezisztencia. Az Egészségügyi Világszervezet szerint az antibiotikum-rezisztencia (AMR) kialakulása és terjedése globális közegészségügyi problémát jelent. Becslések szerint világszerte évente több mint 700.000 ember hal meg multidrog rezisztens (MDR) kórokozók által okozott fertőzések következtében. Ez a szám 2050-re évente több mint 10 millióra emelkedhet. Humán patogén gombák közül a multiázol rezisztens *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, valamint *Candida glabrata* magas mortalitással járó fertőzések kiváltására képesek. Mellettük az elmúlt évtizedben megjelent a klinikumban egy új, multidrog rezisztens faj, a *Candida auris*, mely az antifungális szerek több különböző osztályába tartozó hatóanyaggal szemben is ellenálló, így nehezen kezelhető, és sokszor magas halálozási aránnyal járó kórfolyamatot okoz.

Az MDR kórokozók megjelenése, valamint az ismert antibiotikumokkal végzett monoterápia sikertelensége miatt az utóbbi években növekvő igény van új, természetes forrásból származó vagy szintetikus úton előállított, lehetőleg új hatásmechanizmussal rendelkező gombaellenes szerek kifejlesztésére. Ezek a vegyületek származhatnak természetes forrásból, vagy lehetnek mesterséges vegyületek, utóbbiak közé tartoznak a széles hatásspektrummal rendelkező nanorészecskék. A nanorészecskék, az 1-100 nm mérettartományba eső részecskék, különösen az ezüst nanorészecskék, széleskörű antimikrobiális hatással rendelkeznek, így patogén gomba ellenes hatásuk is figyelemre méltó [1], ezért ígéretes jelöltek gomba ellenes szerek fejlesztésére. Másik lehetőség már ismert, antifungális aktivitással is rendelkező vegyületek vagy ezek módosított, fokozott gomba-ellenes hatású származékainak alkalmazása [2-4].

A természetes vegyületek kevésbé terhelik a környezetet és az emberi szervezetre nézve is kevésbé károsak, mint a szintetikus úton előállítottak, így a felhasználók szempontjából kedvezőbb a megítélésük. Ilyen természetes vegyületek lehetnek állatok, növények vagy gombák által termelt másodlagos anyagcseretermékek. Ezek közé tartoznak az antimikrobiális peptidek (AMP), melyek a jelenleg használt antibiotikumok legígéretesebb alternatívái lehetnek. Az elmúlt években megismert antifungális hatású AMP-ek [5] fontos új lehetőséget jelentenek gombaellenes terápia fejlesztésében is.

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1. Gombák okozta fertőzések jelentősége

A gombák nem csak embereket, hanem állatokat és növényeket is fertőzhetnek, így jelentős gazdasági károkat eredményeznek. A termés közel egy harmada semmisül meg évente növénypatogén gombák okozta fertőzések következtében, így e fajok közvetve szintén hatással vannak az emberek jólétére és egészségére [6].

A gombák okozta humán betegségek egyre gyakoribbak, különösen az immunszuppresszált betegek körében, és súlyos közegészségügyi problémát jelentenek. Az invazív gombafertőzések nagy részét *Aspergillus*, *Candida*, *Cryptococcus* és *Pneumocystis* fajok okozzák [7]. Ezen fertőzések kezelése sokszor okoz problémát, e miatt a halálozási arány általában magas.

Az élesztőgombák a gombafajok kevesebb, mint 10%-át képviselik. A ma ismert élesztőgombáknak kevesebb, mint 1%-a emberi kórokozó, közülük a *Candida albicans* a leggyakoribb. Az általa okozott betegség, a kandidiázis, leginkább a nyálkahártyát, ritkábban a belső szerveket érinti. Okozója az esetek 80%-ában a *C. albicans*, de ritkábban néhány más *Candida* faj (*C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*) is hasonló tüneteket okozhat. A legnagyobb halálozási aránnyal rendelkező élesztőgomba-okozta betegség a cryptococcosis, melynek kiváltója a *Cryptococcus neoformans* [8].

3.2. Gombaellenes szerek

A gombák az állati sejtekhez - beleértve az emberi sejteket is -, hasonlóan eukarióta felépítésűek, így nagyfokú köztük a hasonlóság. Ez az oka annak, hogy a humán patogén gombák ellen használt szerek szelektív célpontjai korlátozottak. A legmeghatározóbb különbség a két sejtípus közt a gombasejtek sejtfa, ami gombaellenes szerek célpontja lehet. Az élesztőgombák sejtfa kitinből, β -glükánból és mannoproteinből álló többrétegű szerkezet [9-11]. A külső rétegek mannánból, mannoproteinből és β -(1,6)-glükánból állnak, míg a belső rétegek alkotói túlnyomó részt a β -(1,3)-glükán és a mannoproteinek [12]. A gomba és az állati sejtek között különbséget tapasztalunk a sejtmembrán összetételében is. Míg a gombák sejtmembránjában specifikusan ergosterolt találunk [13], az állati sejtek membránjának alkotóeleme a koleszterol.

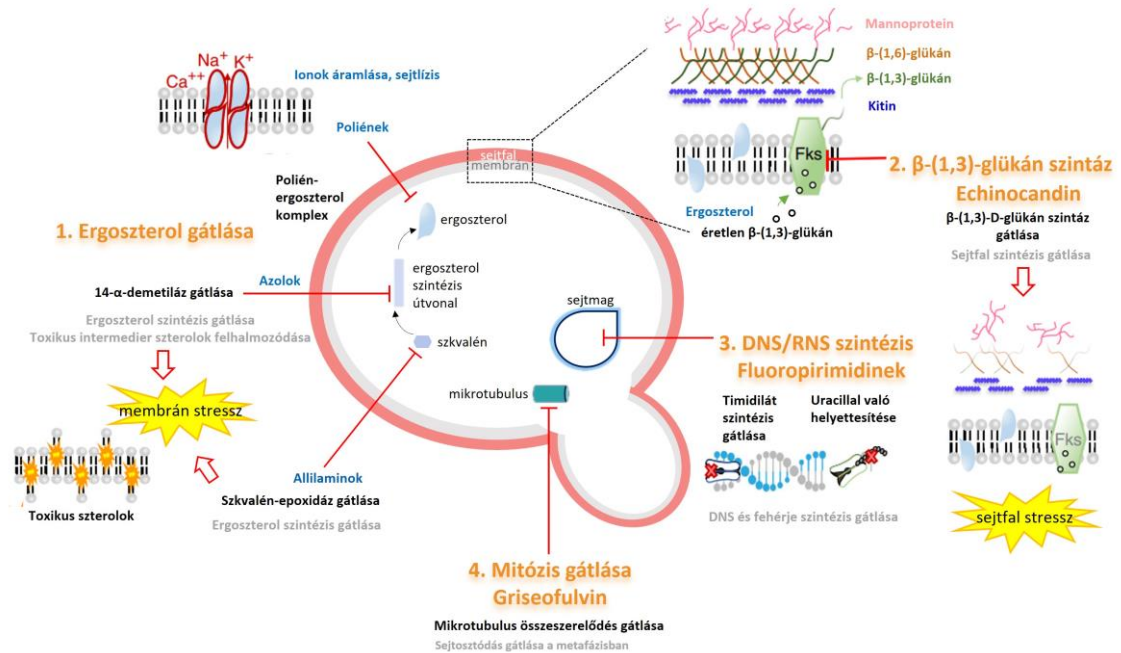
A gombaellenes szerek egy része a sejtfa bioszintézisre fejt ki hatását, nagyobb részük célmolekulája ugyanakkor az ergosterol. Azon antifungális szerek, melyek

célmolekulája az ergoszterol, hatásmechanizmusuk alapján több nagy csoportba sorolhatók: az azolok (imidazol, valamint triazol származékok) és az allilaminok gátolják az ergoszterol szintézisét; a polién makrolidek fizikai-kémiai úton kölcsönhatásba lépnek a gomba sejtmembránban lévő szterinekkal és velük komplexet alkotva pórusokat hoznak létre a sejtmembránban. A gombaellenes szerek közé tartozik még az 5-fluorocitozin, ami gátolja a nukleinsav szintézist; valamint a griseofulvin, ami a mitótikus apparátus működésén keresztül a sejtosztódásra fejt ki hatását.

Közel 30 évig a komoly gombás fertőzések kezelésének egyedüli gyógyszere a poliének közé tartozó széles spektrumú amfotericin B (AmB) volt. Az amfotericin B és más polién makrolid antibiotikumok a sejtmembrán permeabilitását fokozzák, ionkiáramlás révén pusztítva el a gombasejtet. Bár az amfotericin B a leghatékonyabb gombaellenes szer, nagy hátránya, hogy csak intravénásan adható és nefrotoxikus hatással rendelkezik. Toxikus mellékhatása függ a terápiás dózistól, azonban a kis terápiás index továbbra is korlátozza klinikai alkalmazhatóságát [14-17]. Az amfotericin B toxikusságát az okozza, hogy bár nagy specifitással kötődik a gomba sejtmembránban található ergoszterolhoz, de képes az emlős sejtmembránban lévő koleszterolhoz is kapcsolódni. A nem kívánatos hatások csökkentése érdekében az amfotericin B-t liposzómákba csomagolják, hogy lehetővé tegyék nagyobb dózis bejuttatását a szervezetbe [18, 19]. Számos amfotericin B-liposzóma készítményt fejlesztettek ki, köztük az ABELCET-et, az Amphoteck-et és az AmBisome-ot. A polién antibiotikumokra, mint az amfotericin B és a nystatin, ritkán fordul elő rezisztencia, ez is leginkább a kevésbé gyakori *Candida* fajokra korlátozódik, mint a *C. lusitanae*, a *C. glabrata* vagy a *C. guilliermondii* [20].

Az azolok – imidazolok és a triazolok – humán terápiában való használatának jóváhagyása az 1980-as évek végén és az 1990-es évek elején jelentős előrelépést jelentett a helyi és szisztémás gombás fertőzések biztonságos és hatékony kezelésében. Az azolok elsődleges célpontja a hem fehérje, amely katalizálja a citokróm P450-függő 14- α -demetiláz képződését. Az enzim működése esszenciális a lanoszterol ergoszterollá történő átalakításához [21]. A 14- α -demetiláz gátlása az ergoszterol tartalom kimerüléséhez és a szterol prekursorok felhalmozódásához vezet, beleértve a 14- α -metilezett szterolokat (lanoszterol), ami módosított szerkezetű és funkciójú plazmamembrán kialakulását eredményezi (**1. ábra**). A szterol molekula 4-es szénatomjának demetilációja a membrán integritás fenntartásának feltétele. Bár az újabb azol származékok mindegyike 14- α -demetiláz inhibitor, ezen antifungális szerek között heterogén kölcsönhatás lép fel [22]. A korábbi imidazol származékok (például a

mikonazol, eakonazol, clotrimazol és a ketokonazol) komplex hatásmechanizmussal rendelkeznek, számos membránhoz kötött enzim működését és membránlipid bioszintézisét gátolják [23]. Mind az imidazol, mind a triazol (flukonazol, itrakonazol, terconazol, vorikonazol) származékok közt találunk szisztémás mikózisok esetén alkalmazhatókat, de vannak származékok, melyek csak felszíni kezelések esetében használatosak, ilyenek a clotrimazol és a mikonazol, valamint a terconazol.



1. ábra: Antifungális szerek és hatásmódjuk [24]

Az allilaminok az ergoszterol bioszintézisét gátolják, ami elsősorban a szkvalén-epoxidáz enzim gátlásán keresztül érvényesül. Ez az enzim, amelyet az *ERG1* gén kódol, a (2,3)-oxidoszkvalén-ciklázsal együtt felelős a gombákban az ergoszterol bioszintézis egy sebességkorlátozó lépésének katalizálásáért, a szkvalén lanoszterollá történő ciklizálása révén [25]. A szkvalén magas szintje növelheti a membrán permeabilitását [26]. A terbinafin és a naftifin az a két gyakorlatban használatos allilamin származék, amelyek funkcionálisan és kémiaiilag is különböznek az ergoszterol-gátló gombaellenes szerek főbb osztályaitól [27, 28]. Kimutatták, hogy a terbinafin jó aktivitást mutat néhány azol-rezisztens *C. albicans* törzzsel szemben [28, 29] és nagyon hatékony *Cr. neoformans* ellen. A naftifin csak lokálisan alkalmazható, a terbinafin orálisan is.

A gombaellenes antibiotikumok legújabb csoportjába tartoznak a gombák sejtfal szintézisét gátló echinokandinok, melyek gátolják a glükán szintézisét a β -(1,3)-glükán-

szintáz enzim nem kompetitív gátlásán keresztül [30-32] (**1. ábra**). Az echinocandinok a humán patogén élesztőgombák közül a *Candida* fajok ellen hatékonyak, de *Cr. neoformans* ellen nem [9, 33]. Szisztémás kandidiázis kezelésében hatékonyságuk megegyezik az amfotericin B-ével.

Az 5-fluorocitozin egy fluorozott pirimidin, amely gátló hatást fejt ki sok élesztőgombával szemben, beleértve a *Candida* és a *Cryptococcus* fajokat. A gomba sejteken belül 5-fluorouracillá alakul és gátolja az RNS, valamint a DNS szintézist. Nagy hátránya azonban, hogy a terápia során gyakran alakul ki vele szemben szekunder rezisztencia, ezért rendszerint együtt alkalmazzák amfotericin B-vel vagy flukonazzal és csak ritkán egyetlen hatóanyagként [34]. Az 5-fluorocitozin citozin permeáz segítségével jut be a gombasejtekbe. Ma már kevésbé használatos készítmény.

A griseofulvin a tubulinokhoz kapcsolódva gátolja a mitótikus orsó kialakulását, ezáltal zavarja a sejtosztódást. Képes kapcsolódni a keratinhoz is, így a keratinban gazdag szövetekben halmozódik fel [35]. Elsősorban dermatomikózisok kezelésére használják [36].

3.3. Gombaellenes szerekkel szembeni rezisztencia

A komoly gombafertőzések emberek millióit érintik évente, és több mint 1,3 millió halálesetért felelősek. A sikertelen kezelés oka gyakran a pontatlan vagy késői diagnózis. Bár az antifungális szerek fejlesztése jelentős figyelmet kapott az elmúlt években, a kiemelt figyelem ellenére a használt szerek néhány vegyületcsaládra korlátozódnak (azolok, poliének, echinocandinok). Ezen gombaellenes szerek fokozott használata az utóbbi évtizedekben a velük szembeni ellenállóképesség kialakulásához vezetett. A rezisztencia számottevő klinikai következményei hatására fokozott érdeklődés jelentkezett a jelenség hátterének vizsgálatára. A kutatott területek közé tartoznak a rezisztencia alapját képező mechanizmusok, a rezisztencia kimutatásának módja, az alternatív lehetőségek a rezisztens organizmusok által okozott fertőzések kezelésére, valamint a rezisztencia kialakulásának és elterjedésének megakadályozására és ellenőrzésére irányuló stratégiák.

A gombaellenes szerek elleni rezisztencia ritka, a legtöbb faj érzékeny a jelenleg széles körben használt hatóanyagokra. A kevésbé fogékony törzsek megjelenése leggyakrabban az azolokhoz köthető [37]. Azon régiókban, ahol az azolok alkalmazása kiemelkedő, a szisztémás fertőzésekért a *C. albicans* helyett az e szerekre kevésbé

érzékeny fajok (*C. glabrata*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*) felelősek [38-41]. A *C. glabrata*, a kandidiázisokból második leggyakrabban izolált *Candida* faj az Európai Unióban (>10%) és az Egyesült Államokban (>20%), rezisztens a flukonazollal és a vorikonazollal szemben és újabban az echinocandinokra rezisztens törzseket is találtak. Az echinocandin-rezisztens *C. glabrata* izolátumok előfordulása 2001 és 2010 között 7%-kal nőtt [42]. Az azol- és echinocandin-rezisztens *C. glabrata*-okozta fertőzés csak intravénásan amfotericin B-vel kezelhető, amely gyakran toxikus [43].

A baktériumok körében gyakori, hogy több, ugyanazon terápiára rezisztens vonal egy közös törzsből származik. Ez a gombák körében nem általános, azonban Hollandiában a közelmúltban megjelent egy multidrog-rezisztens (MDR) *Aspergillus fumigatus* variáns, melynek kialakulásáért bizonyíthatóan a mezőgazdaságban túlzott mértékben használt azolok felelősek [44, 45]. Ezen *A. fumigatus* törzs esetében már szerzett rezisztenciáról beszélhetünk, vagyis a törzsben a rezisztencia az azol-kezelés hatására alakult ki. A legtöbb izolált rezisztens *A. fumigatus* törzs specifikus mutációt hordoz a 14- α -szterol demetiláz génben (*cyp51A*) [7]. A szerzett rezisztencia bár ritkább, de terápiás szempontból mégsem elhanyagolható jelenség.

A *Candida auris* egy, a klinikumban újonnan felbukkant élesztőgomba faj, melyre széles körben elterjedt flukonazol és amfotericin B rezisztencia és ritkábban echinocandin rezisztencia is jellemző [46, 47]. Az első törzset egy japán női beteg külső hallójáratából izolálták 2007-ben, de azóta világszerte több mint 25 országban azonosították [48, 49]. A humán patogén törzsek közül az első echinocandin rezisztens törzset 2015-ben izolálták [50]. A *C. auris* megjelenésének egyik kockázati tényezője a korábbi gombaellenes szerek használata [51]. A legtöbb *Candida* fajban az *FKS* génekben két mutációs „forrópont” található, a Hotspot1 és a Hotspot2, amelyekben leggyakrabban fordulhat elő az echinocandin érzékenységet befolyásoló mutáció [52]. Az echinocandin rezisztens *C. auris* törzsekben az *FKSI* gén Hotspot1 régióján belül az S639 pozícióban mutattak ki mutációt [53].

3.3.1. A rezisztencia mechanizmusa

A gombaellenes szerekkel szembeni rezisztencia mechanizmusok lehetséges alapjai a szer célmolekulájának és/vagy a célenzim intracelluláris koncentrációjának növekedése továbbá a szterin bioszintézisének megváltozása [34].

A terápiás szerek célmolekulájának genetikai módosulása a hatóanyag affinitásának csökkenéséhez vezet, amely az egyik leggyakoribb oka a gombák esetében a kezeléssel szembeni ellenállásnak. *C. albicans*-ban kimutatták, hogy a már említett glükán szintáz kódozó *FKS1* gén konzervált régióit érintő mutációk hatására bekövetkező aminosavcserek miatt az enzim echinocandin-érzékenysége akár több ezred részére is csökkenhet [54, 55].

Az *ERG11* gén által kódolt lanoszterol 14- α -demetiláz működését gátló azolok kémiaiilag diverzek, ezért az ellenük mutatott érzékenység különböző. A triazolok target affinitása eltérő, ami az aktivitási spektrumukat nagyban befolyásolja. A flukonazol alakítja ki a leggyengébb kölcsönhatást az enzimmel, ezért ez a vegyület rendelkezik a legszűkebb hatásspektrummal, csak élesztőgombákkal szemben hatékony és ellene alakul ki a legkönnyebben rezisztencia [56]. Ezzel szemben a nagy aktivitású triazolok (voriconazol, posaconazol) erősebb interakcióba lépnek a célmolekulával, így hatékonyabbak mind élesztő-, mind fonalas gomba fajok ellen és esetükben ritkábbak a rezisztens törzsek [57, 58]. Néhány *ERG11* mutáns csak flukonazol, míg mások voriconazol rezisztensek, de posaconazol érzékenyek, néhány esetben pedig pánrezisztencia is kialakulhat (**1. táblázat**). Ezen eltérések miatt nagy szerepe van a számítógépes modellezésnek, ami segít megérteni, hogy egyes aminosavcserek milyen hatással lehetnek a hatóanyag-célmolekula kölcsönhatásra [59].

1. táblázat: Antifungális szerek elleni rezisztencia háttérben álló leggyakoribb mechanizmusok [60]

Antifungális szer	Rezisztenciát kiváltó folyamatok
Poliének	a plazmamembrán ergoszterol tartalmának csökkenése
Echinocandinok	<i>FKS1</i> és <i>FKS2</i> génekben bekövetkező mutáció
	ABC transzporterek túlműködése
Azolok	<i>ERG11</i> génben bekövetkező mutáció
	ABC transzporterek túlműködése
	csökkent felvétel
5'-fluorocitozin	mutáció a citozin permeáz és a citozin deamináz génekben

Mivel a célmolekulák általában a sejten belül találhatóak, ezért az antifungális szereknek be kell jutniuk az intracelluláris térbe. A sejtmembránon való átjutás

permeázok segítségével történik [55]. A flukonazol például egy egyelőre még nem teljesen feltárt, energiafüggetlen diffúziós mechanizmussal lép be a sejtbe [61]. Az intracelluláris hatóanyag sejten belüli koncentrációjának csökkentéséhez a gombasejtek energiafüggő efflux transzporterei felismerik és eltávolítják a sejtől a különböző hatóanyagokat. Az azol rezisztencia szempontjából ebben a folyamatban az ATP-kötő kazettával (ABC) rendelkező és fő facilitátor (MFS) transzporter szupercsaládok játszanak központi szerepet (**1. táblázat**). Az ABC transzporterek két transzmembrán és két citoplazmatikus nukleotid-kötő domént tartalmaznak, melyek az ATP hidrolízist katalizálják. A gomba genomok számos ABC transzportert kódolnak, melyek szerepe a sejt megtisztítása a káros metabolitoktól. Magas expressziójuk ellenére csak néhányuk van szerepe az antifungális rezisztenciában [61-63]. Az MFS transzporterek 12-14 transzmembrán domént tartalmaznak és a protongrádiensből származó energiát használják a működésük során. Érdekes, hogy bár a *C. albicans* genomja 95 MFS transzportert kódol, csupán egy, az *MDR1* áll kapcsolatban az azol rezisztenciával [64]. Az ABC és MFS transzporterek szigorú szabályozás alatt állnak különböző cisz- és transzregulációs elemek által. A szabályozó rendszer aktivátor elemeiben bekövetkező, általában funkciónyereséssel járó mutációk a sejtől való megnövekedett hatóanyag eltávolítás révén könnyen vezethetnek akár multidrog rezisztencia kialakulásához is [65, 66].

Ma már ismert, hogy a *Candida* fajok azol rezisztenciájában szerepet játszik több genetikai módosulás is. Ide tartozik a heterozigotitás elvesztése, és különböző aneuploidok létrejötte [67-69]. Az izokromoszóma formálódás egy ezektől elkülönülő és kiemelkedően fontos jelenség, mely során megemelkedik bizonyos gének kópiaszáma (pl. *ERG11*, *TAC1*), melyek a rezisztencia kialakításában szerepet játszanak. A megemelkedett géndózis miatt hatékonyabbá válhat a hatóanyagmolekulákat eltávolító transzportrendszer, a célmolekulák szintjének növekedése révén pedig a szer relatív hatékonysága is csökkenhet [70].

Egyes élesztőgomba fajok gyakran képeznek biofilmet [71, 72]. A biofilm képzés során a sejtek egy szénhidrátokból, fehérjékből és nukleinsavakból álló sűrű, háromdimenziós mátrixot alakítanak ki. Ez az extracelluláris mátrix képes megkötni a gombaellenes molekulákat, így ezek nem jutnak el a mátrixban lévő rögzült célsejtekhez. Az efflux pumpák megnövekedett expressziója a sejtekben tovább növeli a rezisztenciáért felelős mechanizmus hatékonyságát a biofilmekben [73]. A mátrix előállítása egy erősen szabályozott folyamat, főképp a *Candida* fajok esetében kulcsfontosságú faktor a rezisztencia kialakulásában.

3.4. Antimikrobiális peptidek

Szinte minden organizmus, beleértve a vírusokat, baktériumokat, gombákat, növényeket és állatokat, termel antimikrobiális hatással rendelkező peptideket (AMP) [74-77], melyeket természetes antibiotikumoknak is neveznek [78].

Az AMP-ek kis molekulású, leggyakrabban pozitív töltésű (kationos) és amfipatikus sajátsággal rendelkező peptidek, melyek pozitív töltésükénél fogva kapcsolódni képesek a negatív töltéssel rendelkező sejtmembránhoz [77]. Általában rövidiek, méretük néhány aminosavtól több tíz aminosavig (10-50) terjed [74].

Természetes körülmények között keletkezhetnek riboszómális és nem-riboszómális úton, illetve nagy fehérjék enzimatis hasításával is [79]. Jelenleg több mint 4000 természetes AMP-et azonosítottak különböző fajokban, és megközelítőleg 3000, állat és növény fajokból származó, AMP szekvenciája érhető el különböző adatbázisokban [80].

3.4.1. Az antimikrobiális peptidek forrásai

A virális AMP-ek közül egyes fágfehérjék, köztük az endolizinek, depolimerázok és virion-asszociált peptidoglükán-hidrolázok antibakteriális aktivitást mutatnak [81]. Ezeket a fehérjéket „enzibiotikumként” definiálják, jelezve, hogy antibakteriális anyagként használhatók a hagyományos antibiotikumok alternatívájaként [82]. A lítikus aktivitással rendelkező endolizinek képesek a peptidoglükán bontására, ezáltal a baktérium sejtek pusztulását okozzák. Aktivitásuk alapján különböző csoportokra oszthatók, úgymint acetyl-muramidázok, transz-glükozilázok, amidázok, endopeptidázok és glükóaminidázok. Szerkezetüket tekintve a Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumok fágjai által termelt endolizinek elkülönülnek. A Gram-pozitív baktérium fágjai által kódolt endolizinek moduláris felépítésűek. A fehérje N-terminális részén található az enzimatis aktivitásért felelős domén, melyet egy linker régió kapcsol a C-terminális részen található sejtfa-kötő régióhoz. Ezzel szemben a Gram-negatív baktériumok fágjai által kódolt endolizinek globuláris felépítésűek és gyakran hiányzik a sejtfa-kötő doménjük [83]. A virális AMP-ek másik nagy csoportjába a fágfarokszerű peptidek tartoznak. Ezek nagy molekulatömegű, hengeres peptidek, melyek képesek kapcsolódni a bakteriális sejtfa-hoz, G-negatív baktériumok esetén átjutnak a külsőmembránon, és lokális peptidoglükán lízist okoznak. Fágfarok peptidekhez hasonló szerkezetű, antibakteriális hatású peptideket baktériumokban is leírtak [84, 85]. Ezek a bakteriocinek két osztályba sorolhatók, az egyik az R-típusú,

kontraktilis, a *Myoviridae* fágfarokkal rokon, amásik az F-típusú, nem kontraktilis, a *Siphoviridae* fágfarokhoz hasonlító [84].

A Gram-pozitív baktériumok riboszómákon (riboszómális AMP-ek) vagy enzimatikusan (nem riboszómális AMP-ek) termelhetnek AMP-eket [86, 87]. A riboszómális úton szintetizált AMP-ek, a bakteriocinek csak antibakteriális hatással rendelkeznek, és alacsonyabb koncentrációban hatásosak, mint az eukarióta AMP-ek. A bakteriocineket méretük, eredetük, szerkezetük és hatásmechanizmusuk szerint osztályozzák [88]. A nem-riboszómális úton termelt polimixinek hatása sokrétű, roncsolják a Gram-negatív baktériumok külső membránját, gátolják létfontosságú légzési enzimek működését és hidroxilgyökök képződését idézik elő. A Gram-negatív baktériumok által termelt bakteriocinek szűk hatásspektrumúak, csak más Gram-negatív baktériumokra fejtik ki hatásukat.

A gombák peptaibolokat és defenzineket termelnek [89, 90]. A peptaibolokat elsősorban *Trichoderma* fajok állítják elő [91]. A peptaibolok elsődleges célpontja a plazmamembrán, melynek dezorganizációját okozzák. Szerkezetük alapján megkülönböztetünk rövid (5-10 aminosav), közepes (11-16 aminosav) valamint hosszú (17-21 aminosav) láncú peptaibolokat. A hosszú láncú peptaibolok helikális szerkezetet vesznek fel, melyek oligomerizálódva ioncsatornákat képeznek a membránban. A rövid peptaibolok hatása összetett. Egy részt okozhatnak membrán dezorganizációt - spirális kötegeket alkotva transzmembrán pórusokat képezhetnek vagy a hordó-donga elv alapján permeabilizálják a membránt -, más részt kölcsönhatásba léphetnek különböző molekuláris célpontokkal [92]. A gombák által termelt defenzinszerű peptidek a cisz-defenzinek családjába tartoznak (a két konzervált diszulfidhíd ugyanahhoz az α -hélixhez kapcsolja a β -lemezt). A gomba defenzinszerű peptidek a mikrobák sejtmembránjának roncsolásán vagy a bakteriális sejtfal bioszintézisének gátlásán keresztül fejtik ki hatásukat [93].

A növényi eredetű AMP-ek olyan peptidek, melyek erős és széles spektrumú antimikrobiális aktivitást mutatnak. Az első azonosított növényi AMP a búzalisztból származó purotionin volt [94]. A legtöbb növényi AMP bázikus, molekulatömege 2-10 kDa, és 4-12 ciszteint tartalmaz, melyek javítják a peptid szerkezeti és termodinamikai stabilitását [95]. Általában a növényi AMP-eket a peptidlánc hossza, valamint a diszulfidkötéseket alkotó ciszteinek száma és elhelyezkedése szerint osztályozzák [96, 97]. Számos növényi eredetű AMP csoportot, köztük defenzineket, glicinben gazdag fehérjéket azonosítottak és jellemeztek [98, 99]. Ezeket különböző növényi szervekből

izolálták például szárból, gyökérből, magból, virágból és levélből [100]. A növényi AMP-ek vírusok, baktériumok, gombák, paraziták és protozoonok elleni jelentős aktivitásán túl rovarellenes hatással is rendelkeznek, például hatékonyak növénykártevők ellen, valamint citotoxikus hatást mutatnak egyes rákos sejtekkel szemben [98, 101-103].

Gerinces és gerinctelen állatok is termelnek AMP-eket, melyek kölcsönhatásba léphetnek a sejtmembránnal annak dezintegrációját okozva [104]. A háziállatok gazdag forrásai a különböző antimikrobiális peptidnek, melyek humán és állati kórokozók ellen egyaránt hatékonyak. A sertések számos AMP-et termelnek, melyek szerkezetét, hatásmechanizmusát és patogén baktériumok, vírusok és élesztőgombák elleni aktivitását alaposan tanulmányozták. A sertés AMP-ek lehetnek széles hatásspektrumú katelicidinek és β -defenzinek. Ezek a peptidok ígéretes eredményeket mutattak a preklinikai vizsgálatok során, és néhányuk a fejlesztés klinikai fázisában van [105].

A tejet mindig is fehérjék gazdag forrásának tekintették. A tejfehérje 80% kazeint és 20% tejsavófehérjét tartalmaz. Számos AMP-et származtattak ezekből a fehérjékből, melyek alkalmasak a gyógyszeriparban való felhasználásra [106]. Megfigyelték, hogy a kazein A és B gátlóhatást mutat olyan patogénnel szemben, mint például a *Cronobacter sakazakii*, amely újszülötteknél agyhártyagyulladást okozhat. Így ezek a peptidok olyan terápiás gyógyszerek előállítására használhatók, melyek védelmet nyújtanak ezen kórokozóval szemben [107].

A rovarok antimikrobiális peptidjei fontos szerepet játszanak a humorális immunitásban [108, 109]. Eddig több mint 200 AMP-et azonosítottak rovarokból. Ezeket a peptidket öt nagy csoportba sorolják: cecropinek, rovardefenzinek, glicinben gazdag peptidok, prolinban gazdag peptidok és lizozimek [110].

A tengeri élőhelyről ismert, hogy az egyik leggazdagabb antimikrobiális peptidforrás [111]. A szárazföldi környezettől eltérően a tengeri környezetet általában alacsony hőmérséklet, magas nyomás, teljes sötétség és magas sótartalom jellemzi [112]. Ezért a tengeri AMP-ek szerkezetileg különböznek a szárazföldi AMP-ektől és jobban alkalmazkodnak a szigorú környezeti feltételekhez, mint például magas sótartalom [113].

3.4.2. Antimikrobiális peptidok szerkezete és hatásmechanizmusa

Az AMP-eket számos tulajdonság szerint lehet csoportosítani, de a legelterjedtebb a másodlagos szerkezetükön alapuló osztályozás. Két kulcsfontosságú komponens, az α -hélix és a β -redő jelenléte vagy hiánya alapján az AMP-eket négy csoportba sorolhatjuk:

α -hélix peptidek, β -redő peptidek, kevert – α -hélixet és β -redőt egyaránt tartalmazó – peptidek, valamint α -hélix és β -redő nélküli peptidek [114, 115]. A közelmúltban egy ötödik, topológiailag összetett AMP-ként emlegetett család is azonosításra került [116].

Az α -hélix konformációs peptidek az AMP-ek viszonylag változatos és legtöbbet tanulmányozott csoportját alkotják. Ebben a csoportban több száz eltérő szekvenciájú molekulát azonosítottak már különböző organizmusokból [117]. Általában 12-40 aminosavból állnak, melyek hélix stabilizáló csoportokban gazdagok, például alaninban, leucinban és lizinben [118]. Az α -hélix motívumok jelenléte kulcsfontosságú tényező, amely elősegíti a peptidek kölcsönhatását a célmembránokkal, és lehetővé teszi a membrán felbomlását. Az α -hélix peptidek közé tartozik például a humán katelicidin LL-37 [119].

Az antimikrobiális peptidek második csoportja β -redő konformációt mutat, melyek legalább egy pár, diszulfidkötésekkel kapcsolódó β -redőt tartalmaznak. A diszulfidhidak jelenléte szükséges a szerkezet stabilizálásához és a peptidek biológiai funkciójának betöltéséhez. Ennek eredményeként a β -redő AMP-ek stabilabb szerkezettel rendelkeznek, nem mennek keresztül lényeges konformáció változásokon a foszfolipid membránokkal történő kölcsönhatás során [120]. A β -redő AMP-ek közé tartoznak a β -hajtú peptidek, a szarvasmarha laktoferrin, valamint a defenzinek [121-123].

Az α -hélixet és β -redőt egyaránt tartalmazó AMP-ek nemcsak az emberekben és más emlősökben találhatók meg, hanem különféle gerinctelen állatokban és növényekben is [124]. Az ilyen típusú AMP-ek osztályozása három-öt diszulfidkötésük különböző elrendezésén alapul.

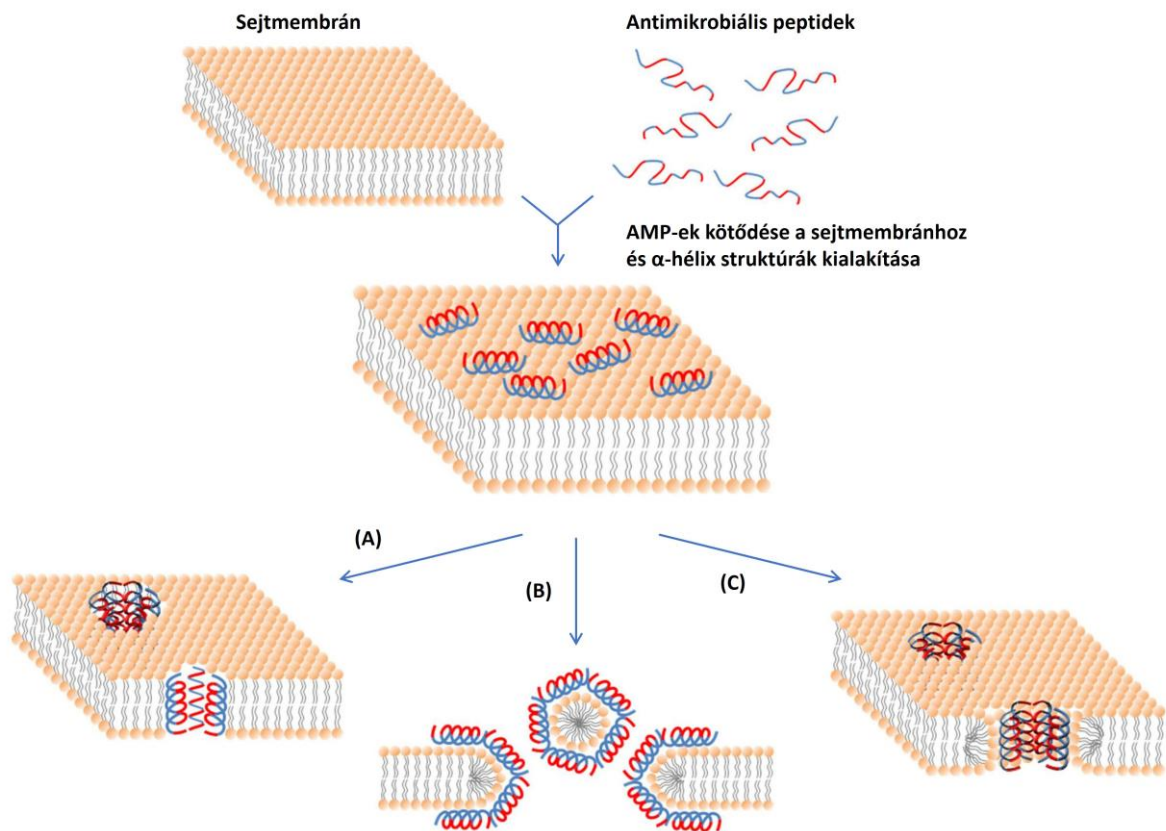
Egyes AMP-k nem vesznek fel specifikus háromdimenziós struktúrát, ezért kiterjedt lineáris struktúráknak nevezik őket. Ezekből a peptidekből hiányoznak az α -hélixek és a β -redők, és általában glicin, prolin, triptofán vagy hisztidin aminosavakban gazdagok [125].

A közelmúltban az AMP-ek ötödik csoportját is azonosították. Ezek a peptidek a fentebb említett négy csoportba tartozó AMP-ekkel szemben nem lineáris szerkezetet vesznek fel [126].

Az AMP-ek hatásmechanizmusa elsősorban kationos és hidrofób tulajdonságukkal magyarázható. Az elektrosztatikus vonzás a fő hajtóereje a pozitív töltésű AMP negatív töltésű bakteriális sejtfelszínhez való kezdeti kötődésének [120, 127]. Az AMP-ek és az emlős sejtmembránok közötti elektrosztatikus kölcsönhatások gyengék az AMP-ek és a bakteriális membránok közötti kölcsönhatásokhoz képest. Ezen kívül az emlős

sejtmembránok koleszterint tartalmaznak, ami növeli a membrán stabilitását, és blokkolja az AMP-ek beépülését a membránba [128]. Azon AMP-ek, melyek nem a sejtmembránra irányuló mechanizmusokon fejtik ki hatásukat, főként a nukleinsavak, esszenciális enzimek és más funkcionális fehérjék szintézisét gátolják [129].

A sejtmembránhoz kötődő AMP-ek koncentrációjának növekedésével peptid-peptid vagy lipid-peptid komplexeket hoznak létre. Amikor az AMP-ek felhalmozódása a membránban eléri a kritikus aggregációs koncentrációt, behatolnak a kettősréteg hidrofób magjába, és transzmembrán pórusokat képeznek. A membrán permeabilizáció többféle módon is végbemehet (**2. ábra**). A „hordó-donga” modellben az AMP molekulák felismerik egymást, felhalmozódnak a sejtmembrán felszínén, és köteget képeznek a membránban, hidrofób régióik kölcsönhatásba lépnek a foszfolipid kettősréteg belső, hidrofób régiójával, míg a hidrofíl peptid régiók a pórus belsejét alkotják [130]. A „szőnyeg” modell esetében az AMP-ek akkumulálódnak a kettősréteg felszínén, a kationos AMP-ek elektrosztatikusan kölcsönhatásba lépnek a sejtmembrán foszfolipid kettősrétegének hidrofíl részével, és szőnyegként borítják a membrán felszínét [131, 132]. Magas peptidkoncentráció esetében a peptidok micellákat képeznek a membránban, ami a sejtek líziséhez vezet. A „gyűrű-pórus” modell estében az AMP-ek poláris része kölcsönhatásba lép a sejtmembrán poláris lipid-fejcsoportjával, majd a peptidok a membránba inszertálódnak és a lipid rétegek folyamatos behajlását idézik elő, ily módon transzmembrán pórusokat képeznek [133].



2. ábra: Antimikrobiális peptidek által indukált membrán permeabilizáció lehetséges módjai
 A) „hordó-donga” modell B) „szőnyeg” modell C) „gyűrű-pórus” modell [134]

A membránaktív peptidek a mikrobiális sejtfelülettel kölcsönhatásba léphetnek receptorok által közvetített vagy nem receptor által közvetített kölcsönhatások révén. Az első olyan AMP, ami meghatározott receptor által közvetített kölcsönhatásban kapcsolódik a membránhoz egy bakteriocin, a nizin, mely a kezdeti lépésben specifikusan kötődik a lipid II molekulához. Ez a kölcsönhatás blokkolja a peptidoglikán szintézisét és pórusképződést okoz. A legismertebb AMP-ek kölcsönhatást alakítanak ki a sejtfelületen lévő általános célpontokkal anélkül, hogy specifikus receptorra lenne szükségük. Az AMP-ek fizikai-kémiai tulajdonságai, mint például a nettó töltés, a hidrofobicitás, az amfipatikusság, a membrán görbülete és az önaggregációra való hajlam, kulcsfontosságú szerepet játszanak a peptid-membrán kölcsönhatásban [135]. A peptid-membrán kölcsönhatások az AMP-ek számos fizikai-kémiai paraméterének együttes hatásai révén jönnek létre. Ezért lehetséges az AMP-ek antimikrobiális aktivitásának előrejelzése a szerkezet-aktivitás összefüggés alapján, valamint bizonyos típusú, specifikus tulajdonságokkal rendelkező peptidek tervezése [120].

3.4.3. Antimikrobiális peptidek elleni rezisztencia

Mivel az AMP-ek az egyik legígéretesebb antimikrobiális hatóanyag jelöltek, ezért fontos az ellenük kialakult bakteriális rezisztencia mechanizmusok megértése [76]. A napjainkban használt, speciális célponttal rendelkező antibiotikumokkal ellentétben az AMP-ek több célponton is támadhatják a kórokozókat, ezért a velük szembeni rezisztencia kialakulása kevésbé gyakori [136]. Több esetben a védekezési stratégia a sejt felszíni komponensek módosításán alapul, mivel a sejtmembrán az AMP-ek támadásának fő célpontja. A sejtek külső szerkezetének töltésében és fluiditásában bekövetkező változások gyakran hozzájárulnak a rezisztencia kialakulásához azáltal, hogy csökkentik az AMP-ek kötődését és beépülését a sejtmembránba [137]. A peptidek proteolitikus bomlása egy másik lehetséges rezisztencia mechanizmus, amely erősen függ a peptid szerkezetétől, mivel sok szekretált proteáz nem specifikus az AMP-ekre [138]. Az AMP-ek proteolitikus bontására mind a Gram-pozitív, mind a Gram-negatív baktériumok közt találunk példát. Így a Gram-pozitív baktériumok közé tartozó *Staphylococcus*-ok különböző proteázokat, köztük metalloproteázokat mint az aureolizin, a SepA vagy a V8 proteáz szekretálnak, mely képes a humán katelicidin bontására. A Gram-negatív baktériumok által termelt legismertebb proteázok az optinek közé tartoznak, melyek több képviselőjéről bizonyították, hogy képesek AMP-ek bontására. A káros anyagokat eltávolító efflux pumpák és a baktérium sejteket védő tok vagy sejt felszíni poliszacharidok jelenléte további fontos bakteriális védekezési mechanizmusok [139]. A biofilmekben lévő sejtek is rezisztensek az AMP-ekkel szemben, mert a biofilm extracelluláris mátrixában a peptidek penetrációja csökken. Az antibiotikumokhoz képest az AMP-ekkel szembeni rezisztencia nem specifikus, nem meghatározott rezisztenciagénekén keresztül megy végbe, így ezek sejtek közötti átadása horizontális transzfer során kisebb gyakorisággal történik [137]. Ez olyan tényezőnek tekinthető, amely növeli az AMP-ek alkalmazásának lehetőségét az antibiotikumok helyettesítőjeként.

A rezisztencia kialakulásának alacsony kockázata [114, 140], valamint az AMP-ek hatékonysága a napjainkban használt antibiotikumokkal szemben rezisztens kórokozók ellen [141], olyan előnyt jelentenek, melynek következtében ideális jelöltnek számítanak a terápiás alkalmazásokhoz [129, 142, 143].

3.4.4. Antimikrobiális peptidok felhasználási lehetőségei

Az AMP-ek az egyik legígéretesebb jelöltek a multidrog rezisztenciával kapcsolatos kihívások leküzdésére. Használhatók önmagukban, vagy hagyományos antibiotikumokkal, vírusellenes szerekkel vagy más antimikrobiális hatóanyagokkal együtt a szinergikus hatás elérése érdekében [144]. Potenciálisan alkalmazhatók antimikrobiális szerekként az élelmiszeriparban, a mezőgazdaságban, a környezetvédelemben, az állattenyésztésben és a gyógyszeriparban [60]. Jelenleg több mint 60, az Egyesült Államok Élelmiszer és Gyógyszerügyi Hatósága (FDA) által jóváhagyott, peptidhatóanyag van forgalomban és több mint 400 peptidet vizsgálnak klinikai fázisban [145].

Az élelmiszeriparban az AMP-ek felhasználhatók élelmiszer adalékanyagként, vagy csomagolóanyagok összetételébe is beépíthetők. A nizin, a *Lactococcus lactis* által termelt AMP, az egyetlen bakteriocin, melynek használata több mint 50 országban engedélyezett. Bár képes gátolni az élelmiszer-eredetű Gram-pozitív baktériumokat, hatástalan az élesztőgombák és a Gram-negatív baktériumok ellen. A laktoferrin egy hatékony antimikrobiális peptid, mely egy vaskötő glikoprotein és a tejben fordul elő. Húskészítményekben történő antimikrobiális szerként való felhasználását az USA-ban engedélyezték. A pepszinnel emésztett laktoferrin származék, a laktoferricin egy hatékony AMP, melynek hőállósága felhasználási előnyt jelenthet az élelmiszerek tartósításában [146]. Az ϵ -polilizin a *Streptomyces albulus* fajból származó L-lizin homopolimere, amely széles spektrumú antimikrobiális hatással rendelkezik Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumok, élesztőgombák, penészgombák és vírusok ellen. Az FDA élelmiszer tartósítószerként hagyta jóvá, általánosan elismert biztonságos (generally recognized as safe - GRAS) státuszban van [147]. A *Streptomyces* fajok által termelt natamycin hatásos bakteriocin, szinte minden élelmiszer-eredetű élesztőgomba és penészgomba ellen hatásos, de nem hatékony baktériumok és vírusok ellen. A gombák növekedésének gátlására natamycint alkalmaznak a sajtok és a szalámik felületén [148].

A közelmúltban az AMP-eket javasolták a hagyományos antibiotikus hatású takarmány-adalékanyagok alternatívájaként az állatok növekedési teljesítményének és egészségi állapotának javítására. Számos tanulmány kimutatta, hogy az AMP-ek ígéretes vírusellenes szereknek bizonyulnak olyan, az állatokat fertőző vírusok ellen, mint például a súlyos akut légúti szindróma koronavírus (SARS-CoV) [149], sertés járványos

hasmenés vírus (PEDV) [150], sertés fertőző gastroenteritis vírus (TGEV) [151], fertőző bronchitis vírus (IBV) [152] és influenza A vírus ellen [153].

Világszerte minden évben nagy mennyiségű peszticidet használnak a növényi kórokozók és rovarok által okozott termésveszteség megelőzésére. A peszticidek hosszú távú használata azonban a környezetszennyezés egyik fő okozója és súlyos egészségügyi problémák okozója lehet [154]. Az AMP-ek a mezőgazdaság különböző területein felhasználhatók, így a növényvédelemben fitopatogének ellen anélkül, hogy a környezetre, az emberekre vagy az állatokra bármilyen mellékhatással lennének [119].

A természetes AMP szekvenciákból kiinduló szintetikus peptidek tervezésének egyik célja a jobb antimikrobiális hatással rendelkező rész kinyerése és a toxikus, proteolízisre érzékeny rész elhagyása [155]. Számos módszert fejlesztettek ki új, szintetikus AMP-ek tervezésére a különböző szervezetekből származó, természetesen előforduló AMP-ek szekvenciájának módosításával. Kimutatták, hogy az aminosav-összetétel kis változtatásai a peptid konformációs és fizikai-kémiai tulajdonságának megváltozásához vezethetnek. A templát peptid módosításait általában csonkítással, aminosav-szubsztitúcióval, hibridizációval és/vagy ciklizálással hajtják végre. A rövid peptidek kinyerése az AMP szekvencia csonkolásával költségcsökkentést jelent a szintetikus AMP-ek előállításakor. Az AMP-ek ciklizálása nagyobb membrán permeabilitást eredményez a lineáris peptidekhez képest. A természetben előforduló AMP szekvenciákból kivágott fragmentumok kombinálásával előállított hibridpeptidek lehetővé teszik a templátpeptidek különböző előnyös tulajdonságainak kiaknázását. Például az alacsony toxicitású és aktivitású AMP-ek és a magas aktivitású, de viszonylag magas toxicitású AMP-ek kombinációja lehetővé teszi új, magas antimikrobiális aktivitású és alacsony toxicitású kiméra AMP-ek kifejlesztését [129].

A szintetikus peptidek jellemzően hatékonyabbak, mint a természetben előfordulók, mivel alacsonyabb koncentrációban nagyobb antimikrobiális hatást fejtenek ki, mint a természetes változataik. Például az *Androctonus amoreuxi* természetes AamAP1 peptidje antimikrobiális hatást fejt ki *C. albicans*, *Escherichia coli* és *Staphylococcus aureus* ellen [156]. Az AamAP1 szintetizált formája, az AamAP1-Lizin 4-20-szor hatékonyabb, mint természetes formája, és már 5-7,5 μM koncentrációban is antimikrobiális hatással bír ugyanazokkal a kórokozókkal szemben [157]. Újabban az AMP-ek szintetikus analógjai, melyeket néhány aminosav módosítással terveztek, az előrejelzések szerint képesek leküzdeni a természetes AMP-ekkel kapcsolatos stabilitási, toxicitási és aktivitási korlátokat [129].

Az AMP-ek kémiai szintézise szilárd fázisú peptidszintézissel történik, mely fontos módszer a rövid AMP-ek előállításában, viszont a 35 aminosavat meghaladó hosszúság és a poszttranszlációs módosítások szükségessége megemeli az előállítási költségeket, ami az ilyen módon történő előállítás korlátozó tényezőjének bizonyul [158-160]. Másik hátránya, hogy a szintézis során nagy koncentrációjú, toxikus reagenseket használnak, melyek ipari hulladékként környezetromboló hatásúak [161, 162].

Megoldást a rekombináns expressziós rendszerek jelentik, melyeket széles körben alkalmaznak különféle polipeptidek és fehérjék előállítására. Például egyes *Bacillus* fajok kiváló gazdaszervezetek, melyek képesek heterológ fehérjét expresszálni és endogén AMP-eket is termelni [7].

3.5. Gümőspecifikus ciszteiben gazdag peptidek

A *Medicago truncatula*-ban található egy géncsalád, mely gümőspecifikus ciszteiben gazdag peptideket (NCR) kódol [163]. Ezek a peptidek kizárólag a gyökérgümőben, a pillangósvirágú növény és a gümőképző baktériumok szimbiotikus kapcsolatában termelődnek [164]. Az NCR peptidek általában 30-50 aminosav hosszúságúak, lehetnek anionosak, semlegesek vagy kationosak, és 4-6 ciszteint tartalmaznak [165, 166]. Aminosav összetételük és szekvenciájuk jelentős eltérést mutat, mely nagy változatosságot eredményez fizikai-kémiai tulajdonságaikban, amit a peptidek izoelektromos pontjának (pI) széles tartománya is tükröz (3,2-11,2). Ezen szimbiotikus NCR peptidek közül számos rendelkezik *in vitro* antibakteriális és antifungális aktivitással [163]. A kationos NCR peptidek közül az NCR247 (pI: 10,15) és az NCR335 (pI: 11,22) széles spektrumú, és részben átfedő aktivitást mutatnak, mely azt bizonyítja, hogy a pozitív nettó töltés mellett az aminosavszekvencia is hozzájárul az antimikrobiális aktivitáshoz [164]. Az NCR247 többféle mechanizmuson keresztül hat. Befolyásolja mind a transzkripciót, mind a transzlációt, valamint gátolja a sejtosztódást azáltal, hogy kölcsönhatásba lép a szeptum képződéséhez és sejtosztódáshoz szükséges konzervált bakteriális FtsZ fehérjével [167, 168]. Az NCR247 rövidebb származékai az eredeti molekulához képest nagyobb biológiai aktivitással rendelkeznek, és a legrezisztensebb ESKAPE baktériumokat is képesek alacsony koncentrációban elpusztítani, miközben az emberi sejtekre nem toxikusak [169].

Az NCR peptidek a baktériumok mellett gombákat is képesek elpusztítani. Korábbi kísérletek során 19 NCR peptid hatását vizsgálták *Candida albicans* ellen, melyek pI

értéke 3,6 és 11,2 között volt. Azt tapasztalták, hogy a *C. albicans* növekedését azon peptidek gátolták, melyek pI értéke nagyobb volt, mint 9,5 [170]. Ezen kationos NCR peptidek (NCR192, NCR137, NCR147, NCR280, NCR183, NCR247, NCR044, NCR030, NCR335) minimális gátló koncentrációja (MIC) 1,4 és 10 μM között volt. A peptidek ezen koncentráció tartományban nem befolyásolták a hüvelyi hámsejtek életképességét, így potenciális terápiás szerekeknek tekinthetők. Az NCR044 peptid gátolta a növényi gombakórokozók növekedését is [171]. Így a kationos NCR peptidek erős gombaellenes aktivitásuk, elhanyagolható toxicitásuk és az ellenük tapasztalt alacsony rezisztencia miatt potenciális jelöltekként merülnek fel új gombaellenes terápiák kifejlesztésében [5].

4. CÉLKITŰZÉS

Becslések szerint az elmúlt évtizedekben a humán patogén gombafajok évente több mint egy millió ember halálát okozták. Ennek oka, hogy az immunszuppresszált egyének növekvő számával párhuzamosan emelkedett a gombafertőzések száma is, melyet nem követett a gombaellenes szerek fejlesztése. Így napjainkban kevés számú gombaellenes szer áll rendelkezésünkre, melyek gyógyászatban történő alkalmazhatóságát nehezíti a szerek sokszor toxikus mellékhatása vagy éppen az ellenük fellépő rezisztencia. Emiatt nagy érdeklődés mutatkozik új gombaellenes szerek fejlesztésére. A gombaellenes aktivitással rendelkező antimikrobiális peptidek lehetséges jelöltek lehetnek gombák okozta fertőzések kezelésére.

Munkánk során célul tűztük ki szintetikus NCR peptidek és peptidszármazékok:

1. gombaellenes hatásának és hatásmechanizmusának vizsgálatát, különös tekintettel a klinikai relevanciával rendelkező *Candida* és *Cryptococcus* élesztőgombákra
2. minimális gátló koncentráció meghatározását és élő csíraszámra gyakorolt hatásának vizsgálatát
3. sejtmembrán permeabilitásra gyakorolt hatásának vizsgálatát
4. citotoxicitásának vizsgálatát emlős sejtekre
5. különböző gombaellenes szerekkel történő kölcsönhatásuk vizsgálatát
6. makrofágok fagocitáló képességére tett hatásuk vizsgálatát
7. *C. albicans* és *C. tropicalis* biofilm képződésére és az élesztő-hifa morfológiai váltásra gyakorolt hatásuk vizsgálatát
8. protoplasztokra gyakorolt hatásának vizsgálatát
9. sejtméretre gyakorolt hatásuk vizsgálatát
10. sejten belüli lokalizációjának vizsgálatát

5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

5.1. Felhasznált anyagok

5.1.1. Felhasznált törzsek

Candida albicans ATCC 10231

Candida albicans SC5314

Candida albicans SZMC 1458

Candida auris 0381

Candida glabrata CBS 138

Candida krusei CBS 573

Candida parapsilosis CBS 604

Candida tropicalis CBS 94

Cryptococcus neoformans IFM 5844

ATCC: American Type Culture Collection; CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures; SC: Squibb Institute for Medical Research, New Brunswick, NJ, US; SZMC: Szeged Microbiological Collection; IFM: Culture Collection of the Research Centre for Pathogenic Fungi and Microbial Toxicoses, Chiba University, Chiba, Japan

5.1.2. Vizsgált sejtvonalak

J774.2 sejtvonal, BALB/c nőstény egerek tumoros sejtcsoportjából izolált makrofágszerű sejtvonal

HaCaT humán keratinocita

5.1.3. Tenyésztéshez használt tápoldatok, táptalajok, egyéb oldatok

Élesztőkivonat-pepton-glükóz (YPD) tápoldat

- 0,5 m/V% élesztőkivonat (VWR)
- 1 m/V% D-glükóz (VWR)
- 1 m/V% pepton (VWR)

Élesztőkivonat-pepton-glükóz (YPD) táptalaj

- 0,5 m/V% élesztőkivonat (VWR)
- 1 m/V% D-glükóz (VWR)
- 1 m/V% pepton (VWR)
- 2 m/V% agar (VWR)

Élesztőkivonat-nitrogén-alapú (YNB) tápoldat

- 0,67 m/V% Difco™ Yeast Nitrogen Base w/o amino acids (Becton, Dickinson)
- 1 m/W% D-glükóz (VWR)

A kísérletek során a YNB tápoldatot ötszörös hígításban használtuk. A dolgozatban a YNB rövidítés ezt a hígított tápoldatot jelenti.

RPMI tápoldat

- 1 m/V% RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640) (Biosera)
- 3,453 m/V% MOPS (3- (N- morfolin) propionsav) (Thermo Fisher Scientific)
- 25 mg/ml L-glutamin (Reanal)

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Biosera)

- 10 V/V% hőinaktivált FBS (Fetal Bovine Serum) (Lonza)
- 100 U/ml penicillin-sztreptomycin oldat (Capricorn)

X-VIVO™ 15 tápoldat fenolvörös és gentamicin nélkül (Lonza)

(A peptiddel történő kezelések során a tápoldatot felére hígítottuk. A dolgozatban a X-VIVO ezt a hígított tápoldatot jelenti.)

AIM-V® tápoldat (Gibco)

1 M Na₂CO₃ (nátrium-karbonát) oldat (pH 10)

Antifungális szerek

- Amfotericin B (Sigma-Aldrich) 1 mM, DMSO-ban oldva
- Flukonazol (Sigma-Aldrich) 10 mM, abszolút etanolban oldva

Efflux pumpa gátló hatású vegyületek

- Indometacin (Sigma-Aldrich) 7 mg/ml, abszolút etanolban oldva

Foszfát pufferelt só oldat (Phosphate Buffered Saline, PBS) (pH 7,4)

- 137 mM NaCl
- 2,7 mM KCl
- 10 mM Na₂HPO₄
- 1,8 mM KH₂PO₄

- Steril MilliQ desztillált víz

XTT reagens

- 5 mg XTT (nátrium 3' - [1- (fenil-amino-karbonil) - 3,4- tetrazólium] -bis (4-metoxi-6-nitro) benzén szulfonilsav hidrát) (Sigma-Aldrich)
- 10 ml PBS
- 1 µl menadion 10 mM, abszolút etanolban oldva

MTT reagens

- 0,5 mg/ml MTT (metil-tiazolil-difenil-tetrazólium bromid) (Sigma-Aldrich) PBS-ben oldva

Protoplaszt előállításához használt oldatok

0,8 M szorbit oldat

Előkezelő oldat

- 10 mM Tris-HCl (pH 9)
- 5 mM EDTA-Na₂

Protoplasztáló oldat

- 1% liofilezett *Helix pomatia* emésztőnedv
 - 0,8 M szorbitban oldva
- (az enzimoldatot membránszűréssel sterilizáltuk)

Élesztőkivonat-pepton-glükóz (YPD) táptalaj 0,8 M szorbittal kiegészített

- 0,5 m/V% élesztőkivonat (VWR)
- 1 m/V% D-glükóz (VWR)
- 1 m/V% pepton (VWR)
- 2 m/V% agar (VWR)
- 0,8 M szorbit (VWR)

Fedőagar

- 1 m/V% agar
- 0,8 M szorbit

Felhasznált festékek

- ConA-Alexa Fluor 488 (1 mg/ml PBS-ben oldva) (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific)
- Calcein-AM (1 mg/ml, DMSO-ban oldva) (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific)
- Kalkofluor fehér (CW) (1 mg/ml) (Sigma-Aldrich)
- DAPI (4',6-diamidino-2-fenil-indol) (1 mg/ml) (Sigma-Aldrich)
- Fluoreszcein-izotiocianát (FITC)-jelölt NCR335 peptid (Szegedi Biológiai Kutatóközpont)

Enzimek

DNáz (Thermo Fisher) 50 U/ml

Proteináz K (Zymo Research) 20 mg/ml törzsoldat

Gélelektroforézishez használt anyagok

TAE puffer

0,04 M Tris (pH 8, ecetsavval beállítva)

0,001 M EDTA

Agaróz gél

TAE puffer

1,5 m/V% agaróz (Sigma-Aldrich)

Etídium-bromid (Sigma) 1 µg/ml

”Loading” puffer

40 m/V% szacharóz

Molekulasúly marker

GeneRuler 1 kb DNA ladder (Thermo Scientific)

5.1.4. Vizsgált peptidek

2. táblázat: A felhasznált peptidok fizikai és kémiai tulajdonságai

Peptidek azonosítója	Peptidek szekvenciája	Amino-savak száma	pI	össz töltés
NCR044	AFIQLSKPCISDKECSIVKNYRARCRCRKGVCVRRRIR	36	11,01	+9,7
NCR247	RNGCIVDPRCPYQQCRRPLYCRRR	24	10,82	+6,7
NCR247C	QQCRRPLYCRRR	12	11,93	+5,9
NCR335	RLNTTFRPLNFKMLRFWGQNRNIMKHRGQKVHF SLILSDCKTNKDCPKLRRANVRCRKSVCVPI	64	11,22	+14
NCR335N₁₋₁₉	RLNTTFRPLNFKMLRFWGQ	19	14	+5
NCR335N₁₋₁₅	RLNTTFRPLNFKMLR	15	14	+5
NCR335N₇₋₂₁	RPLNFKMLRFWGQNR	15	14	+5
NCR335N₁₆₋₂₉	FWGQNRNIMKHRGQ	14	14	+4,1
NCR335C₁₋₃₃	HFSLILSDCKTNKDCPKLRRANVRCRKSVCVPI	33	10,37	+6,8
NCR335C₁₃₋₃₃	KDCPKLRRANVRCRKSVCVPI	21	10,91	+6,8
NCR335C₁₇₋₃₃	KLRRANVRCRKSVCVPI	17	11,73	+6,9
NCR335C₁₋₈	HFSLILSD	8	7,57	+0,1
NCR335C₉₋₁₆	CKTNKDCP	8	9,23	+1,9
NCR335C₁₋₁₆	HFSLILSDCKTNKDCP	16	8,07	+1
NCR335C₁₇₋₂₇	KLRRANVRCRK	11	12,59	+6,9
NCR169C₁₇₋₃₈	KSKKPLFKIWKCVENVCVLWYK	22	10,48	+5,9
NCR169C₁₇₋₃₈ox	KSKKPLFKIWKĈVENVCVLWYK	22	11,01	+6
NCR169C₁₇₋₃₈W_{10,20}/A	KSKKPLFKIAKVENVCVLAYK	22	10,48	+5,9
NCR169C₁₇₋₃₈Strep-tag	KSKKPLFKIWKCVENVCVLWYKWSHPQFEK	30	10,39	+6
AMP1	RPLNFKMLRFWGQQCRRPLYCRRR	25	12,23	+8,9
AMP2	QQCRRPLYCRRRKALAALAKKIL	23	11,98	+8,9
AMP2b	KALAALAKKILQQCRRPLYCRRR	23	11,98	+8,9
TP10	AGYLLGKINLKALAALAKKIL	21	11,21	+5
TP10 AGNL	AGYLLGKINL	10	10,52	+2
TP10 KAIL	KALAALAKKIL	11	14	+4
PsNCR351	AVATKCKTDVDCPPSTSIRRYKCTKNKCRYTRLSYG	36	10,27	+7,7
GoNCR308	IITNRRCKSHKDCPGFGKCLKLKCVYTPKR	30	10,72	+8,8

Ĉ: diszulfid kötéssel összekapcsolt cisztein molekulák

Műszerek

Eppendorf Centrifuge 5425 (Merck KGaA, Darmstadt, Németország)
SPECTROstar Nano lemezolvasó (BMG LabTech, Offenburg, Németország)
Áramlási citométer (FlowSight®, Amnis EMD Millipore)
Zeiss Axio Observer inverz mikroszkóp (Carl Zeiss, Németország)
Quorum Q150T ES porlasztó (Quorum, Laughton, UK)
JEOL JSM-7100/LV pásztázó elektronmikroszkóp (Jeol Ltd., Tokió, Japán)
Automata peptidszintetizátor (CEM Liberty Blue, Matthews, NC, USA)
Waters SQ detektor (Milford, MA, USA)

5.2. Alkalmazott módszerek

5.2.1. Sejtvonalak és élesztőgomba törzsek fenntartása, tenyésztése

Élesztőgomba törzsek fenntartása

A törzseket YPD táptalajra oltottuk, majd 30 °C-on 48 órán át inkubáltuk. A tenyészeteket felhasználásig 4 °C-on tároltuk.

Élesztőgomba törzsek tenyésztése

A törzsek felszaporításához szilárd táptalajról egy oltókacsnyi tenyészetet 2 ml YPD tápoldatba oltottunk, majd 30 °C-on egy éjszakán át rázatva tenyésztettük őket a folyamatos oxigénellátást biztosítva.

J774.2 és HaCaT sejtek tenyésztése/fenntartása

A kísérleteinkben humán keratinocita (HaCaT) és egér J774.2 makrofágokat használtunk, melyeket az ATCC gyűjteménytől vásárolt a Mikrobiológiai Tanszék. A sejteket a már korábban leírt összetételű, DMEM tápoldatban növesztettük és tartottuk fenn 37 °C-on 5 V/V% CO₂ tenzió és 95 % relatív páratartalom mellett.

5.2.2. Peptidek szintézise és elemzése

A kísérleteinkben felhasznált peptidek szintézisét és elemzését a Szegedi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Karán Prof. Dr. Tóth Gábor vezetése alatt álló Biomimetikus Rendszerek Kutatócsoport tagjai végezték.

A peptidek szintézisét a szilárd fázisú peptidszintézis (SPPS) szabványos eljárása szerint TentaGel S RAM gyantán végezték automata peptidszintetizátorral (CEM Liberty

Blue, Matthews, NC, USA). Az Fmoc amino-védőcsoportot és a diizopropilkarbodiimid/oxima kapcsolást ötszörös reagensfelesleggel alkalmazták. A fluorenil-9-metoxikarbonil-csoport eltávolítása 2 ciklusban történt (75 °C, 15 másodperc és 90 °C, 50 másodperc), 10% piperazin és 0,1 mol 1-hidroxi-benzotriazol 10% etanolban és 90% DMF-ben oldott elegyével történt. A szintézis befejezése után a peptideket szobahőmérsékleten 3 órán át, 95:5 (v/v) trifluoecetsav (TFA)/víz elegyével választották le a gyantáról, mely 3% (w/v) ditriotreitol és 3% (w/v) triizopropilszilánt tartalmazott. A gyantát szűréssel eltávolították és a peptideket kicsapták jéghideg dietil-éter hozzáadásával. Ezután a csapadékot szűrték, vízben oldották és liofilizálták. A nyers peptideket elemezték és fordított fázisú nagy teljesítményű folyadékkromatográfiával (RP-HPLC) tisztították C18 oszlopon. Az abszorbanciát 220 nm-en detektálták, majd a megfelelő frakciókat egyesítették és liofilizálták. A végtermékek tisztaságát analitikai RP-HPLC segítségével jellemezték 1,0 ml/perc áramlási sebesség mellett. A peptidek azonosságát ESI-MS spektrometriával igazolták Waters SQ detektorral (Milford, MA, USA). Az aminosav-szekvenciákból származó peptidszerkezeteket a Lamiable és munkatársai által fejlesztett PEP-FOLD3 megközelítéssel jósolták [172-174].

5.2.3. Antifungális hatás vizsgálata

Az NCR peptidek *in vitro* antifungális aktivitását a felsorolt élesztőgomba törzsekkel szemben 96 mintahelyes mikrotiter lemezben (Sarstedt) vizsgáltuk. A minimális gátló koncentrációt (Minimal Inhibitory Concentration, MIC) mikrohígítási módszerrel határoztuk meg úgy, hogy a tenyészetek sejtszámát Bürker-kamra segítségével megállapítottuk, majd YNB tápoldatban 4×10^4 sejt/ml koncentrációjú szuszpenziót készítettünk, melyből 95-95 μ l-t vittünk fel a mikrotiter lemez mintahelyeibe. A vizsgált peptidek koncentrációját YNB tápoldatban 500 μ M-ra állítottuk, majd 8 lépcsős felező hígítási sort készítettünk. A kiindulási koncentrációjú tagból és a hígítási sor minden lépéséből 5-5 μ l-t vittünk fel a mikrotiter lemez mintahelyeibe, ahol így a peptidek koncentrációja 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56; 0,78 és 0,39 μ M volt. A mikrotiter lemezeket *C. albicans*, *C. auris*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* és *C. tropicalis* esetében 48 órán át, *Cr. neoformans* IFM 5844 törzs esetében 72 órán át 30 °C-on inkubáltuk.

A flukonazol törzsoldatot 4 mM koncentrációra hígítottuk YNB tápoldatban, majd 7 lépcsős felező hígítási sort készítettünk, melynek kiindulási és minden hígított tagjából

5-5 µl-t mértünk a mikrotiter lemez mintahelyeibe. Így a vegyület végkoncentrációja a mintákban 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12 és 1,56 µM volt. Az amfotericin B törzsoldatot 250 µM koncentrációra hígítottuk YNB tápoldatban, majd 5 lépcsős felező hígítási sort készítettünk, melynek minden tagjából 5-5 µl-t mértünk a mikrotiter lemez mintahelyeibe. Így a vegyület végkoncentrációja a mintákban 12,5; 6,25; 3,12, 1,56 µM és 0,78 µM volt. A mikrotiter lemezeket *C. albicans*, *C. auris*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* és *C. tropicalis* esetében 48 órán át, *Cr. neoformans* IFM 5844 törzs esetében 72 órán át 30 °C-on inkubáltuk.

Ezt követően a minták optikai denzitását 620 nm-en SPEKTROstar Nano lemezolvasó készülék segítségével állapítottuk meg. A spektrometriai kalibrációhoz 100 µl steril YNB tápoldatot használtunk. Növekedési kontrollként hatóanyagot nem tartalmazó tápoldatot adtunk a sejt kultúrához. Az oldószer növekedésre gyakorolt hatásának vizsgálatához a 95 µl sejtszuszpenzióhoz 5 µl DMSO-t adtunk.

A minimális gátló koncentrációt úgy határoztuk meg, hogy a hatóanyag jelenlétében történt növekedést összevetettük a kezeletlen kontroll növekedésével, melyet 100%-nak vettünk. A 90% feletti növekedésgátlást tekintettük a minimális gátló koncentrációnak. A kísérleteket három biológiai ismétlésben és három párhuzamosban végeztük.

Annak megállapítására, hogy a peptid gátló hatásának hátterében fungisztikus vagy fungicid aktivitásuk áll-e, növekedési tesztet végeztünk. 24 óra elteltével a kezeletlen kontroll sejtekből és a peptiddel kezelt sejtekből 5-5 µl mintát adtunk 95-95 µl steril desztillált vízhez, melyet tovább hígítottunk (10, illetve 100 szoros hígítás). Mindegyik hígításból 5 µl-t cseppentettünk ki YPD táptalajra, és összehasonlítottuk a kontroll és a peptiddel kezelt sejtek telepépzését 48 órás 30 °C-on történt inkubáció után.

5.2.4. Peptidek *Cr. neoformans* sejtek membrán permeabilitására gyakorolt hatásának vizsgálata áramlási citometriával

Az egy éjszakán át növesztett *Cr. neoformans* sejteket kétszer mostuk steril desztillált vízzel, majd felfuszpendáltuk YNB tápoldatban és 10^7 sejtet 20 µg/ml végkoncentrációjú indometacinnal inkubáltunk 30 °C-on 30 percen keresztül. A mintákhoz 5 µg/ml koncentrációban calcein-AM-et adtunk, és a szuszpenziót sötétben, 30 °C-on tovább inkubáltuk 3 órán át. A sejteket kétszer mostuk steril desztillált vízzel, hogy a felesleges, fel nem vett festéket eltávolítsuk, majd ezt követően 2×10^5 sejt/ml kiindulási sejtszámmal indítottuk a kezeléseket a **3. táblázatban** felsorolt peptidekkel a

táblázatban megadott koncentrációban. Két óra inkubációs idő letelte után a sejteket kétszer mostuk desztillált vízzel és a sejtek fluoreszcencia intenzitását áramlási citométerrel mértük 488 nm-es gerjesztőlézer használata mellett. Kontrollként calcein-AM-mel festett, peptiddel nem kezelt sejteket (pozitív kontroll), valamint 30 percig 70%-os etanollal kezelt (negatív kontroll) majd calcein-AM-mel festett sejteket használtunk. Három független kísérletet végeztünk, minden kísérlet során minden mintában 10.000 sejt fluoreszcencia intenzitását mértük.

3. táblázat: Az áramlási citometria során felhasznált peptidek és alkalmazott koncentrációik

Peptid	Koncentráció (µM)	Peptid	Koncentráció (µM)
NCR335N ₇₋₂₁	6,25	NCR169C ₁₇₋₃₈ W _{10,20/A}	3,12
NCR335C ₁₇₋₃₃	1,56	AMP1	0,19
NCR169C ₁₇₋₃₈	1,56	AMP2	0,39
NCR169C ₁₇₋₃₈ OX	1,56	AMP2b	0,39

5.2.5. Citotoxicitás vizsgálat

A peptidek citotoxikus hatását egér J774.2 makrofág és humán keratinocita (HaCaT) sejteken MTT redukciós módszerrel alapuló toxicitás vizsgálattal detektáltuk.

Egér J774.2 makrofágok életképességének meghatározásához a sejteket 96 lyukú mikrotiter lemez mintahelyeibe oltottuk (5×10^4 sejt/100 µl/mintahely), majd 37 °C -os inkubátorban tenyésztettük 5 V/V% CO₂ és 95% relatív páratartalom mellett 1 órán keresztül, hogy letapadjanak a sejtek. Az inkubációs idő letelte után a sejteket a **4. táblázatban** szereplő peptidekkel kezeltük a táblázatban feltüntetett koncentrációban.

Három órás kezelés után a J774.2 sejteket PBS-sel mostuk, majd 100 µl MTT reagenst mértünk a mintákra, és tovább inkubáltuk 1 órán keresztül. A formazán kristályokat dimetil-szulfoxidban (DMSO) oldottuk vissza, majd a minták fényelnyelését 570 nm-en mértük SPECTROstar Nano lemezolvasóval. A kezeltlen sejtenyészet kontrollként szolgált. A kísérleteket legalább háromszor végeztük el négy független biológiai ismétléssel.

4. táblázat: Citotoxicitás vizsgálatokhoz használt peptidek és az alkalmazott koncentrációk

Peptid	Koncentráció (µM)	Peptid	Koncentráció (µM)
NCR247	25,00	NCR169C ₁₇₋₃₈ W _{10,20} /A	25,00
NCR335N ₁₋₁₉	25,00	NCR169C ₁₇₋₃₈ Strep-tag	12,50
NCR335N ₇₋₂₁	25,00	TP10	25,00
NCR335C ₁₃₋₃₃	25,00	AMP1	3,12
NCR335C ₁₇₋₃₃	25,00	AMP2	1,56
NCR169C ₁₇₋₃₈	12,50	AMP2b	1,56

A humán keratinociták (HaCaT) életképességének vizsgálatához 10.000 darab HaCaT sejtet osztottunk ki 96 lyukú mikrotiter lemez minden mintahelyébe, majd 37 °C-os inkubátorban tenyésztettük 5 V/V% CO₂ és 95% relatív páratartalom mellett. A következő napon a sejtekhez 0,78; 1,56; 3,12; 6,25; 12,5 és 25 µM koncentrációjú peptidet adtunk. A kísérlet során használt peptidek: NCR335N₁₋₁₉, NCR335N₇₋₂₁, NCR335C₁₋₃₃, NCR335C₁₃₋₃₃, NCR335C₁₇₋₃₃, NCR169C₁₇₋₃₈, NCR169C₁₇₋₃₈OX, NCR169C₁₇₋₃₈W_{10,20}/A. Negyvennyolc órás kezelés után a HaCaT sejteket PBS-sel mostuk és egy órán át 37 °C-on 100 µl MTT reagenssel inkubáltuk. A formazán kristályokat DMSO-ban oldottuk vissza, és a minták fényelnyelését 570 nm-en SPECTROstar Nano lemezolvasóval mértük. A kísérleteket legalább háromszor végeztük el négy független biológiai ismétléssel.

5.2.6. Peptidek flukonazollal és más peptiddel történő kölcsönhatásának vizsgálata

C. auris kombinált kezelése flukonazollal és NCR peptidekkel

A flukonazol, valamint az NCR335C₁₇₋₃₃, NCR169C₁₇₋₃₈ és NCR169C₁₇₋₃₈OX peptidek *in vitro* kölcsönhatását standard „sakktabla titrálási” módszerrel határoztuk meg. A flukonazol 6,25 és 75 µM közötti tartományban, az NCR169C₁₇₋₃₈ és NCR169C₁₇₋₃₈OX peptideket 0,78 és 12,50 µM, az NCR335C₁₇₋₃₃ peptidet pedig 1,56 és 25 µM közötti koncentráció tartományban vizsgáltuk. A kezdeti sejt koncentráció minden mintahelyben 4x10⁴ sejt/ml volt. A mikrotiter lemezeket 72 órán át 30 °C-on inkubáltuk, majd a tenyészetek optikai denzitását 620 nm-en detektáltuk SPECTROstar Nano lemezolvasóval.

5.2.7. Fertőzés, fagocitózis

Az *in vitro* fertőzéshez 96 mintahelyes mikrotiter lemezt használtunk. A *Cr. neoformans* sejteket a korábban leírt módon felszaporítottuk, majd kétszer mostuk steril desztillált vízzel, és steril PBS oldatban $2,5 \times 10^6$ /ml koncentrációjú szuszpenziót készítettünk. A sejteket 15 percig 30 °C-on kezeltük a felsorolt peptidekkel, a zárójelben feltüntetett koncentrációban: AMP1 (3,12 μ M); AMP2b (3,12 μ M); NCR169C₁₇₋₃₈ (12,5 μ M). Az inkubációs idő elteltével a sejteket centrifugálással üleptítettük (1677 g, 5 perc, szobahőmérséklet), majd mostuk PBS pufferrel. Ismételt centrifugálást követően (1677 g, 5 perc) 100 μ l PBS-ben vettük fel őket. A szuszpenzióhoz 11 μ l 1 M nátrium-karbonátot (pH 10) és 2 μ l Alexa Fluor 488 fluoreszcens festéket adtunk, majd a mintákat 30 percig szobahőmérsékleten, fénytől védve inkubáltuk. PBS-el való mosást követően a sejtszámot meghatároztuk, és 5×10^4 /100 μ l J774.2 makrofág sejtet fertőztünk ötszörös mennyiségű ($2,5 \times 10^5$ /100 μ l) élesztőgomba sejtrel. A fertőzött sejteket 37 °C-os inkubátorban 5 V/V% CO₂ és 95% relatív páratartalom mellett 30 és 60 percig inkubáltuk. Az inkubációs idő lejárta után a technikai párhuzamosokat egybemosztuk, és a sejteket PBS-el való mosást követően 100 μ l PBS-ben felszuszpendáltuk. Az így előkészített mintákat Amnis FlowSight készülékkel, IDEAS kiértékelő szoftverrel elemeztük. A fagocitózis hatékonyságának kontrolljaként peptiddel nem kezelt *Cr. neoformans* sejtekkel fertőztük meg a J774.2 makrofág sejteket.

5.2.8. Mikroszkópos vizsgálatok

Fénymikroszkópia

Az NCR335C₁₇₋₃₃ és az NCR169C₁₇₋₃₈ dimorf élesztőgombák sejt morfológiára gyakorolt hatását *C. albicans* ATCC 10231 és *C. tropicalis* CBS 94 sejteken vizsgáltuk. A sejt morfológiát 48 órás, peptid jelenlétében történt inkubáció után Zeiss Axio Observer inverz mikroszkóppal vizsgáltuk. Az alkalmazott koncentráció az NCR335C₁₇₋₃₃ és az NCR169C₁₇₋₃₈ esetében 1,56 és 3,12 μ M, míg az NCR169C₁₇₋₃₈OX esetében 0,78 és 3,12 μ M volt. A kezdeti sejt koncentrációt 4×10^4 sejt/ml-re állítottuk. Kontrollként peptiddel nem kezelt sejt morfológiáját vizsgáltuk.

Pásztázó elektronmikroszkópia

A vizsgálathoz glikollal módosított polietilén-tereftalát (PET-G) fedőlemezeket (Sastedt, Nümbrecht, Németország) és 12 mintahelyes mikrotiter lemezt használtunk. A

fedőlemezeket elhelyeztük a mintahelyekbe majd felvittünk rájuk 600-600 µl-t *C. albicans* ATCC 10231 vagy *C. tropicalis* CBS 94 4x10⁴ sejt/ml koncentrációjú YNB tápoldatban készült szuszpenziókból. A sejteket a kiválasztott peptidekkel 72 órán keresztül 37 °C-os inkubátorban 5 V/V% CO₂ és 95% relatív páratartalom mellett kezeltük. Az inkubációs idő letelte után a tápoldatot eltávolítottuk, a sejteket PBS-sel mostuk, majd 2 órán át 2,5 V/V% glutáraldehidet tartalmazó PBS oldatban fixáltuk őket szobahőmérsékleten. Ezután a *C. albicans* és a *C. tropicalis* mintákat növekvő etanol koncentrációjú oldatban víztelenítettük, a kritikus ponton szárítottuk és 15 nm arannyal vontuk be Quorum Q150T ES porlasztó segítségével. Majd a mintákat JEOL JSM-7100/LV pásztázó elektronmikroszkóppal elemeztük. A minták előkészítését az SZTE Mikrobiológiai Tanszékén végeztük, a minták arannyal történő bevonását és a mikroszkópos vizsgálatokat a Szegedi Biológiai Központban Dr. Domonkos Ildikó végezte.

5.2.9. Biofilm képződésre gyakorolt hatás vizsgálata

AIM tápoldatban 4x10⁴ sejt/ml koncentrációjú szuszpenziót készítettünk a vizsgált *Candida* törzsek tenyészeiteiből, melyből 95-95 µl-t vittünk fel a mikrotiter lemez mintahelyeibe és kiegészítettük 5-5 µl peptiddel az **5. táblázatban** feltüntetett koncentráció tartományban. A kontroll minta esetében 5 µl tápoldattal történt a sejtek kiegészítése. A mintákat 72 órán át 37 °C-on 5 V/V% CO₂ és 95% relatív páratartalom mellett inkubáltuk, majd a kialakult biofilmeket kétszer mostuk PBS pufferrel, hogy eltávolítsuk a ki nem tapadt sejteket. A biofilmbe ágyazott sejtek életképességét XTT redukciós vizsgálattal mértük. Az XTT-t PBS-ben oldottuk fel 0,5 mg/ml koncentrációban, és 1 µM menadionnal egészítettük ki. Miután minden mintához 100 µl XTT oldatot adtunk, a lemezeket 2 órán át 37 °C-on sötétben inkubáltuk. Ezt követően mindegyik felülúszóból 80 µl-t vittünk át új, 96 lyukú lemez mintahelyeibe, és az abszorbanciát 490 nm-en mértük SPECTROstar Nano lemezleolvasóval. A kísérleteket 5 biológiai ismétlésben, két párhuzamosban végeztük.

5. táblázat: A biofilmképződés során használt peptidek és az alkalmazott koncentrációk (μM)

peptid törzs	NCR335N ₇₋₂₁	NCR335C ₁₇₋₃₃	NCR169C ₁₇₋₃₈	NCR169C ₁₇₋₃₈ ox	NCR169C ₁₇₋₃₈ W _{10,20/A}
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	25,00-1,56	12,50-0,78	25,00-1,56	12,50-0,78	25,00-1,56
<i>C. albicans</i> SC5314	25,00-1,56	12,50-0,78	12,50-0,78	6,25-0,39	12,50-0,78
<i>C. albicans</i> SZMC 1458	25,00-1,56	25,00-1,56	12,50-0,78	6,25-0,39	6,25-0,39
<i>C. tropicalis</i> CBS 94	25,00-1,56	25,00-1,56	6,25-0,39	6,25-0,39	6,25-0,39

5.2.10. Peptidek protoplasztokra gyakorolt hatása

A *Cryptococcus neoformans* IFM 5844 és a *Candida tropicalis* CBS 94 törzseket YPD tápoldatba oltottuk, majd 30 °C-on 12 órán keresztül rázattuk az exponenciális fázis eléréséig (5×10^7 sejt/ml).

A sejteket centrifugálással (2519 g, 10 perc, szobahőmérséklet) összegyűjtöttük, és 20 ml előkezelő oldatban felszuszpendáltuk. Szobahőmérsékleten 20 percig történő inkubálás után a mintákat újra centrifugáltuk, majd kétszer mostuk a sejteket 0,8 M szorbit oldattal. Ezt követően felszuszpendáltuk a pelletet 20 ml protoplasztáló oldatban, és a szuszpenziót 90 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. Fél óránként mintát vettünk, melyet desztillált vízben tízszeresére hígítottunk, és mikroszkóppal ellenőriztük a protoplasztképződés intenzitását. Az enzimes kezelést akkor állítottuk le, amikor megfelelő mennyiségű protoplasztot kaptunk mindkét törzsből. A protoplasztokat centrifugálással (1537 g, 10 perc) kiülepítettük, majd kétszer mostuk 0,8 M szorbittal és a szuszpenziók sejszámát Bürker-kamrában meghatároztuk.

Mintánként 2×10^6 protoplasztot kezeltünk NCR169C₁₇₋₃₈ (3,12 μM), NCR335C₁₇₋₃₃ (1,56 és 3,12 μM) és NCR335N₁₆₋₂₉ (25 μM) peptidekkel. Az inkubációs idő lejártá után (30 perc, 30 °C) a protoplasztokat egyszer mostuk 0,8 M szorbittal, hogy a peptidet eltávolítsuk, majd az eredeti szuszpenzióból 10- és 100-szoros hígítást készítettünk. A hígítási sor tagjaiból 50-50 μl -t 2 ml 42 °C-os fedőagarba mérve 0,8 M szorbittal kiegészített YPD táptalaj felszínén eloszlattunk. A csészéket 3 napig 30 °C-on inkubáltuk, majd az inkubációs idő letelte után megszámloltuk a telepeket.

5.2.11. A peptidek hatása *Cr. neoformans* sejtek méretére

A *Cr. neoformans* IFM 5844 tenyészet sejszámát meghatároztuk Bürker-kamra segítségével, majd X-VIVO tápoldatban 4×10^4 sejt/ml koncentrációjú szuszpenziót

készítettünk, melyből 640 µl végtérfogatra összemértük a mintákat mikrocentrifuga csövekben. A sejtekhez a **6. táblázatban** felsorolt peptideket mértük, a táblázatban megadott koncentrációban. A mintákat 48 órán át 37 °C-on 5 V/V% CO₂ és 95% relatív páratartalom mellett inkubáltuk, majd a mintákról Zeiss Axio Observer inverzmikroszkópban felvételt készítettünk, ezt követően a sejtek átmérőjét ImageJ/Fiji programmal mértük. Mintánként 500 sejt mérete alapján boxplot diagramot készítettünk GraphPad Prism v 6.0 szoftverrel.

6. táblázat: A *Cr. neoformans* ellen vizsgált peptidek és koncentrációik

Peptid	Koncentrációk (µM)		Peptid	Koncentrációk (µM)	
NCR044	1,56	3,12	NCR335C ₁₇₋₃₃	6,25	12,50
NCR247	12,50	25,00	NCR169C ₁₇₋₃₈	3,12	6,25
NCR335N ₁₋₁₉	6,25	12,50	NCR169C ₁₇₋₃₈ W _{10,20/A}	6,25	12,50
NCR335N ₇₋₂₁	12,50	25,00	AMP2b	1,56	3,12
NCR335C ₁₋₃₃	12,50	25,00	TP10	6,25	12,50
NCR335C ₁₃₋₃₃	12,50	25,00			

5.2.12. A peptidek sejten belüli lokalizációjának meghatározása

A peptidek sejten belüli lokalizációjának meghatározásához *Cr. neoformans* intakt sejteket használtunk. A sejteket FITC-jelölt NCR335 peptiddel kezeltük 12,5 µM koncentrációban 15 percen át szobahőmérsékleten. A mintákat centrifugáltuk (5 perc, 1677 g, szobahőmérséklet), majd a felülúszót leöntöttük, és a pelletet PBS pufferrel mostuk, hogy a peptidet eltávolítsuk. A centrifugálást és a felülúszó ismételt eltávolítását követően a sejteket 50 µl PBS pufferben felvettük. A mintákból 15-15 µl-t pipettáztunk mikrocentrifugacsövekbe, melyet kiegészítettünk 15-15 µl kalkofluor fehér, illetve DAPI festékkel (ez utóbbit 5 µg/ml végkoncentrációban alkalmazva). Ezt követően a mintákat Leica Stellaris lézeres pásztázó szuperfelbontású konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk. Kontrollként peptiddel nem kezelt sejteket vizsgáltunk.

5.2.13. EMSA (Electrophoretic mobility shift assay)

A peptidek DNS-hez történő kötődésének vizsgálatára EMSA módszert alkalmaztunk. Ehhez körülbelül 650 bp hosszúságú PCR fragmentumot (*Candida albicans* genomi DNS-ről NL1-NL4 primerek segítségével felszaporított D1-D2 régió) használtunk. A reakcióelegy 10 µl végtérfogatú volt, melyben 10; 7,5; 5 és 2,5 µM

koncentrációjú NCR044 peptiddel kezeltünk 150 ng DNS-t steril desztillált vízben (AccuGENE Molecular Biology Water, Lonza) 15 percig 30 °C-on. A reakcióelegyhez 2 µl 40% szacharóz oldatot adtunk, majd a mintákat felvittük agaróz gél mintahelyeibe.

Az agaróz gél 40 V feszültségű elektromos térben futtattuk TAE pufferben. Markerként GeneRuler 1 kb DNA ladder-t használtunk. A gél 1 µg/ml koncentrációjú etídium-bromiddal festettük desztillált vízben 15 percig, a DNS fragmentumokat UV fény alatt tettük láthatóvá.

Annak bizonyítására, hogy az EMSA módszerrel kapott eredmények a peptid DNS-hez való kötődésének következtében alakultak ki, enzimátikus kezeléseket vetettük alá az NCR044 peptiddel kezelt DNS-t. A kísérlet során a fent leírt körülmények közt (15 perc, 30 °C) kezeltük a DNS-t 10 µM NCR044 peptiddel. Négy reakcióelegyet állítottunk össze, az egyik mintát csak peptiddel kezeltük, a másikhoz a peptiddel történt kezelés után 1 µl proteináz K oldatot adtunk, és a mintát további 15 perc inkubációnak vetettük alá 30 °C-on. A harmadik és negyedik mintához 1 unit DNázt, valamint 1,2 µl 10x-es töménységű DNáz puffert adtunk. Az inkubációs idő leteltével a negyedik mintához 1 µl proteináz K oldatot adtunk és 15 percig kezeltük 30 °C-on.

A mintákat agaróz gél mintahelyeibe pipettáztuk, a gél 40 V feszültségű elektromos térben futtattuk TAE pufferben, majd etídium-bromiddal történt festés után UV fényben detektáltuk a DNS fragmentumokat. Markerként GeneRuler 1 kb DNA ladder-t használtunk.

5.2.14. Affinitás kromatográfiai vizsgálatok

A kationos NCR169C peptid célmolekuláinak azonosításához affinitás kromatográfiát alkalmaztunk. Ehhez fehérje preparátumot készítettünk *C. albicans* SC5314 törzsből. A törzset 100 ml YPD tápoldatban tenyésztettük 30 °C-on egy éjszakán át, majd a sejteket centrifugálással kiülepítettük (10 perc, 2214 g, szobahőmérséklet) és a felülúszó eltávolítása után mostuk a pelletet steril desztillált vízben, majd ismételt centrifugálás után felvettük a sejteket jéghideg YNB oldatban. A sejtek feltáráshoz két különböző módszert alkalmaztunk. Az egyik módszer során French Press készüléket használtunk 20.000 psi nyomást alkalmazva. A szuszpenziót háromszor egymás után kezeltük a készülékkel ügyelve arra, hogy a sejthomogenizátum ne melegedjen. A másik módszer során a szuszpenzióhoz 1:1 arányban 0,5- 1 mm átmérőjű üvegyöngyöt adtunk és négyszer 30 másodpercig rázattuk a sejteket a gyöngyökkel. A lizátumokból a fel nem

táródott sejteket és nagyobb sejtörmeléseket centrifugálással távolítottuk el (4 °C, 20 perc, 6708 g).

A felülúszó fehérjetartalmát Bradford reagenssel mértük, majd a mintát 2 mg/ml koncentrációjúra hígítottuk. Az elkészített fehérjepreparátummal a „pull down” kísérleteket Dr. Tiricz Hilda végezte el, az egyes sávokban a fehérjék azonosítását gélből való izolálás után az SZBK Proteomikai Csoportja végezte LC-MS/MS tömegspektrometriai analízissel.

5.2.15. Statisztikai analízis

Az eredmények statisztikai analízise minden esetben GraphPad Prism v 6.0 szoftverrel, parametrikus *t*-teszt használatával történt. Statisztikailag szignifikáns eltérést abban az esetben állapítottunk meg, ha $P < 0,05$ volt.

A peptidek sejtméretre gyakorolt hatásának vizsgálatára Kruskal-Wallis tesztet használtunk. Szignifikáns eltérés esetén annak okát páronkénti összehasonlításokkal (Mann-Whitney próba) vizsgáltuk. A többszörös összehasonlításokra történő korrekció során Benjami-Hochberg módszert alkalmaztunk. Tekintettel a kontroll lényegesen nagyobb mintanagyságára minden peptidre a kontrollból 100 mintát vettünk, melynek nagysága a két kezelt minta átlaga. A közölt *p*-érték a 100 ismétlés átlaga. A teszteket R-ben (R verzió 4.3.1) végeztük [R Core Team (2023). R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org>].

5.2.16. Adatelemzés

A hatóanyagok együttes hatását az egyes antifungális szerek legalacsonyabb MIC-értékeinek felhasználásával állapítottuk meg, melyek alapján frakcionált gátló koncentráció indexeket (FICI) számoltunk az alábbi képlet segítségével: $FICI = FICI_A + FICI_B$. $FICI_A = (MIC_A \text{ kombinációban}) / (MIC_A \text{ önmagában})$; $FICI_B = (MIC_B \text{ kombinációban}) / (MIC_B \text{ önmagában})$. A két hatóanyag között fellépő kölcsönhatás [175] szinergikus, ha $FICI \leq 0,5$; additív, ha $0,5 < FICI \leq 1,0$; indifferens, ha $1,0 < FICI \leq 2,0$; antagonistá, ha $FICI > 2$.

6. EREDMÉNYEK

6.1. Peptidek opportunista humán patogén élesztőgombákra gyakorolt hatása

Kísérleteink során 27 kationos tulajdonságú, eltérő izoelektromos ponttal (pI 7,57-14) rendelkező NCR peptid (**2. táblázat**) gombaellenes hatását vizsgáltuk *C. albicans* ATCC 10231, SC5314 és SZMC 1458, *C. auris* 0381, *C. glabrata* CBS 138, *C. parapsilosis* CBS 604, *C. tropicalis* CBS 94 és *Cryptococcus neoformans* IFM 5844 törzsek ellen.

A peptidek minimális gátló koncentrációjának meghatározásához a kísérleteket YNB tápoldatban mikrotiter lemezen végeztük, a hatóanyagokat 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56; 0,78 és 0,39 μM koncentrációban alkalmaztuk.

A peptidek közül 11 az NCR335 peptid származéka volt. Az NCR335 egy 64 aminosav hosszúságú kationikus tulajdonságú peptid, melynek izoelektromos pontja 11,22 és 4 ciszteint tartalmaz konzervált pozícióban a peptid C-terminális részén. Antifungális aktivitását már korábbi kísérletek bizonyították [170]. A teljes peptid hosszúsága miatt felbontásra került egy N-(NCR335N₁₋₃₁) és C-terminális (NCR335C₁₋₃₃) régióra. Munkánk során az N- és C-terminális régiók származékainak antifungális hatását vizsgáltuk, hogy megállapítsuk, mely szakasz lehet felelős a gombaellenes aktivitásért. Az NCR335N peptid 4 származéka közül az NCR335N₇₋₂₁ rendelkezett a legszélesebb hatásspektrummal (**7. táblázat**). A *C. albicans* ATCC 10231, SC5314 és SZMC 1458, valamint a *C. glabrata* CBS 138 növekedését 25 μM koncentrációban gátolta, míg a *C. tropicalis* CBS 94 esetében a MIC 6,25 μM , a *Cr. neoformans* esetében pedig 12,5 μM volt. Ugyanakkor a *C. parapsilosis* és a *C. auris* nem volt érzékeny erre a peptidre. Az NCR335N₇₋₂₁ peptiddel átfedést mutató NCR335N₁₋₁₉, melyből hiányzik az utolsó kettő aminosav (NR), valamint az N-terminális rész hét aminosavval hosszabb, csak a *C. albicans* ATCC 10231 (MIC 25 μM), *C. parapsilosis* CBS 604 (MIC 12,50 μM) és *Cr. neoformans* (MIC 25 μM) ellen bizonyult hatásosnak. Az NCR335N₁₆₋₂₉ nem volt hatással a törzsek növekedésére a vizsgált koncentráció tartományban, míg az NCR335N₁₋₁₅ csak a *Cr. neoformans* növekedését gátolta (MIC 6,25 μM).

Az NCR335 C-terminális része, az NCR335C₁₋₃₃ a *C. auris* és a *C. tropicalis* kivételével minden törzs növekedését gátolta. Ezen szekvencia 5 származéka közül az NCR335C₁₇₋₃₃, amely az NCR335C₁₋₃₃ utolsó 17 aminosavának felel meg, még nagyobb aktivitást mutatott, mint a teljes C-terminális szakasz, a *C. auris* kivételével valamennyi

törzs ellen hatékony volt és csökkent a MIC értéke a *C. tropicalis* (3,12 μM), *C. albicans* ATCC 10231 (12,5 μM), *C. parapsilosis* (12,5 μM) és a *Cr. neoformans* (3,12 μM) esetében. Az NCR335C₁₇₋₃₃ peptidnél négy aminosavval hosszabb NCR335C₁₃₋₃₃ hatásspektruma csökkent, csak a *C. albicans* SC5314 és a *Cr. neoformans* IFM 5844 bizonyult érzékenynek rá. Az NCR335C₁₇₋₂₇, NCR335C₁₋₈, NCR335C₉₋₁₆ és NCR335C₁₋₁₆ egyik vizsgált törzssel szemben sem mutatott aktivitást.

A 38 aminosav hosszúságú, gyengén kationos tulajdonságú (pI: 8,45) NCR169 peptid korábbi kísérletekben nem bizonyult antifungális hatásúnak [164]. Ugyanakkor a peptid C-terminális szakasza (NCR169C₁₇₋₃₈) erősen kationos tulajdonságú (pI: 10,1), így feltételeztük gombaellenes aktivitását. Vizsgáltuk továbbá, hogy a 10. és 20. pozícióban lévő triptofán aminosavak alaninra történő cseréje (NCR169C₁₇₋₃₈W_{10,20}/A) valamint a két cisztein SH csoportjának oxidálása (NCR169C₁₇₋₃₈OX), ami diszulfidhíd kialakulását eredményezi a peptiden belül, milyen hatással van aktivitásukra. Az NCR169C származékai, az NCR169C₁₇₋₃₈ és az NCR169C₁₇₋₃₈OX minden vizsgált törzs ellen, köztük a *C. auris* ellen is hatékonyak bizonyultak, de hatástalannak a *C. parapsilosis* esetében (7. táblázat). Mindkét peptid MIC értéke 3,12 μM és 25 μM között volt. Az oxidált forma, az NCR169C₁₇₋₃₈OX hatékonyabb volt a *C. albicans* és a *C. glabrata* törzsekkel szemben. Az NCR169C₁₇₋₃₈W_{10,20}/A elvesztette aktivitását a *C. auris* ellen, de a többi vizsgált törzs növekedését gátolta. Ugyanakkor a MIC értékek a *C. tropicalis* és a *Cr. neoformans* esetében emelkedtek 3,12 μM -ról 6,25 μM -ra.

Az NCR169C₁₇₋₃₈Strep-tag peptidet (a peptid C-terminális részéhez Strep-tag lett kötve) az affinitás kromatográfiai vizsgálatok során használtuk. A Strep-tag kötés hatására a peptid nem veszítette el antifungális aktivitását, a vizsgált törzsekkel, *C. albicans* és *Cr. neoformans*, szemben hatásosnak bizonyult.

Az NCR247 a *C. albicans* SZMC 1458 és a *C. tropicalis* kivételével minden vizsgált törzs ellen aktív volt, míg C-terminális része, az NCR247C a vizsgált koncentráció-tartományban elvesztette hatékonyságát a *C. albicans* ATCC 10231 és SC5314 törzsek ellen. A TP10 peptid a *C. albicans* SZMC 1458 és a *C. tropicalis* CBS 94 törzseket kivéve a többi törzs növekedését gátolta.

A vizsgálatainkba később bevont NCR044, valamint az AMP származékok hatását csak a *Cr. neoformans* IFM 5844 ellen teszteltük. Mindegyik peptid igen jelentős *Cryptococcus*-ellenes aktivitást mutatott, három peptid esetében mértük a legalacsonyabb

MIC értékeket, ami az AMP1 esetén 0,39 μM , az AMP2 0,78 μM , míg az AMP2b 0,78 μM volt.

A vizsgált peptidek hatékonyságát két gombaellenes szerrel, a flukonazollal és az amfotericin B-vel hasonlítottuk össze. A flukonazolt 0,78 és 200 μM közötti koncentráció tartományban alkalmaztuk. Leghatékonyabbnak a *C. albicans* SZMC 1458 (MIC 1,56 μM) ellen bizonyult, a többi törzs eltérő érzékenységet mutatott a vegyülettel szemben.

A MIC érték a *C. parapsilosis* esetében 6,25 μM , a *C. albicans* SC5314 12,50 μM , a *C. auris* 25 μM , a *C. tropicalis* 100 μM , míg a *C. glabrata* és a *C. albicans* ATCC 10231 esetében 200 μM volt. Az amfotericin B MIC értéke 1,56 és 6,25 μM között változott: a *C. glabrata* és a *Cr. neoformans* volt a legérzékenyebb (MIC 1,56 μM), ezt követte a három *C. albicans* törzs és a *C. parapsilosis* (MIC 3,12 μM), majd a *C. auris* és a *C. tropicalis* (MIC 6,25 μM) (**7. táblázat**). Eredményeink alapján az AMP1, AMP2, valamint az AMP2b hatékonyabbak a *Cr. neoformans* ellen, mint a flukonazol vagy az amfotericin B. *C. tropicalis* esetében az NCR169C₁₇₋₃₈, NCR169C_{17-38ox}, valamint az NCR335C₁₇₋₃₃ MIC értékei bizonyultak alacsonyabbnak, a flukonazol és az amphotericin B MIC értékeinél.

Vizsgáltuk, hogy az antifungális hatással rendelkező peptidek NCR044, NCR247, NCR247C, NCR247C/S, NCR335, NCR335N₁₋₁₉, NCR335N₁₋₁₅, NCR335N₇₋₂₁, NCR335C₁₋₃₃, NCR335C₁₃₋₃₃, NCR335C₁₇₋₃₃, NCR169C₁₇₋₃₈, NCR169C_{17-38ox}, NCR169C₁₇₋₃₈W_{10,20/A}, NCR169C₁₇₋₃₈Strep-tag, TP10, AMP1, AMP2 és AMP2b fungicid vagy fungisztatikus hatásúak-e. Megállapítottuk, hogy valamennyi peptid fungicid hatású, a sejtek pusztulásához szükséges fungicid koncentrációk vagy egyenlők, vagy kétszer magasabbak voltak, mint a **7. táblázatban** bemutatott minimális gátló koncentrációk (**M1. ábra**).

7. táblázat: A vizsgált peptidek minimális gátlókoncentrációja (μM) *Candida* és *Cryptococcus* törzsek ellen

Peptid	Ca ATCC 10231	Ca SC5314	Ca SZMC 1458	Cau 0381	Cg CBS 138	Cp CBS 604	Ct CBS 94	Crn IFM 5844
NCR044	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	6,25
NCR247	12,50	12,50	-	NA	12,50	12,50	-	6,25
NCR247C	-	-	-	NA	12,50	6,25	-	6,25
NCR247C/S	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	6,25
NCR335-FITC	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	12,50
NCR335N ₁₋₁₉	25,00	-	-	-	-	12,50	-	25,00
NCR335N ₁₋₁₅	-	-	-	-	-	-	-	6,25
NCR335N ₇₋₂₁	25,00	25,00	25,00	-	25,00	-	6,25	12,5
NCR335N ₁₆₋₂₉	-	-	-	-	-	-	-	-
NCR335C ₁₋₃₃	25,00	12,50	12,50	-	25,00	25,00	-	6,25
NCR335C ₁₃₋₃₃	-	12,50	-	-	-	-	-	6,25
NCR335C ₁₇₋₃₃	12,50	12,50	12,50	-	25,00	12,50	3,12	3,12
NCR335C ₁₇₋₂₇	-	-	-	-	-	-	-	-
NCR335C ₁₋₈	-	-	-	-	-	-	-	-
NCR335C ₉₋₁₆	-	-	-	-	-	-	-	-
NCR335C ₁₋₁₆	-	-	-	-	-	-	-	-
NCR169C ₁₇₋₃₈	25,00	12,50	12,50	6,25	25,00	-	3,12	3,12
NCR169C ₁₇₋₃₈ OX	6,25	6,25	6,25	12,50	6,25	-	3,12	3,12
NCR169C ₁₇₋₃₈ W _{10,20} /A	25,00	12,50	6,25	-	12,50	-	6,25	6,25
NCR169C ₁₇₋₃₈ Strep-tag	12,50	12,50	6,25	NA	NA	NA	NA	3,12
TP10	12,50	12,5	-	NA	25,00	12,50	-	12,50
TP10 AGNL	-	-	-	-	-	-	-	-
TP10 KAIL	-	-	-	-	-	-	-	-
PsNCR351	-	-	-	-	-	-	-	-
GoNCR308	-	-	-	-	-	-	-	3,12
AMP1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0,39
AMP2	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0,78
AMP2b	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0,78
Flukonazol	200,00	12,50	1,56	25,00	200,00	6,25	100,00	25,00
Amfotericin B	3,12	3,12	3,12	6,25	1,56	3,12	6,25	1,56

-: növekedés gátlás nem volt tapasztalható 25 μM koncentrációig, NA: nincs adat, Ca: *Candida albicans*, Cau: *Candida auris*, Cg: *Candida glabrata*, Cp: *Candida parapsilosis*, Ct: *Candida tropicalis*, Crn: *Cryptococcus neoformans*

6.2. *C. auris* sejtek kombinált kezelése peptid származékokkal és flukonazollal

A *C. auris*, melynek eddig ismert törzsei gyakran multirezisztensek, a vizsgált peptidek közül csak kettőre, az NCR169C₁₇₋₃₈ (MIC 6,25 µM) és az NCR169C_{17-38OX} (MIC 12,50 µM) bizonyult érzékenynek. A flukonazol *C. auris* elleni minimális gátló koncentrációja 25 µM. Megvizsgáltuk a két aktív két peptid, valamint egy a vizsgált fajok ellen hatástalan peptid, az NCR335C₁₇₋₃₃ flukonazollal történő kombinációját e faj 0381 törzse ellen.

A peptidek egymással és flukonazollal történő kölcsönhatását sakktábla titrálási módszerrel végeztük. A hatóanyagok együttes hatását a frakcionált gátló koncentráció (FIC) elemzésével értékeltük. Szinergizmust három kombináció esetében figyeltünk meg, mely során a növekedésgátlást úgy értük el, hogy a flukonazol 6,25 µM koncentrációban együtt alkalmaztuk 1,56 µM NCR169C_{17-38OX} peptiddel, a másik két kombinációban az NCR169C₁₇₋₃₈ peptidet 3,12 µM koncentrációban kombináltuk 1,56 µM NCR169C_{17-38OX} peptiddel vagy 1,56 µM NCR169C₁₇₋₃₈ peptidet 3,12 µM NCR335C₁₇₋₃₃ peptiddel. A flukonazol (12,50 µM) és az NCR169C₁₇₋₃₈ (0,78 µM) kombinációjának vizsgálata során additivitás volt megfigyelhető, míg a flukonazol (25 µM) és az NCR335C₁₇₋₃₃ (1,56 µM) hatása közömbös volt egymásra (**8. táblázat**). Antagonista kölcsönhatást egyik esetben sem tapasztaltunk, viszont a *C. auris* peptidekkel és flukonazollal történő kombinált kezelése a peptidek minimális gátló koncentrációját felére-nyolcadára csökkentette az egyedüli hatóanyagként történő alkalmazásához képest.

8. táblázat: NCR peptid származékok és flukonazol kombinált alkalmazásának hatása *C. auris* 0381 törzsre

„A” vegyület	„B” vegyület	FIC _A (µM)	FIC _B (µM)	FIC	Kölcsönhatás
Flukonazol	NCR335C ₁₇₋₃₃	1 (25)	0,125* (1,56)	0,0125*	közömbös
	NCR169C ₁₇₋₃₈	0,5 (12,50)	0,125 (0,78)	0,625	additív
	NCR169C _{17-38OX}	0,25 (6,25)	0,25 (1,56)	0,5	szinergizmus
NCR169C ₁₇₋₃₈	NCR335C ₁₇₋₃₃	0,125 (1,56)	0,25* (3,12)	0,375*	szinergizmus
	NCR169C _{17-38OX}	0,25 (3,12)	0,25 (1,56)	0,5	szinergizmus

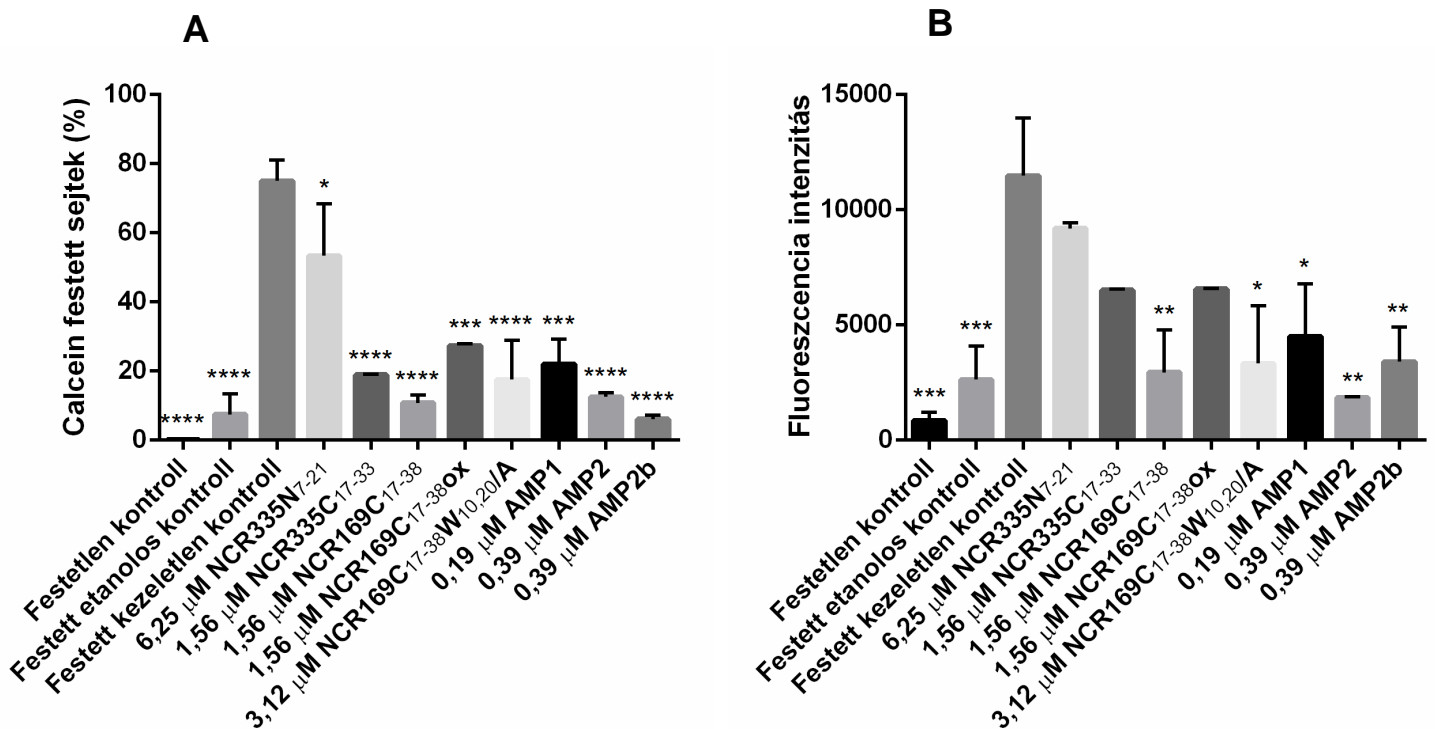
* fiktív FIC értéket képvisel, amely alacsonyabb is lehet, mivel az NCR335C₁₇₋₃₃ inaktív volt a *C. auris* ellen 25 µM-nál, ennek ellenére 25 µM-t használtunk MIC-ként a FIC kiszámításához.

6.3. Peptidek sejtmembrán permeabilitására gyakorolt hatásának vizsgálata áramlási citometriával

A peptid-kezelés élesztőgomba sejtek membrán permeabilitására gyakorolt hatását az intracellulárisan felhalmozódott festék, a calcein fluoreszcencia intenzitásának, valamint a calcein-pozitív sejtek arányának áramlási citometriás mérésével vizsgáltuk. A calcein-acetoxi-metil-észter (calcein-AM) egy nem fluoreszkáló, a sejtmembránon passzívan a sejtekbe jutó festék. Az élő sejtekben észteráz enzimek működésének következtében az acetoxi-metil csoport lehasad a molekuláról és fluoreszcens calcein szabadul fel, mellyel szemben a sejtmembrán impermeábilis. A calcein a sejtekből a sejtmembrán permeabilitásának növelésével vagy ATP-kötő kazettával (ATP binding cassette, ABC) rendelkező transzporterek segítségével tud kijutni, ilyenkor a sejtek festődése csökken. Az ABC transzporterek működését specifikus vegyületekkel, például indometacinnal gátolni tudjuk, így a calcein sejtekből történő kiáramlása a membrán permeabilitás megváltozása miatt következik be.

A kísérleteket a *Cr. neoformans* IFM 5844 törzsszel végeztük, melyre azért esett a választásunk, mert ez a faj bizonyult legérzékenyebbnek a peptidekre, esetében kaptuk a legalacsonyabb MIC értékeket. A kapott eredményeket két módon értékeltük. Egyrészt a calceinnel-festett sejtek arányát vizsgáltuk a populációban (**3.A ábra**), másrészt vizsgáltuk a festődött sejtek fluoreszcencia intenzitását (**3.B ábra**). A calceinnel-festett, peptiddel nem kezelt kontroll mintában a sejtek 75%-a festődött calceinnel, a festődött sejtek fluoreszcencia intenzitása 11.477 eq volt. A festetlen kontrollban a festődött sejtek aránya kevesebb, mint 0,5% (fluoreszciaintenzitás 856 eq), míg az etanolos kontrollban 7% (fluoreszciaintenzitás 2627 eq). Megállapítottuk, hogy a peptidek közül a legmagasabb izoelektromos ponttal (pI:14) rendelkező NCR335N₇₋₂₁ peptiddel történt kezelés hatására csökkent a calceinnel-festett sejtek aránya, ugyanakkor a peptiddel kezelt minták közül itt volt a legmagasabb, 53,35%, és a legmagasabb a fluoreszcencia intenzitást is itt detektáltuk (9.100 eq). Ez 21% csökkenést jelent a fluoreszcencia intenzitásban és 27% csökkenést a festődött sejtek arányában a kontroll, peptiddel nem kezelt, calceinnel festett, mintához képest. A kevésbé kationos NCR335C₁₇₋₃₃, NCR169C_{17-38OX}, NCR169C_{17-38W}_{10,20/A} és AMP1 esetében mind a calceinnel festődött sejtek aránya (sorrendben 25, 36, 23, 25%), mind a fluoreszcencia intenzitás csökkent (sorrendben 55, 56, 29, 39%). Az NCR169C₁₇₋₃₈, AMP2 és AMP2b peptidekkel történő kezelések hatására a sejtmembrán permeabilitása feltételezhetően jelentős mértékben

megnőtt, ez okozhatta, hogy a sejtekből történő calcein kiáramlása itt volt a legnagyobb mértékű (a festődött sejtek aránya egyenként 14, 16, valamint 8%). A festett sejtek aránya az AMP2b-kezelt mintában volt a legkisebb, 8%, míg a legalacsonyabb fluoreszcencia intenzitás (1800 eq) is ezzel a peptiddel kezelt minta esetében volt megfigyelhető (3.B ábra).

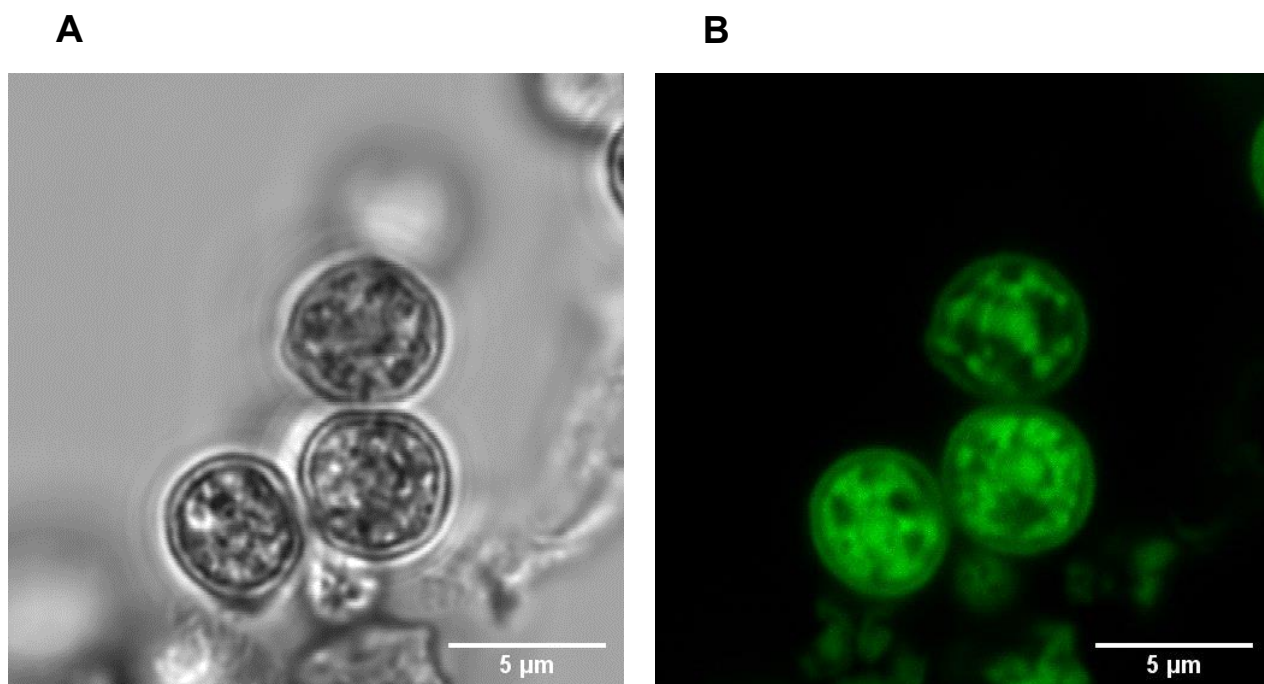


3. ábra: Calceinnel festődött *Cryptococcus neoformans* sejtek aránya (A) és a festődött sejtek fluoreszcencia intenzitása (B) a kontroll mintákban és peptid-kezelés után

Kontroll minták: festetlen, calcein-AM-mel festett, etanolos kezelés után calcein-AM-mel festett *Cr. neoformans* sejtek. Az ábra három független kísérlet eredménye. (*: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$, ***: $p \leq 0,001$, ****: $p \leq 0,0001$, független mintás t-próba)

6.4. Peptidek sejten belüli lokalizációjának meghatározása *Cr. neoformans* sejtekben

Az antimikrobiális peptidekre jellemző, hogy a sejtmembránban lokalizálódnak és a membrán permeabilitás megváltoztatásán keresztül fejtik ki hatásukat. Ezen adatokból kiindulva konfokális mikroszkóp segítségével vizsgáltuk a FITC-jelölt NCR335 peptid *Cr. neoformans* sejteken belüli lokalizációját. A fluoreszcens mikroszkópos képek alapján a peptid jelenléte észlelhető a sejtmembránban, de nagyobb koncentrációban található meg a citoplazmában, ahol nem tudtuk specifikusan lokalizálni egyik sejtstruktúrához sem (4. ábra).

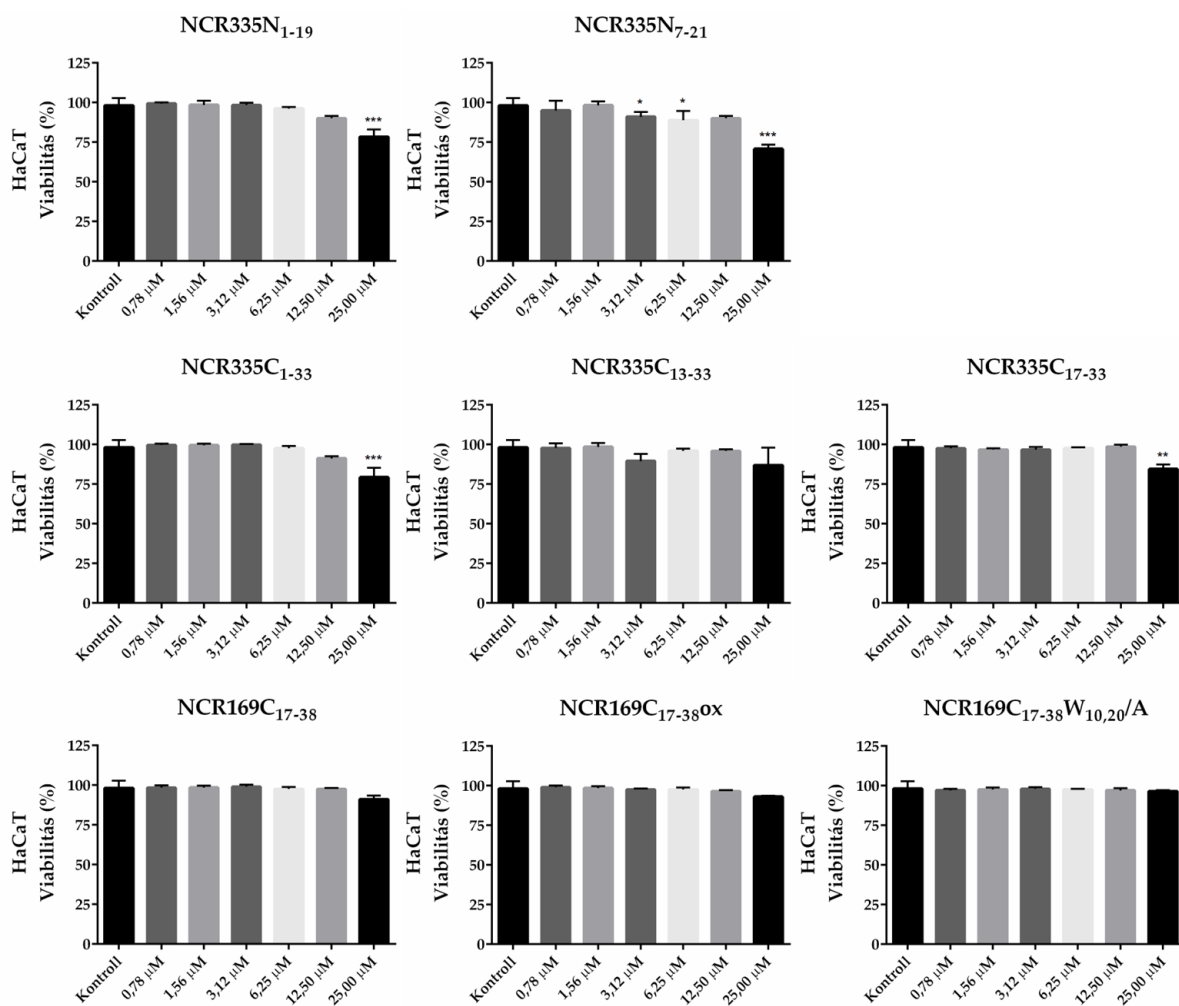


4. ábra: FITC-jelölt NCR335 peptiddel kezelt és DAPI-val festett *Cr. neoformans* IFM 5844 sejtek

A: fénymikroszkópos kép, **B:** fluoreszcens mikroszkópos kép

6.5. Az NCR peptidek nem, vagy csak mérsékelt citotoxicitást mutatnak humán keratinocitákon

Szakirodalmi adatok alapján a *Medicago truncatula* által termelt NCR peptidek nem, vagy csak kismértékben bizonyultak toxikusnak humán sejtek ellen, azonban nem zárhattuk ki, hogy az általunk tesztelt NCR peptid származékok nem mutatnak citotoxicitást. A peptidek esetleges toxikus hatását humán keratinocita (HaCaT) sejteken vizsgáltuk. A humán keratinocita sejteket 48 órán keresztül 0,78 és 25 µM közötti koncentráció tartományban kezeltük NCR335N₁₋₁₉, NCR335N₇₋₂₁, NCR335C₁₋₃₃, NCR335C₁₃₋₃₃, NCR335C₁₇₋₃₃, NCR169C₁₇₋₃₈, NCR169C_{17-38OX} és NCR169C_{17-38W_{10,20}/A} peptidekkel, majd a sejtek életképességét MTT redukciós módszer segítségével határoztuk meg. Alacsony koncentrációnál egyik peptid sem mutatott figyelemre méltó citotoxicitást, de 25 µM koncentrációjú peptiddel történt kezelés esetén a keratinocita sejtek életképességének csökkenése volt megfigyelhető (**5. ábra**). Ez alól csak az NCR169C_{17-38W_{10,20}/A} peptid volt kivétel, ami a vizsgált koncentráció tartományban nem csökkentette a sejtek életképességét.



5. ábra. NCR peptidek hatása humán keratinocita sejtek életképességére

A sejtek életképességét 48 órás peptid-kezelés után MTT redukációs módszerrel határoztuk meg.
 (*: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$, ***: $p \leq 0,001$, független mintás t-próba)

6.6. Az NCR peptidek citotoxicitásának vizsgálata J774.2 makrofágokon

Szakirodalmi adatok alapján a tápoldat összetétele befolyásolja a peptidek hatékonyságát. Az emlős sejtek (HaCaT és J774.2) tenyésztéséhez komplex tápoldatra van szükség, ezért a peptidek hatékonyságát az emlős sejtek tenyésztésére alkalmas X-VIVO tápoldatban is megvizsgáltuk *Cr. neoformans* IFM 5844 törzs ellen.

Megállapítottuk, hogy a peptidek hatékonysága a legtöbb esetben csökkent az X-VIVO tápoldatban, a minimális gátló koncentrációk két-, háromszorosra növekedtek a YNB tápoldatban megállapított értékekhez képest (**9. táblázat**). Egyetlen kivételt az

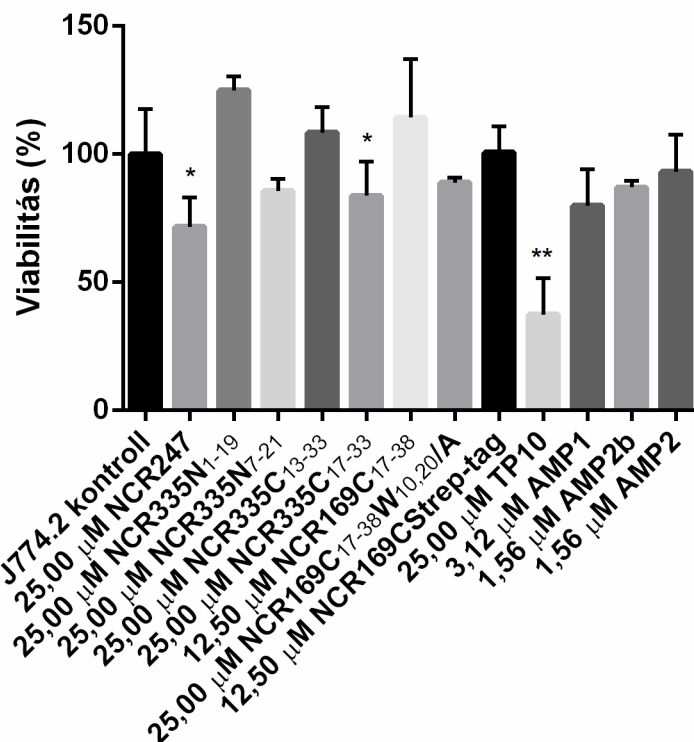
NCR044 peptid jelentett, ahol a MIC érték csökkent; X-VIVO tápoldatban 3,12 μM , míg YNB tápoldatban 6,25 μM .

9. táblázat: A vizsgált peptidek *Cryptococcus neoformans* IFM 5844 törzs elleni minimális gátló koncentrációja YNB és X-VIVO tápoldatokban

Peptid	MIC (μM) X-VIVO	MIC (μM) YNB
NCR044	3,12	6,25
NCR247	25,00	6,25
NCR247C	-	6,25
NCR335N ₁₋₁₉	25,00	25,00
NCR335N ₁₋₁₅	-	6,25
NCR335N ₇₋₂₁	25,00	12,5
NCR335C ₁₋₃₃	-	6,25
NCR335C ₁₃₋₃₃	25,00	6,25
NCR335C ₁₇₋₃₃	25,00	3,12
NCR169C ₁₇₋₃₈	12,50	3,12
NCR169C ₁₇₋₃₈ W _{10,20} /A	25,00	6,25
NCR169C ₁₇₋₃₈ Strep-tag	12,50	3,12
TP10	25,00	12,50
GoNCR308	12,50	3,12
AMP1	3,12	0,39
AMP2	1,56	0,78
AMP2b	3,12	0,78

-: növekedés gátlás nem volt tapasztalható.

Az előzőekben a *Cr. neoformans* IFM 5844 törzsre meghatározott minimális gátló koncentrációval (**9. táblázat**) megegyező koncentrációjú peptiddel kezeltük a J774.2 sejteket 3 órán keresztül, majd a sejtek életképességét MTT redukciós módszerrel határoztuk meg. A peptidek közül a TP10 hatására, melyet 25 μM koncentrációban alkalmaztunk, megközelítőleg 60%-kal csökkent a J774.2 sejtek életképessége a nem kezelt kontrollhoz viszonyítva (**6. ábra**). Az NCR247 és az NCR335C₁₇₋₃₃ kezelés (mindkettő 25 μM) egyenként 25% illetve 15% életképesség csökkenést eredményezett. A többi peptid nem csökkentette szignifikánsan a J774.2 sejtek életképességét.



6. ábra. NCR peptidek hatása J774.2 sejtek életképességére

A sejtek életképességét 3 órás peptid-kezelés után MTT módszerrel határoztuk meg.

(*: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$, ****: $p \leq 0,0001$, független mintás t-próba)

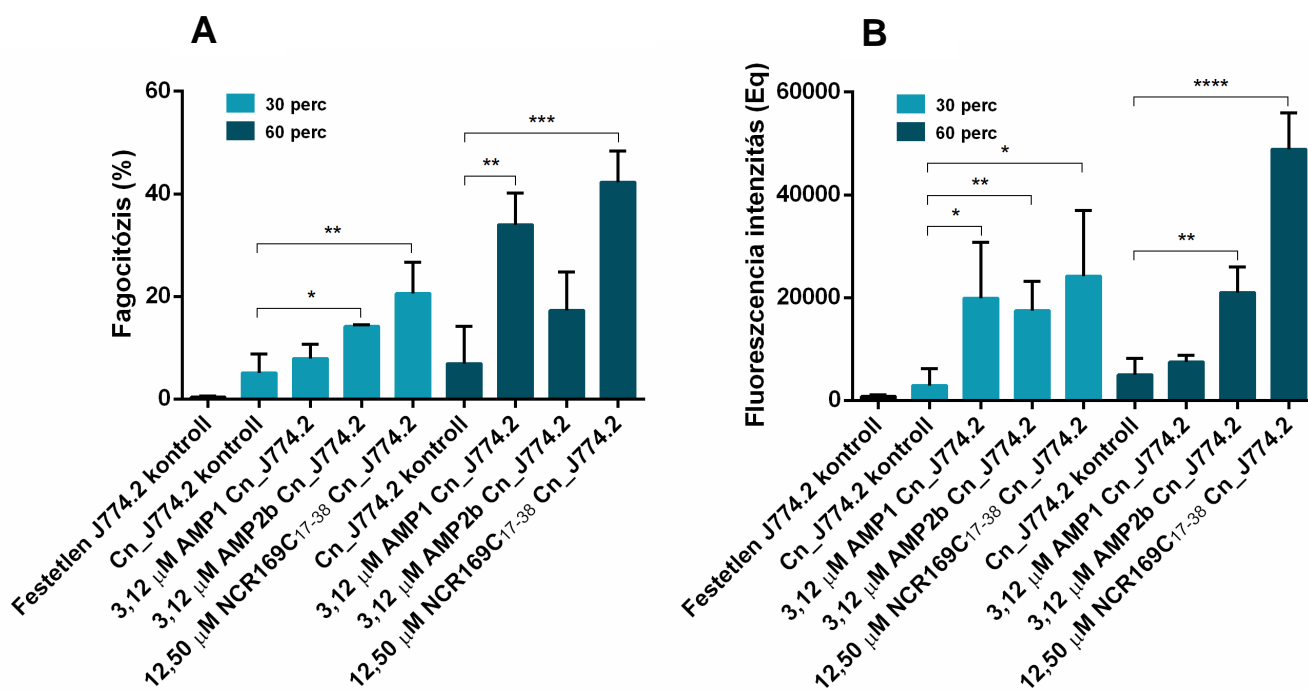
6.7. Peptidek hatása J774.2 egér makrofágok fagocitáló képességére

Az előzetes kísérletek során $5 \times 10^4/100 \mu\text{l}$ J774.2 makrofág sejtet fertőztünk ötszörös mennyiségű ($2,5 \times 10^5/100 \mu\text{l}$) Alexa Fluor 488 festéssel festett élesztőgomba sejtrel. A fertőzött sejteket 37°C -os inkubátorban 5 V/V% CO_2 és 95% relatív páratartalom mellett 30, 60 és 90 percreg inkubáltuk. A mintákat Amnis FlowSight készülékkel és a mellékelt IDEAS kiértékelő szoftverrel elemeztük. Megállapítottuk, hogy a 90 perces inkubációs idő alatt a fagocitáló makrofágok száma nem növekedett szignifikánsan a 60 perces inkubációhoz képest, így a peptid-kezelések során, a fertőzés után csak 30 és 60 perces inkubáció után vizsgáltuk a mintákban a fagocitózis hatékonyságát.

A fagocitózis kinetikáját J774.2 egér makrofág sejtek és Alexa Fluor 488 fluoreszcens festéssel jelölt *Cr. neoformans* sejtek kölcsönhatásában vizsgáltuk. A makrofágokat ötszörös mennyiségű élesztő sejtrel fertőztük, melyeket a festés előtt $3,12 \mu\text{M}$ AMP1 vagy $3,12 \mu\text{M}$ AMP2b vagy $12,5 \mu\text{M}$ NCR169C₁₇₋₃₈ peptiddel kezeltük. A kezeléshez választott peptidek alacsony MIC értékkel rendelkeztek a *Cr. neoformans*

ellen és háromórás kezelés során nem gátolták a makrofág sejtek életképességét. Kontrollként a J774.2 makrofág sejtek Alexa Fluor 488 festékekkel festett *Cr. neoformans* sejtek fagocitáló képességét vettük. Az áramlási citometriás méréseket a fertőzés különböző időpontjaiban (30 perc, 60 perc) végeztük, mely során a fluoreszcens jelet adó makrofágokat tekintettük a fagocitáló makrofágoknak. A fagocitáló képesség százalékos értékét a teljes makrofág populáció számához viszonyítottuk, míg a sejtek fluoreszcencia intenzitását az egész populációra vonatkoztatva adtuk meg.

Megállapítottuk, hogy a J774.2 makrofágok már a fertőzést követő 30. percben megkezdték a sejtek felvételét, ekkor a kontroll mintában a sejtek 5,12%-a bizonyult fagocitáló makrofágnak (**7.A ábra**). Az AMP1-kezelt mintában a makrofágok 7,95%, az AMP2b-kezelt mintában 14,2%, míg az NCR169C₁₇₋₃₈-kezelt mintában 20,6% volt fagocitáló makrofág a fertőzést követő 30. percben. A 60. percre a fagocitáló képesség az AMP1-kezelt mintában 33,95%, az AMP2b-kezelt mintában 17,25%, az NCR169C₁₇₋₃₈-kezelt mintában pedig 42,3%-ra emelkedett. A kontrollban detektált 6,95% fagocitáló képességgel összehasonlítva mindhárom mintában szignifikánsan emelkedett a fagocitáló makrofágok aránya (**7.A ábra**). A fagocitózis hatékonyságát a sejtek fluoreszcencia intenzitásának mérésével is igazoltuk. Az NCR169C₁₇₋₃₈ peptiddel kezelt sejtek esetében mértük a legmagasabb intenzitást, mind a 30, mind a 60 perces fertőzést követően. Ez összhangban van a fagocitáló makrofágok arányával, mert e peptiddel történt kezelést követően detektáltuk a legmagasabb értéket a fertőzést követő mindkét időpontban (**7.B ábra**).

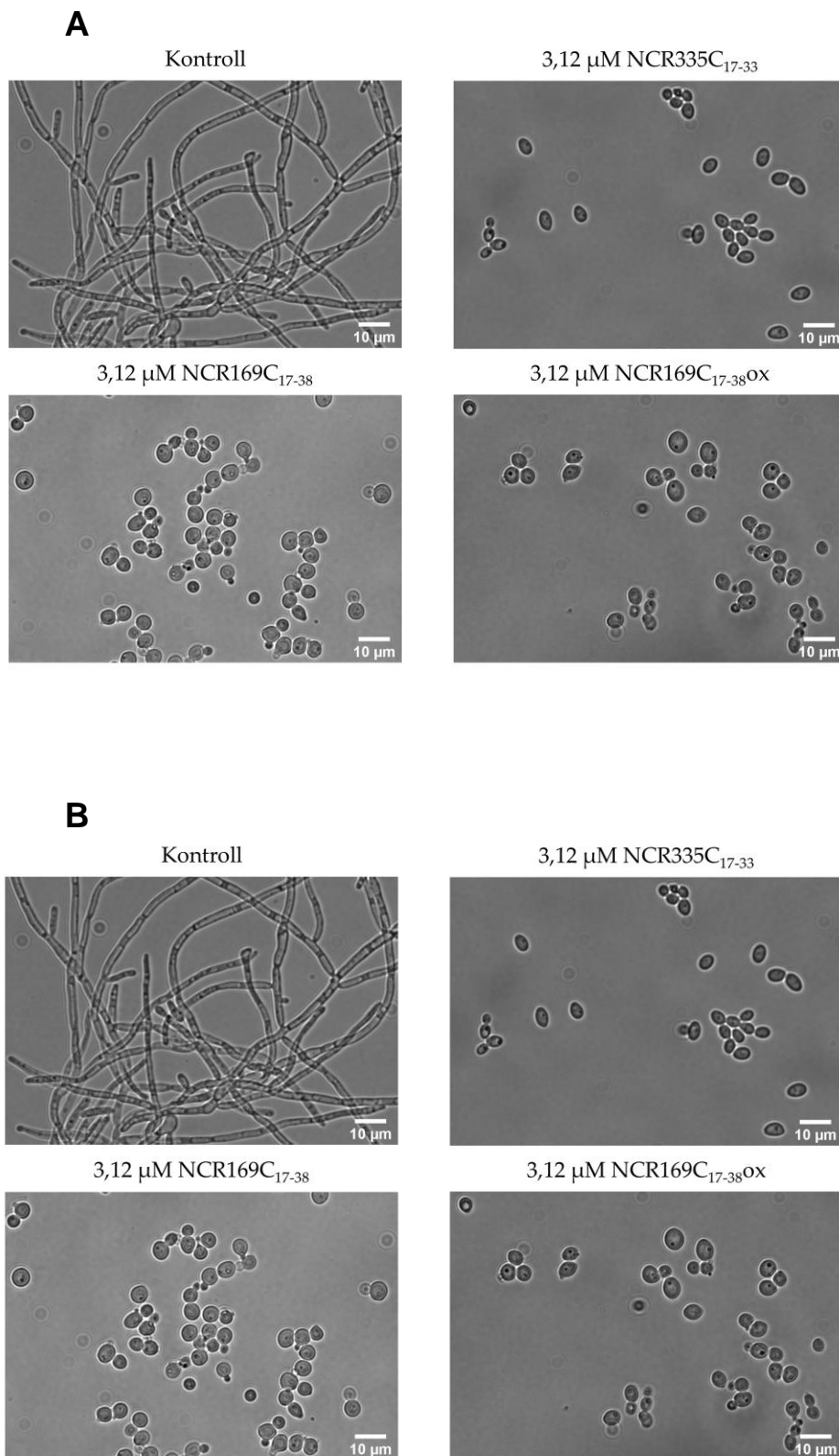


7. ábra: Az AMP1, AMP2b és a NCR169C₁₇₋₃₈ peptidek hatása a J774.2 makrofágok *Cr. neoformans* sejteket fagocitáló képességére

A: a fagocitáló makrofágok száma a mintában, B: a makrofág sejtek fluoreszcencia intenzitása.
 (*: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$, ***: $p \leq 0,001$, ****: $p \leq 0,0001$, független mintás t-próba)

6.8. Az NCR335C₁₇₋₃₃ és NCR169C₁₇₋₃₈ peptidek gátolják a hifaforma képződését

A *Candida* fajokra jellemző az úgynevezett dimorfizmus, vagyis kétalakúság. A fenotípusváltás képessége a sarjadzó élesztő sejt és a fonalasan növény forma közt fontos virulenciafaktor, ezért megvizsgáltuk, hogy a széles hatásspektrummal rendelkező peptidek, az NCR335C₁₇₋₃₃, az NCR169C₁₇₋₃₈ és az NCR169C_{17-38ox} szubletális koncentrációban hogyan befolyásolják a *C. albicans* ATCC 10231 és a *C. tropicalis* sejtek morfológiáját. A fénymikroszkópos képek alapján elmondható, hogy a *C. albicans* esetében a kontroll mintában sok hosszú hifa látható, míg a peptidekkel 3,12 μM koncentrációban történő kezelés teljes mértékben gátolja a hifaképződést, mert a mintákban csak élesztő formák láthatóak (**8.A ábra**). A *C. tropicalis* kontroll mintában többnyire hifa forma volt megfigyelhető, míg az NCR335C₁₇₋₃₃ és NCR169C₁₇₋₃₈ peptiddel 1,56 μM koncentrációban történő kezelés hatására nagyobb arányban láthattunk élesztő sejteket. Az NCR169C_{17-38ox} kezelés csak élesztő sejteket eredményezett és a sejtek száma is jelentősen csökkent (**8.B ábra**).

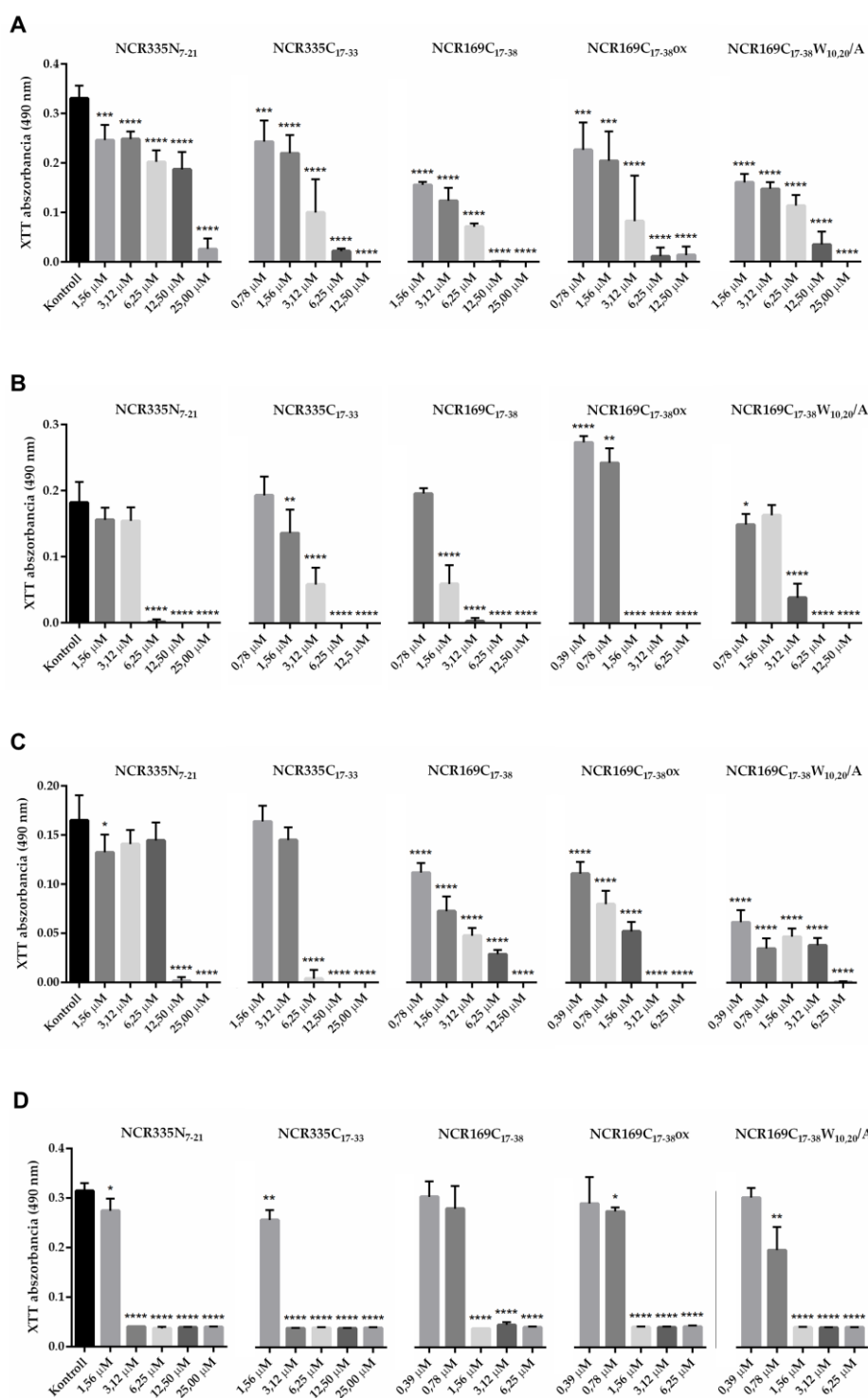


8. ábra: NCR335C₁₇₋₃₃-, NCR169C₁₇₋₃₈- vagy NCR169C₁₇₋₃₈Ox-kezelt *C. albicans* ATCC 10231 (A) és *C. tropicalis* CBS 94 (B) sejtek fénymikroszkópos képe.

6.9. A peptidek hatása *C. albicans* és *C. tropicalis* biofilm képződésére

Az NCR335N₇₋₂₁, NCR335C₁₇₋₃₃, NCR169C₁₇₋₃₈, NCR169C_{17-38OX} és NCR169C₁₇₋₃₈W_{10,20/A} peptidek mindhárom *C. albicans* törzs, valamint a *C. tropicalis* növekedését is gátolták. Mivel mindkét faj képes biofilmet kialakítani vizsgáltuk, hogy ezek a peptidek gátolják-e a *C. albicans* ATCC 10231, *C. albicans* SC5314, *C. albicans* SZMC 1458 és a *C. tropicalis* CBS 94 törzsek biofilm képzését. Ezen kísérletek során az élesztőgomba tenyészeteket 72 órán keresztül tenyésztettük a peptidek jelenlétében. A peptideket különböző koncentráció tartományban alkalmaztuk, ezt a tartományt a minimális gátló koncentráció alapján jelöltük ki (**7. táblázat**). A biofilmbe ágyazott gombasejtek életképességét XTT redukciós vizsgálattal mértük. Mindegyik vizsgált peptid szignifikánsan ($p \leq 0,0001$) gátolta a biofilmek képződését a MIC értéknél vagy annál kisebb koncentrációban (**9. ábra**).

Az NCR335N₇₋₂₁ a *C. albicans* ATCC 10231 törzs biofilm képződését már 1,56 μM koncentrációban szignifikánsan gátolta ($p \leq 0,001$), azonban a másik két törzs ettől eltérő érzékenységet mutatott. Az SC5314 törzs esetében 6,25 μM koncentrációnál, az SZMC 1458 törzsnél pedig 12,5 μM koncentrációnál tapasztaltunk szignifikáns ($p \leq 0,0001$ mindkét törzsnél) biofilmképzés gátlást. Az NCR335C₁₇₋₃₃ az ATCC 10231 törzsnél már 0,78 μM ($p \leq 0,001$), az SC5314 törzsnél 1,56 μM ($p \leq 0,01$) míg az SZMC 1458 törzsnél 6,25 μM ($p \leq 0,0001$) koncentrációban gátolta szignifikánsan a biofilmek kialakulását. Az NCR169C₁₇₋₃₈, az ATCC 10231 és az SC5314 törzseknél már 1,56 μM , míg az SZMC 1458 törzsnél 0,78 μM ($p \leq 0,0001$ mindhárom esetben) koncentrációban mutatott szignifikáns gátló hatást a biofilm kialakulására. Az NCR169C_{17-38OX} az ATCC 10231 törzs esetében már 0,78 μM ($p \leq 0,001$), míg az SZMC 1458 és az SC5314 törzseknél 0,39 μM ($p \leq 0,0001$ mindkét esetben), az NCR169C₁₇₋₃₈W_{10,20/A} peptid pedig az ATCC 10231 törzsnél már 1,56 μM ($p \leq 0,0001$), az SC5314 törzsnél 3,12 μM ($p \leq 0,0001$) míg az SZMC 1458 törzsnél 0,39 μM ($p \leq 0,0001$) koncentrációban gátolta szignifikánsan a biofilm kialakulását. Mindhárom *C. albicans* törzsnél azt tapasztaltuk, hogy a peptidek az adott törzsre kapott MIC értéküknél teljes gátlást okoztak a biofilm kialakulásában. Ezzel szemben a *C. tropicalis* esetében mind az öt peptid szignifikáns ($p \leq 0,0001$) biofilm képződés gátlást okozott kis koncentrációban, az NCR335N₇₋₂₁ és az NCR335C₁₇₋₃₃ 3,12 μM , az NCR169C₁₇₋₃₈, NCR169C_{17-38OX} és az NCR169C₁₇₋₃₈W_{10,20/A} 1,56 μM koncentrációban, de a teljes gátlás nem következett be a peptidek koncentrációjának emelésével még a MIC értéknél sem (**9. ábra**).



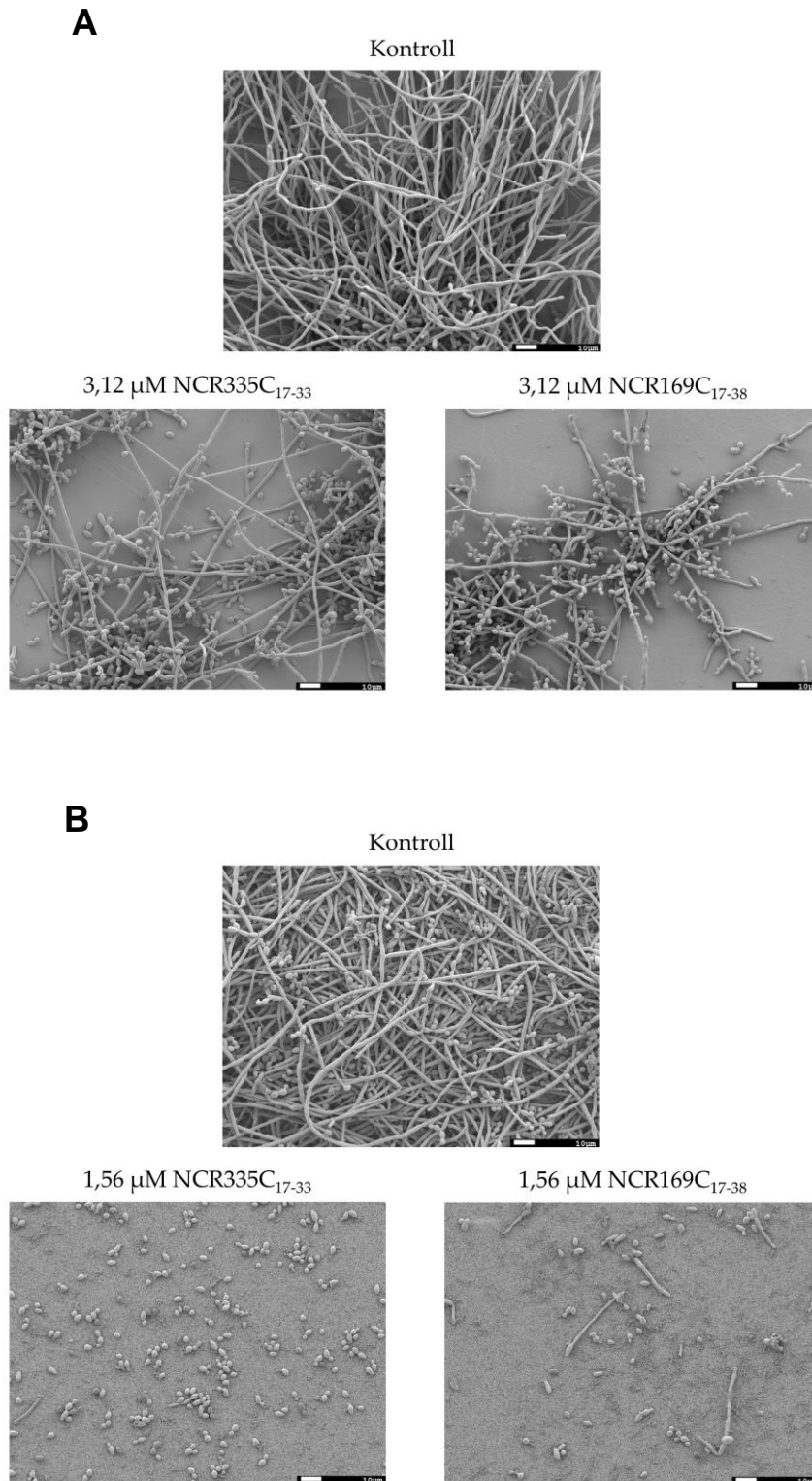
9. ábra: A peptidek hatása *C. albicans* és *C. tropicalis* törzsek biofilm képződésére.

C. albicans ATCC 10231 (A); *C. albicans* SC5314 (B); *C. albicans* SZMC 1458 (C) és *C. tropicalis* CBS 94 (D)

Az XTT abszorbancia értékek 3 független kísérlet átlagát reprezentálják, a szórás feltüntetésével (*: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$, ***: $p \leq 0,001$, ****: $p \leq 0,0001$, független mintás t-próba)

6.10. Az NCR335C₁₇₋₃₃ és NCR169C₁₇₋₃₈ peptidek gátolják a fonalas forma kialakulását a biofilmekben

A biofilmek komplex struktúrák, melyekben dominál az élesztőgombák fonalas formája, de e mellett egysejtes alak is előfordulhat. Ezért megvizsgáltuk, hogy a leghatékonyabb peptidek, az NCR335C₁₇₋₃₃ és az NCR169C₁₇₋₃₈ szubletális koncentrációban hogyan hatnak a *C. albicans* ATCC 10231 és a *C. tropicalis* CBS 94 sejtek morfológiájára a biofilmekben. Előző kísérleteinkben megállapítottuk, hogy mindkét peptid gátolja a biofilm-képződés mindkét faj esetében (**9. ábra**). A pásztázó elektronmikroszkópos képek alapján a peptidek jelenlétében kialakult biofilmek kevésbé komplex struktúrák, és kevesebb fonalas formát tartalmaznak, növekszik bennük az élesztősejtek aránya (**10. ábra**). A *C. tropicalis* nagyobb érzékenységet mutatott mindkét peptidre a *C. albicans*-hoz képest. Utóbbi esetében az NCR335C₁₇₋₃₃ peptidet 1,56 µM koncentrációban alkalmazva csak élesztőforma volt megfigyelhető a biofilmben, ugyanebben a koncentrációban az NCR169C₁₇₋₃₈ csökkentette a sejt számot, és a biofilmben ezen kezelés után is dominált az élesztőforma.

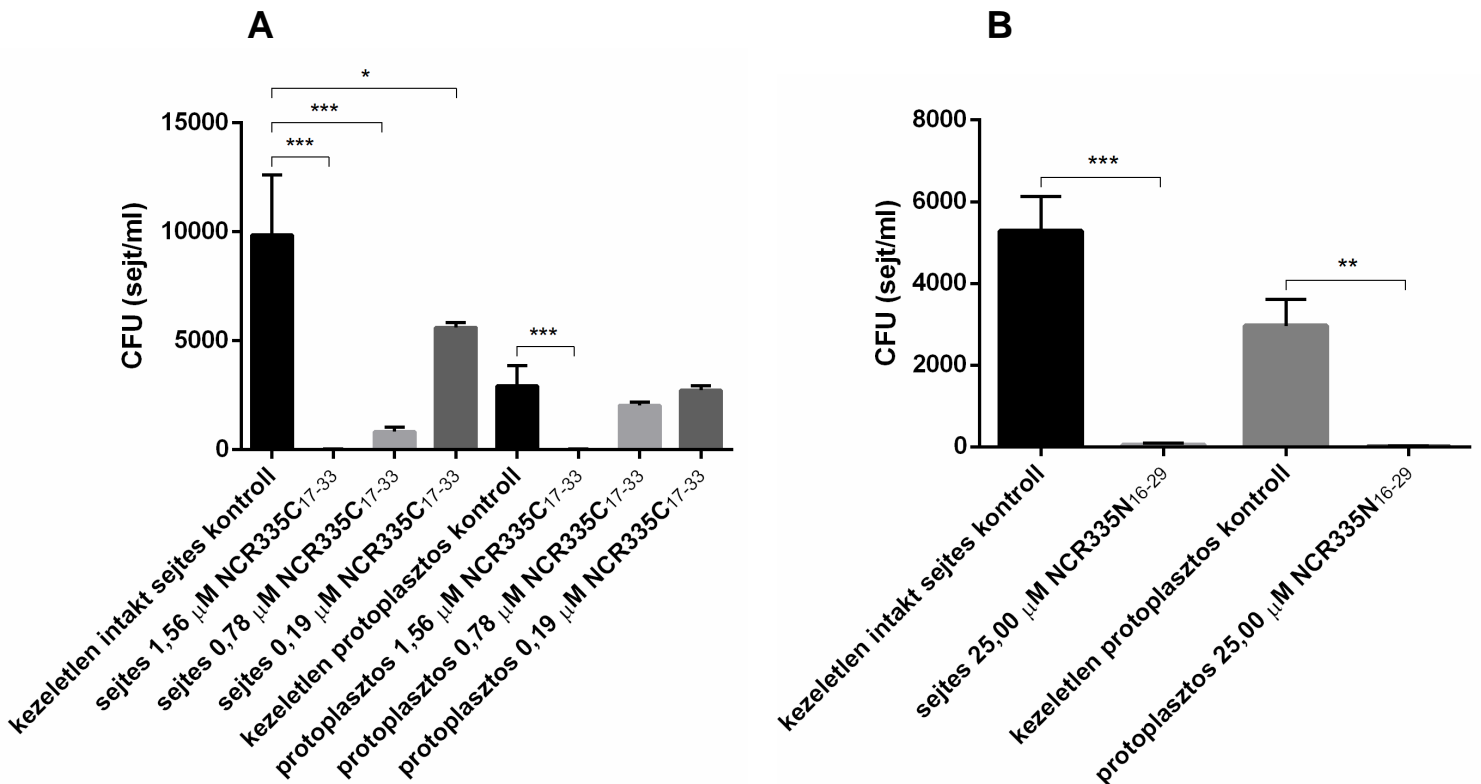


10. ábra: *C. albicans* ATCC 10231 (A) és *C. tropicalis* CBS 94 (B) sejtek morfológiája a kontroll és NCR peptidek jelenlétében kialakult biofilmekben

A törzseket NCR335C₁₇₋₃₃ vagy NCR169C₁₇₋₃₈ peptidek jelenlétében 72 órán át tenyésztettük AIM tápoldatban, majd a sejteket pásztázó elektronmikroszkóppal vizsgáltuk.

6.11. Peptidek hatása *Cr. neoformans* és *C. tropicalis* protoplasztokra

Kísérleteink során az NCR335C₁₇₋₃₃ és NCR335N₁₆₋₂₉ peptidek *Cr. neoformans* IFM 5844 intakt sejtekre és protoplasztokra gyakorolt hatását vizsgáltuk 15 perces kezelést követően. A peptidek hatását a telepképző egységek számának változásán keresztül mértük. Az NCR335C₁₇₋₃₃ peptid hatását több koncentrációban (1,56; 0,78 és 0,19 µM) teszteltük. Mind az intakt sejtek, mind a protoplasztok esetében azt tapasztaltuk, hogy 1,56 µM peptiddel történő kezelés során az élő csíraszám szignifikánsan csökkent ($p \leq 0,001$). Intakt sejtek esetében a 0,78 µM illetve 0,19 µM peptid-kezelés is szignifikáns élőcsíraszám csökkenést eredményezett ($p \leq 0,01$ és $p \leq 0,05$). Ugyanakkor a protoplasztok esetében sem a 0,78 µM, sem a 0,19 µM peptiddel történő kezelés hatására sem volt tapasztalható szignifikáns csökkenés a telepképző egységek számában (11. ábra). Az NCR335N₁₆₋₂₉ peptid, 25 µM-os koncentrációban alkalmazva, mind az intakt sejtek ($p \leq 0,001$), mind a protoplasztok ($p \leq 0,01$) esetében szignifikáns csökkenést eredményezett a telepképző egységek számában.



11. ábra: NCR335C₁₇₋₃₃ és NCR335N₁₆₋₂₉ peptidek hatása *Cr. neoformans* IFM 5844 intakt sejtek és protoplasztok telepképző egységeinek számára

A: különböző koncentrációjú NCR335C₁₇₋₃₃ peptiddel kezelt intakt sejtek és protoplasztok CFU értékei a kezeletlen kontroll mintához hasonlítva. **B:** 25 µM NCR335N₁₆₋₂₉ peptiddel kezelt intakt sejtek és protoplasztok CFU értékei a kezeletlen kontroll mintához hasonlítva.

(*: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$, ***: $p \leq 0,001$, független mintás t-próba)

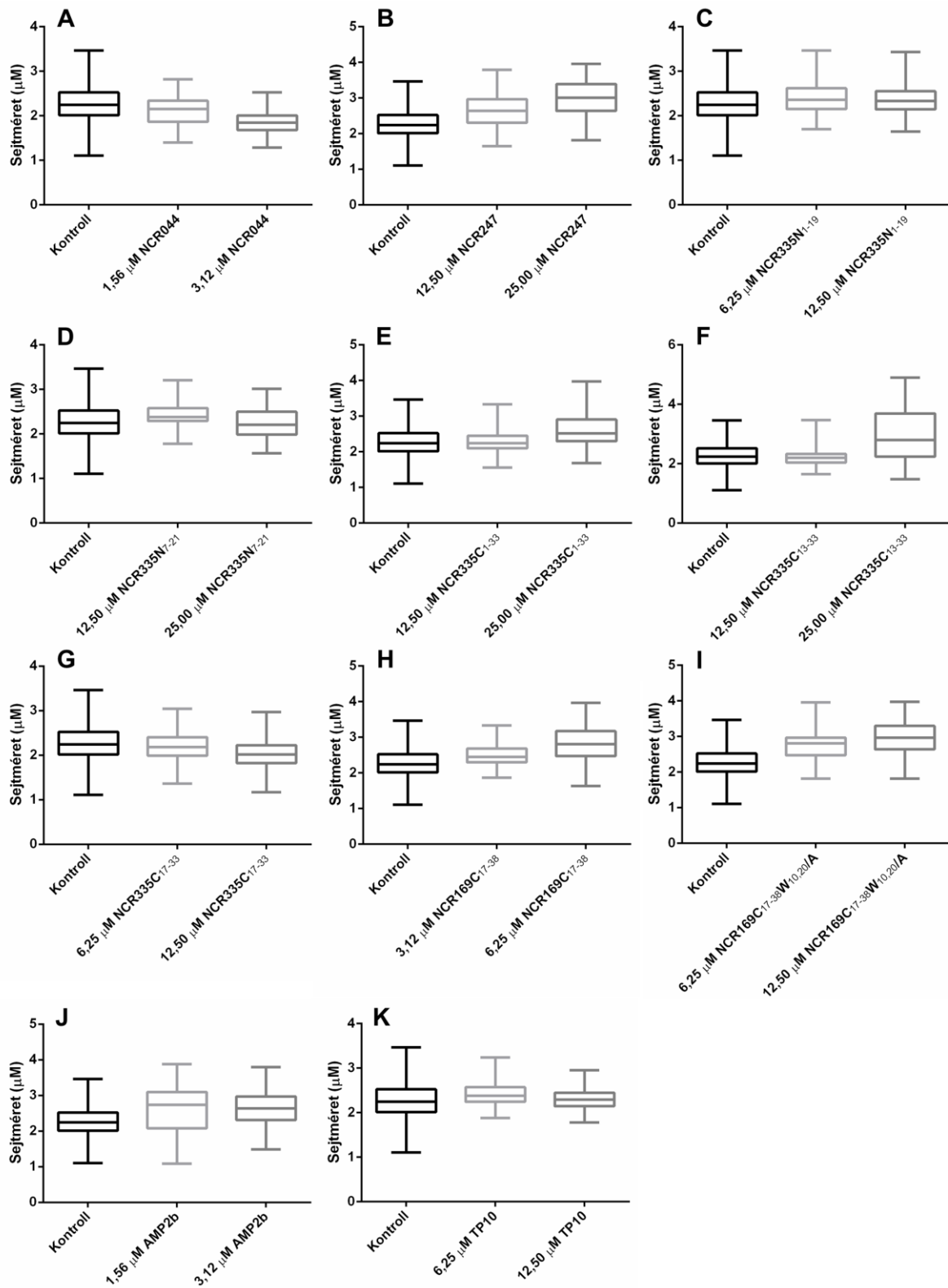
6.12. Peptidek *Cr. neoformans* sejtek méretére gyakorolt hatása

Tizenkét, *Cryptococcus*-ellenes aktivitással rendelkező peptid hatását vizsgáltuk a *Cr. neoformans* IFM 5844 sejtek méretére, két különböző koncentrációban. A Kruskal-Wallis teszt minden egyes peptidkezelés esetén szignifikáns különbséget mutatott a csoportok között ($p \leq 0,05$), egyetlen eset (NCR335N₁₋₁₉) volt marginálisan szignifikáns (**M1. táblázat**). A minták páronkénti összehasonlítása egy-egy peptidre vonatkozóan azt mutatta, hogy nincs szignifikáns különbség a kontroll és az alacsonyabb koncentrációjú NCR335C₁₋₃₃-kezelt minta esetében, azonban magasabb koncentrációjú peptid-kezelés szignifikáns különbséget eredményezett (**M1. táblázat**). A sejtek növekedése volt megfigyelhető a nagyobb koncentrációjú kezelés hatására (**12. ábra**).

Az NCR335C₁₃₋₃₃, és NCR335C₁₇₋₃₃ peptidek alacsonyabb koncentrációban marginálisan szignifikáns, míg magasabb koncentrációban szignifikáns különbséget okoztak a sejtek méretében a kontrollhoz viszonyítva. Azonban a két peptid hatására ellentétes változás következett be, míg az NCR335C₁₃₋₃₃ méretnövekedést, addig az NCR335C₁₇₋₃₃ csökkenést okozott.

Az AMP2b, NCR044, NCR247, NCR169C₁₇₋₃₈, és NCR169C₁₇₋₃₈W_{10,20/A} kezelések mindkét koncentrációban szignifikáns méretbeli különbséget eredményeztek a kontrollhoz képest. Az NCR044 esetében a sejtek méretének csökkenése volt megfigyelhető, addig a többi peptid esetében a sejtek mérete megnőtt a kezelés hatására.

Alacsony koncentrációban az NCR335N₁₋₁₉ és NCR335N₇₋₂₁ marginálisan szignifikáns, a TP10 pedig szignifikáns eltérést okozott, míg az e három peptiddel végzett nagyobb koncentrációjú kezelés után nem kaptunk szignifikáns különbséget a sejtek méretében a kontroll mintához képest. Ezen minták esetében csak a T10 peptid okozott sejtméret-növekedést kis koncentrációban alkalmazva (**12. ábra**).

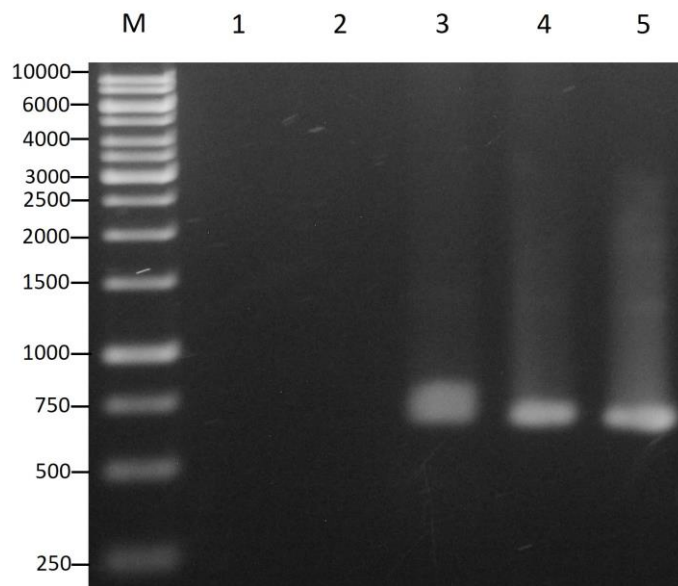


12. ábra: Peptidek *Cr. neoformans* IFM 5844 sejtek méretére gyakorolt hatása

A: NCR044, **B:** NCR247, **C:** NCR335N₁₋₁₉, **D:** NCR335N₇₋₂₁, **E:** NCR335C₁₋₃₃, **F:** NCR335C₁₃₋₃₃, **G:** NCR335C₁₇₋₃₃, **H:** NCR169C₁₇₋₃₈, **I:** NCR169C₁₇₋₃₈W_{10,20}/A, **J:** AMP2b, **K:** TP10

6.13. EMSA (Electrophoretic mobility shift assay)

Feltételeztük, hogy a peptidek pozitív töltésüknel fogva képesek a negatív töltésű DNS-hez kötődni, ezért a peptidek közül egy nagyméretű és nagy összpozitív töltéssel rendelkező peptid, az NCR044 DNS-hez való affinitását vizsgáltuk. Különböző koncentrációjú (2,5; 5; 7,5 és 10 μM) peptiddel kezeltünk egy 650 bp hosszú lineáris DNS-t, majd a kezelt és a peptiddel nem kezelt kontroll mintákat agaróz gélen futtattuk. Koncentráció függő eltolódást figyeltünk meg a DNS migrációjában a nagyobb mérettartomány irányában a 2,5 és 5 μM -os peptid-kezelés esetén, illetve a 7,5 és 10 μM -os peptid-kezelés esetén nem volt látható DNS fragmentum a gélen (**13. ábra**).

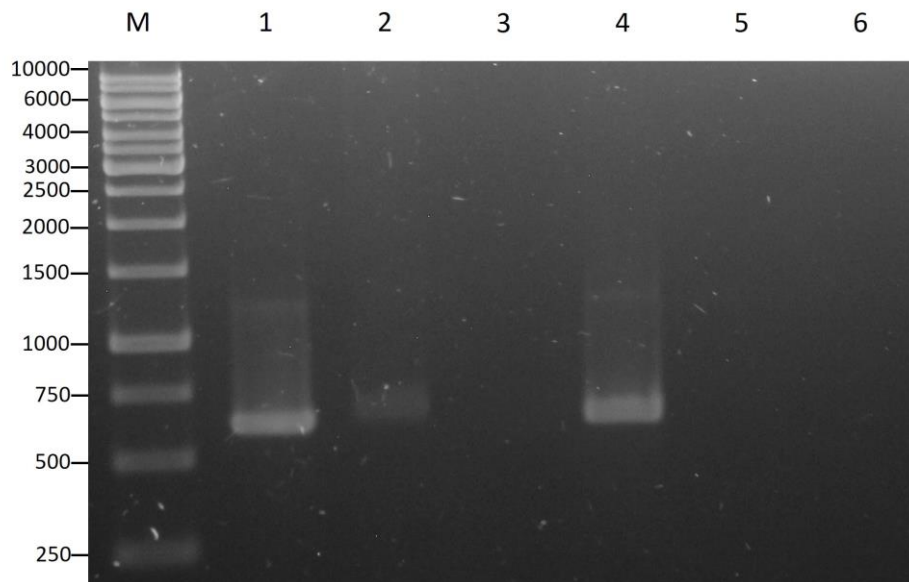


13. ábra: NCR044 kezelés utáni DNS mintázat

M: DNS molekulaszúly marker (Gene Ruler 1 kb DNA ladder); **1-4:** 10, 7,5, 5 és 2,5 μM NCR044 peptiddel kezelt minták; **5:** kezeletlen, kontroll DNS

Azt feltételezve, hogy a 7,5 és 10 μM -os peptid-kezelés esetén a DNS negatív töltését leárnyékolta a pozitív töltésű peptid, így a DNS mobilitási képességét a pozitív pólus irányába teljesen blokkolja, a DNS-t NCR044 peptiddel történő kezelését követően proteináz K, illetve DNáz kezelésnek vetettük alá. A proteináz K-val kezelt mintában a DNS fragmentum a kontroll mintával megegyező távolságra futott (**14. ábra**), ami igazolja azt, hogy a peptid-kezelt DNS pozitív pólus irányába történő migrációját a DNS-hez kötött peptidek akadályozták meg. A peptidek proteináz K kezeléssel történt eltávolításával a szabaddá vált DNS a töltését visszanyerve a méretének megfelelő mértékben visszanyerte a migrációs képességét is a pozitív pólus irányába. Hogy megerősítsük azt a feltételezést, hogy a magas koncentrációban adagolt peptidek

beborítják a DNS molekulát, a peptiddel kezelt DNS mintát DNáz kezelésnek, valamint DNáz majd proteináz K kezelésnek vetettük alá. Mivel az utóbbi esetben nem láttunk migrált DNS-t a gélben, elmondhatjuk, hogy a peptidek képezte „burkolóréteg” nem olyan mértékben zárt, hogy megvédje a DNS-t a DNáz enzimtől (**14. ábra**).



14. ábra: NCR044 peptiddel kezelt DNáz és proteináz K enzimekkel emésztett DNS elektroforetikus mintázata

M: DNS molekulásúly marker (Gene Ruler 1 kb DNA ladder); **1:** kezeletlen, kontroll DNS; **2:** 5 μM NCR044 peptiddel kezelt minta; **3:** 10 μM NCR044 peptiddel kezelt minta; **4:** 10 μM NCR044 peptiddel, majd proteináz K-val kezelt minta; **5:** 10 μM NCR044 peptiddel, majd DNáz-al kezelt minta; **6:** 10 μM NCR044 peptiddel, majd DNázal és proteináz K-val kezelt minta. Az ábra bal oldalán a DNS molekulásúly marker DNS fragmentumainak mérete van feltüntetve (bp).

6.14. Affinitás kromatográfiai vizsgálatok

Az NCR peptidekkel esetlegesen kölcsönható *Candida albicans* fehérjék azonosításához affinitás kromatográfiai vizsgálatokat végeztünk. Ennek során *C. albicans* összfehérje mintából Strep-tag-jelölt NCR peptiddel kölcsönható fehérjéket kerestünk „pull down”, majd SDS-PAGE és tömegspektrometriai analízis segítségével. A kísérletet háromszor végeztük el, minden alkalommal kétféle sejtfeltárási módszert alkalmazva. A mintákban nagyszámú riboszómális fehérjét sikerült azonosítani, de az eredmények nagyon szórtak a kísérletek során. Feltételezzük, hogy a pozitív töltésű peptid a töltése okán aspecifikusan a negatív töltésű fehérjéket kötötte ki a mintákból.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

A humán patogén gombák többsége opportunistá patogén, egészséges egyénekben nem vált ki kórfolyamatot. Az elmúlt évtizedekben jelentősen megemelkedett a gombák okozta megbetegedések száma azon betegek körében, akik esetében az immunrendszert érintő kórfolyamatok, illetve a betegség kezelése során alkalmazott terápia az immunrendszer gyengülésével jár. A gombaellenes szerek korlátozott száma, ezek hosszan tartó alkalmazása során fellépő káros mellékhatások, valamint a rezisztens törzsek növekvő száma miatt jelentős igény van új, hatékony gombaellenes szerek kifejlesztésére [176, 177]. Az antimikrobiális peptidek ígéretes jelöltek [178, 179] széles hatásspektrumuk, alacsony toxicitásuk [180], mérsékelt immunogenitásuk, jó penetrációs képességük, változatos hatásmechanizmusuk, valamint azon megfigyelés okán, hogy rezisztencia kisebb gyakorisággal alakul ki ellenük [181].

A növények sokféle antimikrobiális peptidet termelnek, melyek többsége a defenzinek csoportjába tartozik. A pillangósvirágú növényekben található egy géncsalád, mely több száz, a defenzinek csoportjába tartozó, gümő-specifikus ciszteinben gazdag peptidet kódol. Ezen NCR peptidek közül számos rendelkezik *in vitro* antibakteriális és/vagy antifungális hatással anélkül, hogy jelentős toxicitást mutatna humán sejtekre nézve [5, 163]. Az NCR-ek gyökérgümőkötől történő izolálása nehézkes a gümők kis mérete miatt, továbbá az egy gümőben termelődő hasonló méretű és fizikai-kémiai tulajdonságú peptidek nem teszik lehetővé egyedi peptidek izolálását. Így szintetikus úton történő előállításuk a legegyszerűbb mód arra, hogy tiszta formában kinyerjék őket, ami azonban a nagy peptidek esetében igen költséges lehet. Szakirodalmi adatok szerint az AMP-ek szintetikus analógjai jellemzően hatékonyabbak, mint a természetben előforduló peptidek, és nem rendelkeznek a természetes AMP-ekkel kapcsolatos stabilitási, toxicitási, aktivitási problémákkal [129].

Munkánk során 27 NCR peptid antifungális hatását és hatásmechanizmusát öt *Candida* faj és *Cr. neoformans* ellen vizsgáltuk. Eredményeink alapján az NCR335 peptid N- és C-terminális régiója, valamint az NCR169 C-terminális régiója egyaránt hatásosnak bizonyult a vizsgált fajokkal szemben. Az NCR335N mindegyik származéka magas pozitív töltésű (NCR335N₁₋₁₉, NCR335N₁₋₁₅ és NCR335N₇₋₂₁: +5 NCR335N₁₆₋₂₉: +4,1), de csak az NCR335N₇₋₂₁ mutatott széles spektrumú növekedésgátlást az összes vizsgált *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* és *Cryptococcus neoformans* törzs ellen. Ugyanakkor hatástalannak bizonyult a *C. auris* és a *C. parapsilosis* törzsekkel szemben.

Az NCR335N₁₋₁₉ csak a *C. albicans* ATCC 10231, a *C. parapsilosis* és a *Cr. neoformans* ellen volt hatásos, míg az NCR335N₁₋₁₅ és NCR335N₁₆₋₂₉ pozitív nettó töltésük ellenére nem mutattak *Candida*-ellenes aktivitást a vizsgált koncentráció tartományban, azonban az NCR335N₁₋₁₅ a *Cr. neoformans* növekedését gátolta. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a pozitív nettótöltés önmagában nem elegendő a gombaellenes aktivitáshoz. Érdekes módon a legszélesebb hatásspektrumot mutató NCR335N₇₋₂₁ peptid helikális szerkezetet mutat, és ebben eltér a többi NCR335N származéktól, ami azt jelezheti, hogy a spirális régió fontos lehet a gombaellenes aktivitás szempontjából [5].

Az NCR335 C-terminális származékai közül az NCR335C_{1-33/13-33/17-33/17-27} nettó töltése +6,8-6,9 volt. Az NCR335C₁₋₃₃ hatásos volt a *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* és *Cr. neoformans* ellen, miközben nem gátolta a *C. auris* és a *C. tropicalis* növekedését. Rövidebb származéka, az NCR335C₁₇₋₃₃ nagyobb aktivitást mutatott - a *C. auris* kivételével - valamennyi törzs ellen. Az NCR335C₁₃₋₃₃ hatásspektruma csökkent, csak a *C. albicans* SC5314 és a *Cr. neoformans* IFM 5844 bizonyult érzékenynek rá. Az NCR335C₁₇₋₃₃ szekvenciájának további rövidítése (NCR335C₁₇₋₂₇) az aktivitás elvesztését eredményezte, ami arra utal, hogy a C-terminális szekvencia (C₂₈₋₃₃) nélkülözhetetlen a gombaellenes aktivitáshoz. Az NCR335C₁₋₈, az NCR335C₁₋₁₆ és az NCR335C₉₋₁₆, melyek +0,1; +1; illetve +1,9 töltéssel rendelkeznek, inaktívak voltak mindegyik vizsgált törzssel szemben. Az NCR335C₁₋₃₃, NCR335C₁₇₋₂₇ és NCR335C₁₃₋₃₃ peptidok esetében a térszerkezet becslések egy α -hélix jelenlétét jósolták az N-terminális régióban az amúgy rendezetlen szerkezetben [5]. Ezzel szemben a legaktívabb NCR335C₁₇₋₃₃ peptid 3D szerkezetében hiányzik a helikális régió ugyanakkor két rövid antiparallel β -redő jelent meg [5].

Az NCR169 szekvencia C-terminális részét tartalmazó peptiddel végzett kísérletek eredménye megerősítette azt a feltételezésünket, hogy az NCR169C₁₇₋₃₈ valóban gombaellenes hatással bír. A *C. parapsilosis* kivételével a többi *Candida* fajjal és törzssel, valamint a *Cr. neoformans* IFM 5844 törzssel szemben hatásos volt. E peptid redukált lineáris és oxidált hajtú formái eltérő hatást mutattak, mivel utóbbi valamivel hatékonyabb volt a *C. albicans* törzsek ellen, és szignifikánsan hatékonyabb volt a *C. glabrata* ellen, míg a *Cr. neoformans* IFM 5844 törzssel szemben mindkét forma azonos aktivitást mutatott. A redukált lineáris és oxidált hajtú formák eltérő gombaellenes hatékonyságának okát csak feltételezni lehet, bár az NCR247 peptidről ismert, hogy redukált és oxidált formái befolyásolják a transzkripciót és transzlációt baktériumokban [182, 183]. Így az NCR169C₁₇₋₃₈ redukált lineáris és oxidált hajtú formáira adott

sejtválaszok is eltérőek lehetnek. A gombaellenes peptidekben található triptofánnak kritikus szerepe lehet az aktivitásban [184]. Az NCR169C₁₇₋₃₈W_{10,20}/A peptid esetében a triptofán alaninra történő cseréje a peptid 3D szerkezetére nem volt hatással, ugyanakkor a *C. auris* elleni aktivitását elvesztette, ami azt jelzi, hogy a triptofán nélkülözhetetlen az NCR169C₁₇₋₃₈ peptid *C. auris* ellenes hatásában, míg a többi vizsgált *Candida* faj esetében nem.

Összefoglalva, a vizsgált 27 peptid közül 19 mutatott gomba-ellenes aktivitást. A 12 aminosavnál rövidebb és +5 töltés alatti peptidek esetében nem tudtunk antifungális hatást kimutatni.

A kationos NCR peptidek koncentráció-függő módon membrán permeabilizációt válthatnak ki [170]. A vizsgálatainkba bevont peptidek membrán permeabilizációra gyakorolt hatását *Cr. neoformans* sejteken vizsgáltuk. Eredményeink alapján a calcein-AM-mel kezelt *Cr. neoformans* sejteket NCR peptidekkel együtt inkubálva csökkent a fluoreszcens sejtek száma, illetve a sejtek fluoreszcencia intenzitása is. Ép sejtekből a fluoreszcens calcein csak efflux pumpák segítségével képes kijutni a sejtekből. Mivel ezek működését kísérleteink során indometacinnal gátoltuk, a megfigyelt nagymértékű calcein kiáramlás a sejtekből a sejtmembrán peptidek-okozta permeabilitás növekedésével magyarázható.

Az NCR peptideknek ugyanakkor mind baktériumokban, mind gombákban intracelluláris célpontjaik is lehetnek [163]. Szakirodalmi adatok alapján az NCR335, az NCR247 és az NCR192 a *C. albicans* sejtek membrán permeabilizációját okozzák, de szubletális koncentrációk esetén az NCR247 mind a gomba membránjában, mind a citoszolban kimutatható [170]. Megállapították továbbá, hogy az NCR044 a gombasejtfalhoz és membrán foszfolipidekhez kötődik, majd a membránon átjutva felhalmozódik a citoplazmában és a nukleáris régióban lokalizálódik [171]. Így nagy valószínűséggel a *Candida*-ellenes NCR-ek több különböző mechanizmuson keresztül fejtik ki hatásukat. Baktériumokban például az NCR-ek különböző sejtfunkciókat befolyásolnak, és percekben belül a baktériumok halálát idézik elő [163]. Az általunk vizsgált aktív peptid származékok ugyancsak cidikus hatásúnak bizonyultak, a *Candida* és *Cryptococcus* sejtek pusztulását okozták.

A *Candida* fajokra jellemző az úgynevezett dimorfizmus, vagyis kétalakúság, ami fontos virulenciafaktor, és szerepet játszik a *C. albicans* és a *C. tropicalis* patogenezisében [185]. A széles hatásspektrummal rendelkező NCR335C₁₇₋₃₃, NCR169C₁₇₋₃₈ és az NCR169C₁₇₋₃₈OX peptidek szubletális koncentrációban gátolták a

dimorf *C. albicans* és *C. tropicalis* fajok hifaképződését. Mindkét faj képes biofilm képzésre is, ami szintén fontos virulenciafaktor. A biofilmekben elhelyezkedő extracelluláris mátrixszal körbevett sejtek sokkal ellenállóbbak az antimikrobiális szerekkel szemben, mint a planktonikus sejtek [5]. Kimutattuk, hogy az összes aktív peptid gátolta a *C. albicans* és *C. tropicalis* biofilm képződését a MIC értéknél, vagy az alatt, $\frac{1}{2}$ MIC és $\frac{1}{4}$ MIC értéknél.

A fent említett NCR peptideken kívül az AMP1, AMP2 és AMP2b peptidek mindegyike *Cryptococcus*-ellenes aktivitást mutatott, és ezen peptidek esetében mértük a legalacsonyabb MIC értékeket. YNB tápoldatban ezen peptidek hatékonyabbnak bizonyultak, mint a cryptococcosis kezelése során alkalmazott flukonazol és amfotericin B. A peptidek minimális gátló koncentrációja X-VIVO tápoldatban magasabb volt, mint YNB-ben, de az AMP2b *Cryptococcus*-ellenes aktivitása még ebben a tápoldatban is alacsonyabbnak bizonyult a flukonazol minimális gátló koncentrációjánál.

A gombaellenes peptidek egymással, vagy más gombaellenes szerekkel történő kombinált alkalmazása előnyös lehet, mert a gombaellenes szerek és a peptidek MIC értékének jelentős csökkenését eredményezheti. Egy közelmúltban végzett tanulmányban két, egy skorpió faj (*Tityus obscurus*) méregmirigyéből származó gombaellenes peptid, a ToAP2 és az NDBP-5.7 együttes hatása, valamint flukonazzal vagy amfotericin B-vel történő együttes alkalmazása *C. albicans* ellen akár negyedrésszére csökkentette a MIC értékeket, összehasonlítva a vegyületek önmagukban történő alkalmazása során mért értékekkel [186]. Munkánk során vizsgáltuk az NCR169C₁₇₋₃₈, NCR169C_{17-38OX} és NCR335C₁₇₋₃₃ peptidek egymással és flukonazzal történő kölcsönhatását *C. auris* ellen. Szinergizmust három kombináció esetében figyeltünk meg, az NCR169C₁₇₋₃₈ és az NCR169C_{17-38OX} között, ahol a minimális gátló koncentráció feléről nyolcadára csökkent. Szinergizmust mutattunk ki a flukonazol és az NCR169C_{17-38OX} között, mely a MIC-t negyedére vagy nyolcadára csökkentette, illetve az NCR169C₁₇₋₃₈ és az NCR335C₁₇₋₃₃ között, mely a MIC-et negyedére csökkentette. Ez utóbbi kölcsönhatás különösen érdekes, mivel az NCR335C₁₇₋₃₃ peptid önmagában nem mutatott aktivitást *C. auris* ellen. A flukonazol és az NCR169C₁₇₋₃₈ kombinációjának vizsgálata során additivitás volt megfigyelhető, míg antagonista kölcsönhatást egyik esetben sem tapasztaltunk.

Szakirodalmi adatok alapján a *Medicago truncatula* által termelt NCR peptidek nem, vagy csak kismértékben bizonyultak toxikusnak humán sejtekre [5]. Az általunk vizsgált NCR peptidek alacsony koncentrációban nem mutattak jelentős citotoxicitást,

azonban 25 μ M koncentrációjú peptid-kezelés során a humán keratinocita sejtek életképességének csökkenése volt megfigyelhető. Ez alól kivételt képzett az NCR169C₁₇₋₃₈W_{10,20}/A peptid, mely az alkalmazott legnagyobb koncentrációban sem befolyásolta a sejtek életképességét. Azonban az egér makrofág sejtekre nézve a TP10, NCR247 és NCR335C₁₇₋₃₃ peptidek citotoxikusnak bizonyultak.

Vizsgáltuk az AMP1; AMP2b és NCR169C₁₇₋₃₈ peptidekkel kezelt *Cr. neoformans* sejtekkel fertőzött J774.2 egér makrofág sejtek fagocitáló képességét. Megállapítottuk, hogy a J774.2 makrofágok már a fertőzést követő 30. percben megkezdték az élesztősejtek felvételét, és a fertőzést követő 60. percben a kontroll mintában detektált fagocitáló képességhez viszonyítva mindhárom mintában szignifikánsan emelkedett a fagocitáló makrofágok aránya. Az NCR169C₁₇₋₃₈ peptiddel kezelt sejtek esetében mértük a legmagasabb fluoreszcencia intenzitást, mind a 30, mind a 60 perces fertőzést követően, mely összhangban volt a fagocitáló makrofágok számával. Ezen eredmények azt mutatják, hogy a peptiddel történő kezelés hatására a *Cr. neoformans* sejtek érzékenyebbé váltak a fagocitózásra, mint a kezeletlen sejtek.

A vizsgált peptidek eltérő hatást gyakoroltak a *Cr. neoformans* sejtek méretére. Az NCR044 és NCR335C₁₇₋₃₃ peptidek esetében a sejtek méretének csökkenése volt megfigyelhető, míg az NCR247, NCR335C₁₋₃₃, NCR335C₁₃₋₃₃, NCR169C₁₇₋₃₈, NCR169C₁₇₋₃₈W_{10,20}/A és AMP2b peptidekkel végzett kezelés után szignifikáns sejtméret növekedést tapasztaltunk. Az NCR335C₁₃₋₃₃ peptid váltotta ki a legnagyobb méretbeli növekedést a kontrollhoz viszonyítva, 25 μ M koncentrációban alkalmazva.

A peptidek sejtmembránra gyakorolt hatásának kimutatásához *Cr. neoformans* IFM 5844 intakt sejteket és protoplasztokat kezeltünk NCR335C₁₇₋₃₃ és NCR335N₁₆₋₂₉ peptidekkel. Eredményeink szerint az intakt sejtekre szignifikánsan nagyobb hatást gyakoroltak a peptidek, mint a sejtfaluktól megfosztott sejtekre. Feltételezzük, hogy a sejtfalnak, illetve a *Cr. neoformans* sejteket körülvevő tokanyagnak szerepe lehet a peptidek sejtfelszínhez való kötődésében. A megkötődött peptidmolekulák a mosási lépés után is kitapadva maradnak a sejtfelszínhez és átjutva a sejtfalon nagyobb koncentrációban jutnak el a sejtmembránhoz, és lépnek be a citoplazmába. A peptidek sejten belüli lokalizációját konfokális mikroszkóp segítségével vizsgáltuk FITC-jelölt NCR335 peptiddel. Megállapítottuk, hogy ez a peptid bekerül a citoplazmába, ahol nem tudtuk jelenlétét specifikusan kötni egyik sejt szervecskéhez sem.

NCR044 peptiddel történt kezeléssel vizsgáltuk a peptidek DNS-hez való affinitását. A DNS mintát a peptiddel kezelve 10 μ M koncentrációban, nem kaptunk jelet

a gélen, míg az 5 μM peptiddel kezelt mintában egy szélesebb, elmosódó sáv volt látható. Ezen eredmények arra utaltak, hogy 10 μM NCR044 peptiddel történt inkubáció során a pozitív töltésű peptidek semlegesítették a DNS negatív töltését emiatt nem kaptunk jelet a gélen. A koncentráció csökkenésével kevesebb peptid kötődött a DNS fragmentumokhoz így a negatív töltés megmaradt, ugyanakkor a gélen lassabban migrált a hozzá kötődött peptidek miatt. Ezt a feltételezésünket alátámasztotta az az eredmény, amit a 10 μM NCR044 peptiddel történt kezelés utáni proteináz K emésztés után kaptunk; a peptidek enzimatiszta eltávolítása után a DNS fragmentum a kontroll mintával megegyező távolságra migrált a gélen. Ugyanakkor a peptiddel és DNÁzzal kezelt mintákban azt tapasztaltuk, hogy a peptidek kötődése a DNS fragmentumhoz nem biztosít olyan szoros „burkot” a DNS körül, ami megvédené a DNáz kezelés hatásától.

Eredményeink azt bizonyítják, hogy az általunk vizsgált peptidek többsége széles spektrumú gombaellenes hatással rendelkezik. Gátolják az élesztő-hifa átalakulást, továbbá a biofilm képződését. Gombaellenes szereklle való szinergikus kölcsönhatásaik és humán sejtekre gyakorolt alacsony toxicitásuk miatt ígéretes terápiás gyógyszerjelöltek lehetnek patogén élesztőgombák ellen. Hatásmechanizmusuk pontos feltárása további kísérleteket igényel, azonban eredményeink alapján pozitív töltésük miatt képesek a negatív töltésű makromolekulákhoz, így a nukleinsavakhoz való kötődésre, ilyen módon feltételezhetően sokrétű hatást gyakorolhatnak a sejt működésére.

8. SUMMARY

The majority of human pathogenic fungi are opportunistic pathogens and do not induce disease process in healthy individuals. In recent decades, there has been a significant increase in the morbidity of fungal diseases in immunocompromised patients. Due to the limited number of antifungal drugs and the harmful side effects associated with their long-term use, as well as the emergence of resistant strains, there is an urgent need for the development of new, effective antifungal drugs preferably with new mode of action [176, 177]. Antimicrobial peptides are promising candidates [178, 179] due to their broad activity spectrum, low toxicity [180], moderate immunogenicity, good penetration ability, low tendency to develop resistance, and diverse mechanisms of action [181].

Plants produce a wide variety of antimicrobial peptides, most of which belong to the group of defensins. A gene family in *Fabaceae* plants encodes hundreds of nodule-specific cysteine-rich peptides, belonging to the group of defensins. Many of these NCR peptides have *in vitro* antibacterial and/or antifungal activity without showing toxicity to human cells [5, 163]. Isolation of NCRs from root nodules is difficult because of the small size of the nodules and the high number of NCR peptides produced in a single nodule with similar size and physicochemical properties. Thus, the synthetic approach is the simplest way to obtain them in pure form, which can be very expensive for large peptides. Recent findings have shown that synthetic analogues of AMPs overcome the stability, toxicity, activity limitations associated with natural AMPs and are typically more efficient than naturally occurring peptides [129].

In this study, the antifungal effect, and mechanism of action of 27 NCR peptides against five *Candida* species and *Cryptococcus neoformans* were investigated. We demonstrated the anti-candidal and anti-cryptococcal activity of both the N- and C-terminal regions of NCR335 as well as the C-terminal region of NCR169. All the NCR335N derivatives had high positive charge (NCR335N₁₋₁₉, NCR335N₁₋₁₅ and NCR335N₇₋₂₁: +5 NCR335N₁₆₋₂₉: +4.1) but only NCR335N₇₋₂₁ exhibited a broad activity spectrum, inhibiting the growth of all tested strains of *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* and *Cr. neoformans*. However, it was ineffective against *C. auris* and *C. parapsilosis*. NCR335N₁₋₁₉ proved active against *C. albicans* ATCC 10231, *C. parapsilosis* and *Cr. neoformans* while NCR335N₁₋₁₅ and NCR335N₁₆₋₂₉, despite their '+' net charge, had no anti-candidal activity in the tested concentration range, however, NCR335N₁₋₁₅ was effective against *Cr. neoformans*. These results indicate that the '+'

net charge itself is not sufficient for the antifungal activity. Interestingly, the NCR335N₇₋₂₁ peptide with the broadest activity spectrum has a helical structure and differs from other NCR335N derivatives in this respect, which may indicate that the helical region may be important for antifungal activity [166].

The derivatives of C-terminal fragments of NCR335, NCR335C_{1-33/13-33/17-33/17-27} had +6.8-6.9 net charge. NCR335C₁₋₃₃ was effective against *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* and *Cr. neoformans* while it did not affect the growth of *C. auris* and *C. tropicalis*. Its shorter derivative, NCR335C₁₇₋₃₃ was even more active against all strains except *C. auris*. The activity spectrum of NCR335C₁₃₋₃₃ was reduced; it was effective only against *C. albicans* SC5314 and *Cr. neoformans* IFM 5844. Truncating further the sequence of NCR335C₁₇₋₃₃ resulted in NCR335C₁₇₋₂₇. This derivative lost its activity suggesting that the C-terminal sequence is indispensable for the antifungal action. NCR335C₁₋₈, NCR335C₁₋₁₆ and NCR335C₉₋₁₆ having +0.1; +1 and +1.9 charge, respectively, were inactive against all the strains tested. The predicted folding of NCR335C₁₋₃₃, NCR335C₁₇₋₂₇ and NCR335C₁₃₋₃₃ sequences indicates a helical segment at the N-terminus in the otherwise disordered structure [5]. In contrast, the 3D structure of the most active NCR335C₁₇₋₃₃ peptide lacks helical region and two short anti-parallel β strands appear [5].

The C-terminal part of the otherwise weak cationic NCR169 peptide has strong cationic property therefore, its potential antifungal activity was presumed. Assessing the effectiveness of NCR169C derivatives against the yeast strains confirmed our prediction that NCR169C₁₇₋₃₈ is a potent antifungal. It was effective against all *Candida* and *Cryptococcus neoformans* strains except *C. parapsilosis*. The reduced linear and oxidized hairpin forms of this peptide showed different activity, the latter being slightly more effective against *C. albicans* strains and significantly more effective against *C. glabrata*, while both forms showed equal activity against *Cr. neoformans* IFM 5844. The reason of the altered activity of the reduced linear and hairpin oxidized forms can only be speculated, though it is known that the reduced and oxidized forms of NCR247 have different effect on the transcription and translation in bacteria [182, 183]. Thus, the cellular responses to the reduced linear and oxidized hair-pin forms of NCR169C₁₇₋₃₈ may be different. Tryptophan in antifungal peptides can play a critical role in activity [184]. Replacement of tryptophan for alanine in NCR169C₁₇₋₃₈W_{10,20}/A had no effect on the 3D structure of the peptide, but its activity was lost against *C. auris*, indicating that

tryptophan is essential for the activity of NCR169C₁₇₋₃₈ against *C. auris* but not for the other tested *Candida* species.

Cationic NCR peptides can provoke membrane permeabilization in a concentration dependent manner [170]. The impact of the peptide derivatives on the membrane permeabilization was tested on *Cr. neoformans* cells. The number of fluorescent cells, as well as the fluorescence intensity of the calcein-AM- and NCR-peptides-treated *Cr. neoformans* cells decreased in the population. Fluorescent calcein can only escape out of the viable cells by the function of efflux pumps. As the operation of the efflux pumps was inhibited with indomethacin during our experiments, the intensive calcein outflow can be explained by the increased, peptide-induced permeability of cell membrane.

Besides the above-mentioned effect, NCR peptides can have several intracellular targets both in bacteria or fungi [163]. Previous study demonstrated that NCR335, NCR247 and NCR192 provoke membrane permeabilization of *C. albicans* cells but NCR247 can be detected not only in the fungal membrane but in the cytosol as well applying in sub-lethal doses [170]. NCR044 was shown to bind to fungal cell wall and membrane phospholipids, and penetrating across the membrane it is accumulated in the cytoplasm and localized in the nuclear region [171]. Therefore, the anti-candidal NCRs exert their effects most likely through multifaceted mechanisms. For example in bacteria, NCRs influence various cellular functions and cause bacterial death within minutes [163]. The active NCR peptide derivatives used in this study proved cidic as they killed the *Candida* and *Cryptococcus* cells.

Some *Candida* species are characterized by dimorphism, the ability to change phenotype between the budding and the filamentous form, which is an important virulence factor as it is critical in the pathogenesis of *C. albicans* and *C. tropicalis* [185]. Treatment of the dimorphic *C. albicans* and *C. tropicalis* with NCR335C₁₇₋₃₃, NCR169C₁₇₋₃₈ and NCR169C_{17-38OX} having a broad activity spectrum resulted in the inhibition of filamentation. *C. albicans* and *C. tropicalis* are able to form biofilms that is an important virulence factor too. Sessile cells in the biofilms are much more resistant to antimicrobials than planktonic cells [5]. We demonstrated that all the active peptides inhibited biofilm formation of *C. albicans* and *C. tropicalis* either at the MIC or below, at $\frac{1}{2}$ MIC and $\frac{1}{4}$ MIC.

In addition to the above-mentioned NCR derivatives, AMP1, AMP2 and AMP2b peptides all showed anti-*Cryptococcus* activity, moreover, they possessed the lowest MIC values. These peptides were more active in YNB medium compared to amphotericin B

and fluconazole. Their minimal inhibitory concentration increased in X-VIVO medium, however, the MIC of AMP2b was still lower than that of fluconazole.

Combined application of antifungal peptides with each other or with other antifungal drugs can be beneficial because the possible reduction of the MIC values compared to their MICs in single use. In a recent study, combined action of two antifungal peptides, ToAP2 and NDBP-5.7, from venom glands of *Tityus obscurus* with each other and with fluconazole or amphotericin B against *C. albicans* resulted in 1/4 reduced MICs compared to the compounds in single use [186]. We assessed the interaction of NCR169C₁₇₋₃₈ with NCR169C_{17-38OX} or NCR335C₁₇₋₃₃, as well as the interaction of fluconazole with these peptides, respectively, against *C. auris*. Synergism was found in three combinations between NCR169C₁₇₋₃₈ and NCR169C_{17-38OX}, where the minimal inhibitory concentration was reduced by half to one-eighth respectively. Synergism was also found between fluconazole and NCR169C_{17-38OX}, which reduced the MIC by quarter or eighth, respectively, and between NCR169C₁₇₋₃₈ and NCR335C₁₇₋₃₃ which reduced the MIC by a quarter. This latter interaction is particularly interesting, since NCR335C₁₇₋₃₃ itself had no activity against *C. auris*. In the case of the combination of fluconazole and NCR169C₁₇₋₃₈ additive reaction was observed while no antagonistic interaction could be detected.

The NCR peptides coded by *Medicago truncatula* did not exert any or only minor toxicity to human cells [5]. The NCR peptides investigated in this study did not show significant cytotoxicity at low concentrations, however, slight decrease in viability of human keratinocytes was observed at a concentration of 25 µM. The only exception was the peptide NCR169C₁₇₋₃₈W_{10,20/A}, which did not reduce cell viability in the tested concentration range. However, TP10, NCR247 and NCR335C₁₇₋₃₃ peptides significantly reduced the viability of J774.2 cells even at lower concentration.

The phagocytic ability of J774.2 mouse macrophage cells infected with *Cr. neoformans* cells treated with AMP1, AMP2b and NCR169C₁₇₋₃₈ peptides was established. We found that the J774.2 macrophages started the phagocytosis of the yeast cells 30 minutes after the infection. The proportion of phagocytic macrophages increased significantly in all the three samples compared to the phagocytic ability of the control sample 60 minutes after the infection. The highest fluorescence intensity was measured in the cells treated with the NCR169C₁₇₋₃₈ peptide after both 30 and 60 minutes of infection which was consistent with the number of phagocytic macrophages. According

to these results, the yeast cells became more susceptible to phagocytosis as a consequence of the peptide-treatment compared to the untreated control cells.

The peptides had different effect on the size of the yeast cells. Decreased cell size was observed handling the cells with the NCR044 and NCR335C₁₇₋₃₃ peptides, while the size increased significantly along with the treatment by NCR247, NCR335C₁₋₃₃, NCR335C₁₃₋₃₃, NCR169C₁₇₋₃₈, NCR169C₁₇₋₃₈W_{10,20/A} and AMP2b peptides.

One possible mechanisms of action of antimicrobial peptides can be their effect on cell membrane permeability. To prove this hypothesis, we investigated the effect of NCR335C₁₇₋₃₃ and NCR335N₁₆₋₂₉ peptides on *Cr. neoformans* IFM 5844 intact cells and protoplasts. We could conclude that the peptides were significantly more effective on intact cells than on protoplasts. Presumably, the cell wall, and the capsid has a role in binding of the peptides to the cell surface. The peptides remained attached to the surface after the washing steps and penetrating across the cell wall can reach the cell membrane and the cytoplasm in high concentration. The intracellular localization of the peptides was examined by FITC-labelled NCR335 peptide using a confocal microscope. It was verified that peptide distributed homogenously in the cytoplasm of the cells and the accumulation of the dye could not be specifically connected to any cell organ.

We examined the affinity of the NCR044 peptide to DNA molecules. Treatment of the DNA samples with NCR044 peptide in 10 μ M concentration, no DNA band could be observed on the gel, while a broader band was visible in the sample treated with the peptide in 5 μ M concentration. These results suggested that during the treatment with 10 μ M NCR044 peptide the positively charged peptides bound to the DNA therefore the negative charge of the DNA was neutralized and no signal could be detected on the gel. Decreasing the peptide concentration, probably less peptides had bound to the DNA, so its negative charge was preserved, but the DNA migrated slowly in the gel depending on the amount of the peptides attached to it. Proteinase K digestion followed the 10 μ M NCR044 peptide-treatment resulted the DNA fragment at the same distance as the control sample. Therefore, the lack of signal after treatment is due to the binding of the peptides, since their digestion restore the size and the charge of the DNA fragment. At the same time, the binding of peptides to the DNA fragment does not provide such a tight "wrap" around the DNA that would protect it from the effect of DNase treatment.

Our work proved that the NCR peptide derivatives can be promising therapeutic drug candidates due to their beneficial properties, such as their broad-spectrum antifungal activity, inhibition of the phenotypic switch of dimorphic yeast, biofilm formation, their

synergistic interactions with antifungal agents, and their low toxicity to human cells. However, to reveal their exact mode of action, more experiments are needed. Our study suggests that peptides with positive charge are able to bind to the negatively charged macromolecules (nucleic acids or proteins) therefore, these peptides can exert a broad range of effect on different cellular processes.

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsősorban szeretnék köszönetet mondani **Prof. Dr. Vágvölgyi Csabának**, a Szegedi Tudományegyetem Természettudományi és Informatikai Kar Mikrobiológiai Tanszék vezetőjének, amiért lehetővé tette számomra, hogy PhD munkámat a tanszéken végezhessem.

Hálás köszönettel tartozom témavezetőmnek, **Dr. Pfeiffer Ilonának**, aki kitartó és fáradhatatlan munkájával és szakmai odafigyelésével és segítségével támogatott a munkám során és akihez minden körülmény között bizalommal fordulhattam, aki nélkül a dolgozat és publikációink nem jöhettek volna létre.

Köszönettel tartozom **Prof. Dr. Gácsér Attilának**, **Prof. Dr. Kondorosi Évának** és **Dr. Endre Gabriellának**, akik hasznos szakmai tanácsaikkal, ötleteikkel és segítségükkel hozzájárultak eredményes kísérleti munkámhoz. Továbbá köszönettel tartozom **Prof. Dr. Tóth Gábornak** és kutatócsoportjának, akik a peptidek szintézisét végezték, és **Jenei Sándornak**, aki a peptidek rendelkezésünkre bocsátásával járult hozzá kísérleteim létrejöttéhez.

Köszönet illeti **Dr. Tiricz Hildát**, aki az elkészített fehérjepreparátumokkal a „pull down” kísérleteket végezte, továbbá **Ayaydin Ferhant** és **Lima Rui Maria Dánielt**, akik a mikroszkópos kísérletek során nyújtott segítségükkel dolgozatom színvonalát növelték.

Köszönettel tartozom az SZBK Proteomikai Csoportjának, akik a fehérjék azonosítását végezték LC-MS/MS tömegspektrometriai analízissel.

Külön szeretném megköszönni **Dr. Papp Csaba Gergőnek** az áramlási citométeres kísérletekkel kapcsolatos segítségét, és hogy kérdéseimmel bármikor fordulhattam hozzá. Továbbá szeretném megköszönni **Takács Tamásnak** és **Novák Ádámnak**, hogy segítségükkel elsajátíthattam a humán sejtekkel való kísérletek fortélyait.

Szeretném megköszönni **Németh Nellinek** a kísérleteim elvégzéséhez nyújtott segítségét és a 302-es labor minden dolgozójának, **Dr. Hamari Zsuzsának**, **Dr. Ámon Juditnak** és **Varga Gabriellának**, akik támogatásukkal és bátorításukkal hozzájárultak munkám sikeréhez.

Külön szeretném megköszönni **Lele Máriának**, **Deákné Kulcsár Melindának**, **Vörös Mónikának** és **Bordé-Pavlicz Ádámnak** a segítségét és támogatását, mellyel nagyban hozzájárultak munkám előrehaladásához.

Köszönet illeti valamennyi kollaborációs partnerünket, **Dr. Csontné Dr. Kiricsi Mónikát, Dr. Rónavári Andreát, Dr. Igaz Nórát és Dr. Béteky Pétert**, akikkel a nanopartikulumok antimikrobiális hatásának vizsgálatával kapcsolatos témában dolgozunk együtt.

Köszönettel tartozom **Lengyel Boglárkának és Magyar Adriennek** a munkámmal kapcsolatos gazdasági ügyek intézéséért.

Szeretném köszönetemet és hálámat kifejezni **Családomnak és Barátaimnak**, akik támogatásukkal mindig segítettek tanulmányaimat és akiknek biztató szavai nagyban hozzájárultak dolgozatom elkészítéséhez.

Köszönettel tartozom a Mikrobiológiai Tanszék valamennyi volt és jelenlegi dolgozóinak, akik bármilyen módon hozzájárultak munkám sikeréhez.

És végül hálával tartozom házbírálóimnak, **Dr. Hamari Zsuzsának és Dr. Németh Tibornak**, akik elvállalták és szakmai észrevételeikkel segítettek disszertációm jobbá tételét.

10. IRODALOMJEGYZÉK

1. Szerencsés, B., et al., *Size-dependent activity of silver nanoparticles on the morphological switch and biofilm formation of opportunistic pathogenic yeasts*. BMC Microbiol, 2020. **20**(1): p. 176.
2. Szerencsés, B., et al., *Semi-Synthetic Ecdysteroid 6-Oxime Derivatives of 20-Hydroxyecdysone Possess Anti-Cryptococcal Activity*. Microbiology Research, 2022. **13**(4): p. 985-994.
3. Rónavári, A., et al., *Green Silver and Gold Nanoparticles: Biological Synthesis Approaches and Potentials for Biomedical Applications*. Molecules, 2021. **26**(4): p. 844.
4. Ronavari, A., et al., *Biosynthesized silver and gold nanoparticles are potent antimycotics against opportunistic pathogenic yeasts and dermatophytes*. Int J Nanomedicine, 2018. **13**: p. 695-703.
5. Szerencsés, B., et al., *Symbiotic NCR Peptide Fragments Affect the Viability, Morphology and Biofilm Formation of Candida Species*. Int J Mol Sci, 2021. **22**(7).
6. De Lucca, A.J., *Harmful fungi in both agriculture and medicine*. Rev Iberoam Micol, 2007. **24**(1): p. 3-13.
7. Denning, D.W. and M.J. Bromley, *Infectious Disease. How to bolster the antifungal pipeline*. Science, 2015. **347**(6229): p. 1414-6.
8. Brown, G.D., et al., *Hidden killers: human fungal infections*. Sci Transl Med, 2012. **4**(165): p. 165rv13.
9. Cassone, A., R.E. Mason, and D. Kerridge, *Lysis of growing yeast-form cells of Candida albicans by echinocandin: a cytological study*. Sabouraudia, 1981. **19**(2): p. 97-110.
10. Poulain, D., et al., *Ultrastructure of the cell wall of Candida albicans blastospores: study of its constitutive layers by the use of a cytochemical technique revealing polysaccharides*. Ann Microbiol (Paris), 1978. **129**(2): p. 141-53.
11. Sullivan, P.A., et al., *An analysis of the metabolism and cell wall composition of Candida albicans during germ-tube formation*. Can J Microbiol, 1983. **29**(11): p. 1514-25.
12. Surarit, R., P.K. Gopal, and M.G. Shepherd, *Evidence for a glycosidic linkage between chitin and glucan in the cell wall of Candida albicans*. J Gen Microbiol, 1988. **134**(6): p. 1723-30.
13. Parks, L.W. and W.M. Casey, *Physiological implications of sterol biosynthesis in yeast*. Annu Rev Microbiol, 1995. **49**: p. 95-116.
14. Cheng, J.T., et al., *Amphotericin B nephrotoxicity: increased renal resistance and tubule permeability*. Kidney Int, 1982. **22**(6): p. 626-33.
15. Gallis, H.A., R.H. Drew, and W.W. Pickard, *Amphotericin B: 30 years of clinical experience*. Rev Infect Dis, 1990. **12**(2): p. 308-29.
16. Lopez-Berestein, G., et al., *Treatment of hepatosplenic candidiasis with liposomal-amphotericin B*. J Clin Oncol, 1987. **5**(2): p. 310-7.
17. Wiebe, V.J. and M.W. DeGregorio, *Liposome-encapsulated amphotericin B: a promising new treatment for disseminated fungal infections*. Rev Infect Dis, 1988. **10**(6): p. 1097-101.
18. Juliano, R.L., et al., *Mechanism of the selective toxicity of amphotericin B incorporated into liposomes*. Mol Pharmacol, 1987. **31**(1): p. 1-11.
19. Payne, N.I., et al., *In-vivo studies of amphotericin B liposomes derived from proliposomes: effect of formulation on toxicity and tissue disposition of the drug in mice*. J Pharm Pharmacol, 1987. **39**(1): p. 24-8.
20. Martins, M.D. and J.H. Rex, *Resistance to antifungal agents in the critical care setting: problems and perspectives*. New Horiz, 1996. **4**(3): p. 338-44.

21. Hitchcock, C.A., et al., *Interaction of azole antifungal antibiotics with cytochrome P-450-dependent 14 alpha-sterol demethylase purified from Candida albicans*. *Biochem J*, 1990. **266**(2): p. 475-80.
22. Beggs, W.H., *Comparison of miconazole- and ketoconazole-induced release of K⁺ from Candida species*. *J Antimicrob Chemother*, 1983. **11**(4): p. 381-3.
23. Sheehan, D.J., C.A. Hitchcock, and C.M. Sibley, *Current and emerging azole antifungal agents*. *Clin Microbiol Rev*, 1999. **12**(1): p. 40-79.
24. Cowen, L.E., *The evolution of fungal drug resistance: modulating the trajectory from genotype to phenotype*. *Nat Rev Microbiol*, 2008. **6**(3): p. 187-98.
25. Mazu, T.K., et al., *The Mechanistic Targets of Antifungal Agents: An Overview*. *Mini Rev Med Chem*, 2016. **16**(7): p. 555-78.
26. Lanyi, J.K., W.Z. Plachy, and M. Kates, *Lipid interactions in membranes of extremely halophilic bacteria. II. Modification of the bilayer structure by squalene*. *Biochemistry*, 1974. **13**(24): p. 4914-20.
27. Ryder, N.S., G. Seidl, and P.F. Troke, *Effect of the antimycotic drug naftifine on growth of and sterol biosynthesis in Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1984. **25**(4): p. 483-7.
28. Ryder, N. and I. Leitner, *In vitro activity of terbinafine (Lamisil®): An update*. *Journal of Dermatological Treatment*, 2009. **9**: p. S23-S28.
29. Jessup, C.J., N.S. Ryder, and M.A. Ghannoum, *An evaluation of the in vitro activity of terbinafine*. *Med Mycol*, 2000. **38**(2): p. 155-9.
30. Morris, M.I. and M. Villmann, *Echinocandins in the management of invasive fungal infections, part 1*. *Am J Health Syst Pharm*, 2006. **63**(18): p. 1693-703.
31. Morris, M.I. and M. Villmann, *Echinocandins in the management of invasive fungal infections, Part 2*. *Am J Health Syst Pharm*, 2006. **63**(19): p. 1813-20.
32. Tkacz, J.S., *Glucan biosynthesis in fungi and its inhibition*, in *Emerging targets in antibacterial and antifungal chemotherapy*. 1992, Springer. p. 495-523.
33. Walsh, T.J., et al., *Antifungal effects of the nonlinear pharmacokinetics of cilofungin, a 1,3-beta-glucan synthetase inhibitor, during continuous and intermittent intravenous infusions in treatment of experimental disseminated candidiasis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1991. **35**(7): p. 1321-8.
34. Ghannoum, M.A. and L.B. Rice, *Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance*. *Clin Microbiol Rev*, 1999. **12**(4): p. 501-17.
35. Panda, D., et al., *Kinetic suppression of microtubule dynamic instability by griseofulvin: implications for its possible use in the treatment of cancer*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(28): p. 9878-83.
36. Kubec, K., *Griseofulvin in the treatment of dermatomycoses and onychomycoses produced by dermatophytes of the Trichophyton group*. *Mycopathol Mycol Appl*, 1968. **34**(1): p. 90-3.
37. Pfaller, M.A. and D.J. Diekema, *Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: concern for resistance beyond Candida albicans and Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol*, 2004. **42**(10): p. 4419-31.
38. Diekema, D., et al., *The changing epidemiology of healthcare-associated candidemia over three decades*. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2012. **73**(1): p. 45-8.
39. Pfaller, M.A., et al., *Bloodstream infections due to Candida species: SENTRY antimicrobial surveillance program in North America and Latin America, 1997-1998*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000. **44**(3): p. 747-51.
40. Hope, W., A. Morton, and D.P. Eisen, *Increase in prevalence of nosocomial non-Candida albicans candidaemia and the association of Candida krusei with fluconazole use*. *J Hosp Infect*, 2002. **50**(1): p. 56-65.

41. Pfaller, M.A., et al., *Candida guilliermondii*, an opportunistic fungal pathogen with decreased susceptibility to fluconazole: geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK antifungal surveillance program. *J Clin Microbiol*, 2006. **44**(10): p. 3551-6.
42. Alexander, B.D., et al., *Increasing echinocandin resistance in Candida glabrata: clinical failure correlates with presence of FKS mutations and elevated minimum inhibitory concentrations*. *Clin Infect Dis*, 2013. **56**(12): p. 1724-32.
43. Slavin, M., et al., *Invasive infections due to filamentous fungi other than Aspergillus: epidemiology and determinants of mortality*. *Clin Microbiol Infect*, 2015. **21**(5): p. 490 e1-10.
44. Snelders, E., et al., *Emergence of azole resistance in Aspergillus fumigatus and spread of a single resistance mechanism*. *PLoS Med*, 2008. **5**(11): p. e219.
45. Verweij, P.E., et al., *Azole resistance in Aspergillus fumigatus: a side-effect of environmental fungicide use?* *Lancet Infect Dis*, 2009. **9**(12): p. 789-95.
46. Ben-Ami, R., et al., *Multidrug-Resistant Candida haemulonii and C. auris, Tel Aviv, Israel*. *Emerg Infect Dis*, 2017. **23**(1): p. 195-203.
47. Calvo, B., et al., *First report of Candida auris in America: Clinical and microbiological aspects of 18 episodes of candidemia*. *J Infect*, 2016. **73**(4): p. 369-74.
48. Satoh, K., et al., *Candida auris sp. nov., a novel ascomycetous yeast isolated from the external ear canal of an inpatient in a Japanese hospital*. *Microbiol Immunol*, 2009. **53**(1): p. 41-4.
49. Lockhart, S.R., *Candida auris and multidrug resistance: Defining the new normal*. *Fungal Genet Biol*, 2019. **131**: p. 103243.
50. Chowdhary, A., et al., *A multicentre study of antifungal susceptibility patterns among 350 Candida auris isolates (2009-17) in India: role of the ERG11 and FKS1 genes in azole and echinocandin resistance*. *J Antimicrob Chemother*, 2018. **73**(4): p. 891-899.
51. Lockhart, S.R., et al., *Simultaneous Emergence of Multidrug-Resistant Candida auris on 3 Continents Confirmed by Whole-Genome Sequencing and Epidemiological Analyses*. *Clin Infect Dis*, 2017. **64**(2): p. 134-140.
52. Perlin, D.S., *Mechanisms of echinocandin antifungal drug resistance*. *Ann N Y Acad Sci*, 2015. **1354**(1): p. 1-11.
53. Berkow, E.L. and S.R. Lockhart, *Activity of CD101, a long-acting echinocandin, against clinical isolates of Candida auris*. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2018. **90**(3): p. 196-197.
54. Garcia-Effron, G., et al., *Effect of Candida glabrata FKS1 and FKS2 mutations on echinocandin sensitivity and kinetics of 1,3-beta-D-glucan synthase: implication for the existing susceptibility breakpoint*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009. **53**(9): p. 3690-9.
55. Hope, W.W., et al., *Molecular mechanisms of primary resistance to flucytosine in Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004. **48**(11): p. 4377-86.
56. Flowers, S.A., et al., *Contribution of clinically derived mutations in ERG11 to azole resistance in Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2015. **59**(1): p. 450-60.
57. Verweij, P.E., et al., *Azole-resistance in Aspergillus: proposed nomenclature and breakpoints*. *Drug Resist Updat*, 2009. **12**(6): p. 141-7.
58. Rodero, L., et al., *G484S amino acid substitution in lanosterol 14-alpha demethylase (ERG11) is related to fluconazole resistance in a recurrent Cryptococcus neoformans clinical isolate*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003. **47**(11): p. 3653-6.
59. Xiao, L., et al., *Three-dimensional models of wild-type and mutated forms of cytochrome P450 14alpha-sterol demethylases from Aspergillus fumigatus and Candida albicans provide insights into posaconazole binding*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004. **48**(2): p. 568-74.

60. Tscherner, M., T. Schwarzmüller, and K. Kuchler, *Pathogenesis and Antifungal Drug Resistance of the Human Fungal Pathogen Candida glabrata*. Pharmaceuticals (Basel). 2011 Jan 11;4(1):169-86. doi: 10.3390/ph4010169. eCollection 2011 Jan.
61. Mansfield, B.E., et al., *Azole drugs are imported by facilitated diffusion in Candida albicans and other pathogenic fungi*. PLoS Pathog, 2010. **6**(9): p. e1001126.
62. Coleman, J.J. and E. Mylonakis, *Efflux in fungi: la piece de resistance*. PLoS Pathog, 2009. **5**(6): p. e1000486.
63. Tobin, M.B., R.B. Peery, and P.L. Skatrud, *Genes encoding multiple drug resistance-like proteins in Aspergillus fumigatus and Aspergillus flavus*. Gene, 1997. **200**(1-2): p. 11-23.
64. Lamping, E., et al., *Characterization of three classes of membrane proteins involved in fungal azole resistance by functional hyperexpression in Saccharomyces cerevisiae*. Eukaryot Cell, 2007. **6**(7): p. 1150-65.
65. Rognon, B., et al., *Identification of promoter elements responsible for the regulation of MDR1 from Candida albicans, a major facilitator transporter involved in azole resistance*. Microbiology (Reading), 2006. **152**(Pt 12): p. 3701-3722.
66. Vermitsky, J.P. and T.D. Edlind, *Azole resistance in Candida glabrata: coordinate upregulation of multidrug transporters and evidence for a Pdr1-like transcription factor*. Antimicrob Agents Chemother, 2004. **48**(10): p. 3773-81.
67. Selmecki, A., A. Forche, and J. Berman, *Genomic plasticity of the human fungal pathogen Candida albicans*. Eukaryot Cell, 2010. **9**(7): p. 991-1008.
68. Selmecki, A., et al., *An isochromosome confers drug resistance in vivo by amplification of two genes, ERG11 and TAC1*. Mol Microbiol, 2008. **68**(3): p. 624-41.
69. Balzi, E., et al., *PDR5, a novel yeast multidrug resistance conferring transporter controlled by the transcription regulator PDR1*. J Biol Chem, 1994. **269**(3): p. 2206-14.
70. Calcagno, C., et al., *Three-dimensional dynamic contrast-enhanced MRI for the accurate, extensive quantification of microvascular permeability in atherosclerotic plaques*. NMR Biomed, 2015. **28**(10): p. 1304-14.
71. Kumamoto, C.A., *Candida biofilms*. Curr Opin Microbiol, 2002. **5**(6): p. 608-11.
72. Ramage, G., et al., *Our current understanding of fungal biofilms*. Crit Rev Microbiol, 2009. **35**(4): p. 340-55.
73. Nett, J.E., et al., *Role of Fks1p and matrix glucan in Candida albicans biofilm resistance to an echinocandin, pyrimidine, and polyene*. Antimicrob Agents Chemother, 2010. **54**(8): p. 3505-8.
74. Guevara, Y.A.S., et al., *A historical, economic, and technical-scientific approach to the current crisis in the development of antibacterial drugs: Promising role of antibacterial peptides in this scenario*. Microb Pathog, 2023. **179**: p. 106108.
75. Lima, P.G., et al., *Synthetic antimicrobial peptides: Characteristics, design, and potential as alternative molecules to overcome microbial resistance*. Life Sci, 2021. **278**: p. 119647.
76. Bechinger, B. and S.U. Gorr, *Antimicrobial Peptides: Mechanisms of Action and Resistance*. J Dent Res, 2017. **96**(3): p. 254-260.
77. Maroti, G., et al., *Natural roles of antimicrobial peptides in microbes, plants and animals*. Res Microbiol, 2011. **162**(4): p. 363-74.
78. Buccini, D.F., M.H. Cardoso, and O.L. Franco, *Antimicrobial Peptides and Cell-Penetrating Peptides for Treating Intracellular Bacterial Infections*. Front Cell Infect Microbiol, 2020. **10**: p. 612931.
79. Wang, G., *Unifying the classification of antimicrobial peptides in the antimicrobial peptide database*. Methods Enzymol, 2022. **663**: p. 1-18.
80. Valdez-Miramontes, C.E., et al., *Antimicrobial peptides in domestic animals and their applications in veterinary medicine*. Peptides, 2021. **142**: p. 170576.
81. Danis-Wlodarczyk, K.M., D.J. Wozniak, and S.T. Abedon, *Treating Bacterial Infections with Bacteriophage-Based Enzybiotics: In Vitro, In Vivo and Clinical Application*. Antibiotics (Basel), 2021. **10**(12).

82. Nelson, D., L. Loomis, and V.A. Fischetti, *Prevention and elimination of upper respiratory colonization of mice by group A streptococci by using a bacteriophage lytic enzyme*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(7): p. 4107-12.
83. Abdelrahman, F., et al., *Phage-Encoded Endolysins*. Antibiotics (Basel), 2021. **10**(2).
84. Scholl, D., *Phage Tail-Like Bacteriocins*. Annu Rev Virol, 2017. **4**(1): p. 453-467.
85. Daw, M.A. and F.R. Falkner, *Bacteriocins: nature, function and structure*. Micron, 1996. **27**(6): p. 467-79.
86. Tajbakhsh, M., et al., *Overview of ribosomal and non-ribosomal antimicrobial peptides produced by Gram positive bacteria*. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2017. **63**(10): p. 20-32.
87. Diep, D.B. and I.F. Nes, *Ribosomally synthesized antibacterial peptides in Gram positive bacteria*. Curr Drug Targets, 2002. **3**(2): p. 107-22.
88. Nissen-Meyer, J. and I.F. Nes, *Ribosomally synthesized antimicrobial peptides: their function, structure, biogenesis, and mechanism of action*. Arch Microbiol, 1997. **167**(2-3): p. 67-77.
89. Duclouhier, H., *Antimicrobial peptides and peptaibols, substitutes for conventional antibiotics*. Curr Pharm Des, 2010. **16**(28): p. 3212-23.
90. Wu, J., B. Gao, and S. Zhu, *The fungal defensin family enlarged*. Pharmaceuticals (Basel), 2014. **7**(8): p. 866-80.
91. Tyskiewicz, R., et al., *Trichoderma: The Current Status of Its Application in Agriculture for the Biocontrol of Fungal Phytopathogens and Stimulation of Plant Growth*. Int J Mol Sci, 2022. **23**(4).
92. Bin Hafeez, A., et al., *Antimicrobial Peptides: An Update on Classifications and Databases*. Int J Mol Sci, 2021. **22**(21).
93. Schneider, T., et al., *Plectasin, a fungal defensin, targets the bacterial cell wall precursor Lipid II*. Science, 2010. **328**(5982): p. 1168-72.
94. Fernandez de Caley, R., et al., *Susceptibility of phytopathogenic bacteria to wheat purothionins in vitro*. Appl Microbiol, 1972. **23**(5): p. 998-1000.
95. Garcia-Olmedo, F., et al., *Antibiotic activities of peptides, hydrogen peroxide and peroxynitrite in plant defence*. FEBS Lett, 2001. **498**(2-3): p. 219-22.
96. Marcus, J.P., et al., *Purification, characterisation and cDNA cloning of an antimicrobial peptide from Macadamia integrifolia*. Eur J Biochem, 1997. **244**(3): p. 743-9.
97. Candido Ede, S., et al., *Plant storage proteins with antimicrobial activity: novel insights into plant defense mechanisms*. FASEB J, 2011. **25**(10): p. 3290-305.
98. Nawrot, R., et al., *Plant antimicrobial peptides*. Folia Microbiol (Praha), 2014. **59**(3): p. 181-96.
99. Tang, S.S., et al., *Antimicrobial peptides from different plant sources: Isolation, characterisation, and purification*. Phytochemistry, 2018. **154**: p. 94-105.
100. Montesinos, E., *Antimicrobial peptides and plant disease control*. FEMS Microbiol Lett, 2007. **270**(1): p. 1-11.
101. Allen, A., et al., *Plant defensins and virally encoded fungal toxin KP4 inhibit plant root growth*. Planta, 2008. **227**(2): p. 331-9.
102. Koike, M., et al., *A novel plant defensin-like gene of winter wheat is specifically induced during cold acclimation*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **298**(1): p. 46-53.
103. Kong, J.L., et al., *[Determination of primary structure of a novel peptide from mistletoe and its antitumor activity]*. Yao Xue Xue Bao, 2004. **39**(10): p. 813-7.
104. Jakel, C.E., et al., *Efficacy of a proapoptotic peptide towards cancer cells*. In Vivo, 2012. **26**(3): p. 419-26.
105. Kumar, R., et al., *Antimicrobial Peptides in Farm Animals: An Updated Review on Its Diversity, Function, Modes of Action and Therapeutic Prospects*. Vet Sci, 2020. **7**(4).

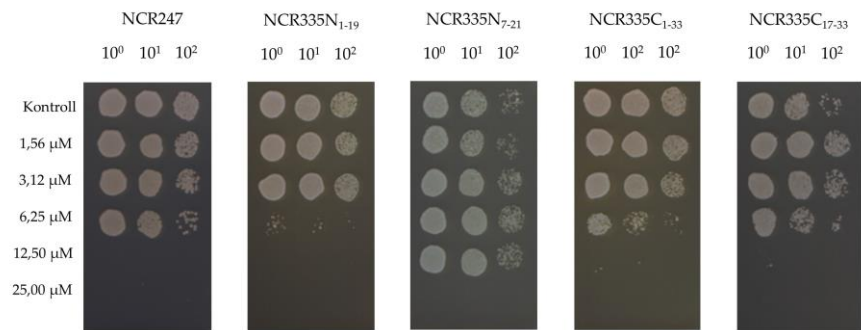
106. Thomä-Worringer, C., J. Sørensen, and R. López-Fandiño, *Health effects and technological features of caseinomacropeptide*. International Dairy Journal, 2006. **16**(11): p. 1324-1333.
107. Hayes, M., et al., *Casein-derived antimicrobial peptides generated by Lactobacillus acidophilus DPC6026*. Appl Environ Microbiol, 2006. **72**(3): p. 2260-4.
108. Brown, S.E., et al., *A peptidomics study reveals the impressive antimicrobial peptide arsenal of the wax moth Galleria mellonella*. Insect Biochem Mol Biol, 2009. **39**(11): p. 792-800.
109. Bulet, P. and R. Stocklin, *Insect antimicrobial peptides: structures, properties and gene regulation*. Protein Pept Lett, 2005. **12**(1): p. 3-11.
110. Hwang, J.S., et al., *Isolation and Characterization of a Defensin-Like Peptide (Coprinsin) from the Dung Beetle, Copris tripartitus*. Int J Pept, 2009. **2009**.
111. Charlet, M., et al., *Innate immunity. Isolation of several cysteine-rich antimicrobial peptides from the blood of a mollusc, Mytilus edulis*. J Biol Chem, 1996. **271**(36): p. 21808-13.
112. Lauro, F.M. and D.H. Bartlett, *Prokaryotic lifestyles in deep sea habitats*. Extremophiles, 2008. **12**(1): p. 15-25.
113. Falanga, A., et al., *Marine Antimicrobial Peptides: Nature Provides Templates for the Design of Novel Compounds against Pathogenic Bacteria*. Int J Mol Sci, 2016. **17**(5).
114. Hancock, R.E. and H.G. Sahl, *Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies*. Nat Biotechnol, 2006. **24**(12): p. 1551-7.
115. Giuliani, A., G. Pirri, and S.F. Nicoletto, *Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics*. Central European Journal of Biology, 2007. **2**: p. 1-33.
116. Mura, M., et al., *The effect of amidation on the behaviour of antimicrobial peptides*. Eur Biophys J, 2016. **45**(3): p. 195-207.
117. Porcelli, F., et al., *On the role of NMR spectroscopy for characterization of antimicrobial peptides*. Methods Mol Biol, 2013. **1063**: p. 159-80.
118. Takahashi, D., et al., *Structural determinants of host defense peptides for antimicrobial activity and target cell selectivity*. Biochimie, 2010. **92**(9): p. 1236-41.
119. Zasloff, M., *Magainins, a class of antimicrobial peptides from Xenopus skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(15): p. 5449-53.
120. Kumar, P., J.N. Kizhakkedathu, and S.K. Straus, *Antimicrobial Peptides: Diversity, Mechanism of Action and Strategies to Improve the Activity and Biocompatibility In Vivo*. Biomolecules, 2018. **8**(1).
121. Edwards, I.A., et al., *Contribution of Amphipathicity and Hydrophobicity to the Antimicrobial Activity and Cytotoxicity of beta-Hairpin Peptides*. ACS Infect Dis, 2016. **2**(6): p. 442-450.
122. Dong, H., et al., *Defensins: The Case for Their Use against Mycobacterial Infections*. J Immunol Res, 2016. **2016**: p. 7515687.
123. Deshayes, C., et al., *Drug Delivery Systems for the Oral Administration of Antimicrobial Peptides: Promising Tools to Treat Infectious Diseases*. Front Med Technol, 2021. **3**: p. 778645.
124. Wang, G., *Human antimicrobial peptides and proteins*. Pharmaceuticals (Basel), 2014. **7**(5): p. 545-94.
125. Koehbach, J. and D.J. Craik, *The Vast Structural Diversity of Antimicrobial Peptides*. Trends Pharmacol Sci, 2019. **40**(7): p. 517-528.
126. Shafee, T.M., et al., *Convergent evolution of defensin sequence, structure and function*. Cell Mol Life Sci, 2017. **74**(4): p. 663-682.
127. Bahar, A.A. and D. Ren, *Antimicrobial peptides*. Pharmaceuticals (Basel), 2013. **6**(12): p. 1543-75.

128. Gaspar, D., A.S. Veiga, and M.A. Castanho, *From antimicrobial to anticancer peptides. A review*. Front Microbiol, 2013. **4**: p. 294.
129. Erdem Buyukkiraz, M. and Z. Kesmen, *Antimicrobial peptides (AMPs): A promising class of antimicrobial compounds*. J Appl Microbiol, 2022. **132**(3): p. 1573-1596.
130. Mueller, P., *Membrane excitation through voltage-induced aggregation of channel precursors*. Ann N Y Acad Sci, 1975. **264**: p. 247-64.
131. Ladokhin, A.S. and S.H. White, *'Detergent-like' permeabilization of anionic lipid vesicles by melittin*. Biochim Biophys Acta, 2001. **1514**(2): p. 253-60.
132. Shai, Y., *Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1462**(1-2): p. 55-70.
133. Wang, J., et al., *Antimicrobial peptides: Promising alternatives in the post feeding antibiotic era*. Med Res Rev, 2019. **39**(3): p. 831-859.
134. Sato, H. and J.B. Feix, *Peptide-membrane interactions and mechanisms of membrane destruction by amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1758**(9): p. 1245-56.
135. Pirtskhalava, M., et al., *Physicochemical Features and Peculiarities of Interaction of AMP with the Membrane*. Pharmaceuticals (Basel), 2021. **14**(5).
136. Browne, K., et al., *A New Era of Antibiotics: The Clinical Potential of Antimicrobial Peptides*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(19).
137. Joo, H.S., C.I. Fu, and M. Otto, *Bacterial strategies of resistance to antimicrobial peptides*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2016. **371**(1695).
138. Pfalzgraff, A., K. Brandenburg, and G. Weindl, *Antimicrobial Peptides and Their Therapeutic Potential for Bacterial Skin Infections and Wounds*. Front Pharmacol, 2018. **9**: p. 281.
139. Abdi, M., S. Mirkalantari, and N. Amirzozafari, *Bacterial resistance to antimicrobial peptides*. J Pept Sci, 2019. **25**(11): p. e3210.
140. Mahlapuu, M., C. Bjorn, and J. Ekblom, *Antimicrobial peptides as therapeutic agents: opportunities and challenges*. Crit Rev Biotechnol, 2020. **40**(7): p. 978-992.
141. Miyoshi, N., et al., *Activity of tick antimicrobial peptide from Ixodes persulcatus (persulcatusin) against cell membranes of drug-resistant Staphylococcus aureus*. J Antibiot (Tokyo), 2017. **70**(2): p. 142-146.
142. Gottschalk, S., et al., *Amphibian antimicrobial peptide fallaxin analogue FL9 affects virulence gene expression and DNA replication in Staphylococcus aureus*. J Med Microbiol, 2015. **64**(12): p. 1504-1513.
143. Silva, T. and M.S. Gomes, *Immuno-Stimulatory Peptides as a Potential Adjunct Therapy against Intra-Macrophagic Pathogens*. Molecules, 2017. **22**(8).
144. Gordon, Y.J., E.G. Romanowski, and A.M. McDermott, *A review of antimicrobial peptides and their therapeutic potential as anti-infective drugs*. Curr Eye Res, 2005. **30**(7): p. 505-15.
145. Agarwal, G. and R. Gabrani, *Antiviral Peptides: Identification and Validation*. Int J Pept Res Ther, 2021. **27**(1): p. 149-168.
146. Villalobos-Delgado, L., et al., *Natural antimicrobial agents to improve foods shelf life*. 2019. p. 125-157.
147. Luz, C., et al., *Antimicrobial packaging based on varepsilon-polylysine bioactive film for the control of mycotoxigenic fungi in vitro and in bread*. J Food Process Preserv, 2018. **42**(1): p. e13370.
148. Thouzeau, C., et al., *Spheniscins, avian beta-defensins in preserved stomach contents of the king penguin, Aptenodytes patagonicus*. J Biol Chem, 2003. **278**(51): p. 51053-8.
149. Elnagdy, S. and M. AlKhazindar, *The Potential of Antimicrobial Peptides as an Antiviral Therapy against COVID-19*. ACS Pharmacol Transl Sci, 2020. **3**(4): p. 780-782.

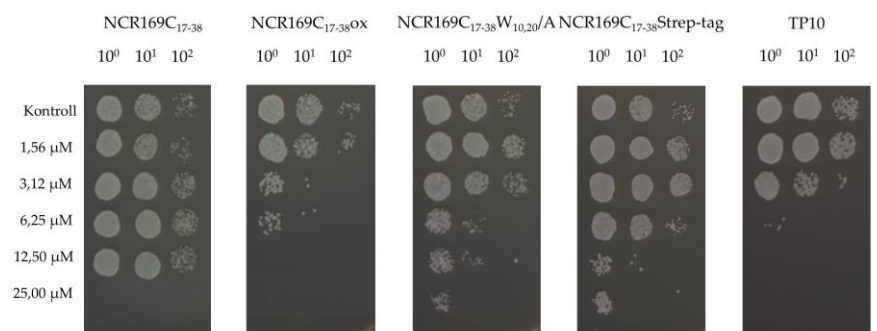
150. Guo, C., et al., *Inhibitory activity and molecular mechanism of protegrin-1 against porcine reproductive and respiratory syndrome virus in vitro*. *Antivir Ther*, 2015. **20**(6): p. 573-82.
151. Liang, X., et al., *Antiviral effects of Bovine antimicrobial peptide against TGEV in vivo and in vitro*. *J Vet Sci*, 2020. **21**(5): p. e80.
152. Sun, Q., et al., *Swine intestine antimicrobial peptides inhibit infectious bronchitis virus infectivity in chick embryos*. *Poult Sci*, 2010. **89**(3): p. 464-9.
153. Hsieh, I.N. and K.L. Hartshorn, *The Role of Antimicrobial Peptides in Influenza Virus Infection and Their Potential as Antiviral and Immunomodulatory Therapy*. Pharmaceuticals (Basel), 2016. **9**(3).
154. Rekha, S.N. Naik, and R. Prasad, *Pesticide residue in organic and conventional food-risk analysis*. *Journal of Chemical Health and Safety*, 2006. **13**(6): p. 12-19.
155. Ciumac, D., et al., *Membrane targeting cationic antimicrobial peptides*. *J Colloid Interface Sci*, 2019. **537**: p. 163-185.
156. Almaaytah, A., et al., *Enhanced Antimicrobial Activity of AamAP1-Lysine, a Novel Synthetic Peptide Analog Derived from the Scorpion Venom Peptide AamAP1*. Pharmaceuticals (Basel), 2014. **7**(5): p. 502-16.
157. Shi, G., et al., *DRAMP 3.0: an enhanced comprehensive data repository of antimicrobial peptides*. *Nucleic Acids Res*, 2022. **50**(D1): p. D488-D496.
158. Deng, T., et al., *The heterologous expression strategies of antimicrobial peptides in microbial systems*. *Protein Expr Purif*, 2017. **140**: p. 52-59.
159. Cao, J., et al., *Yeast-Based Synthetic Biology Platform for Antimicrobial Peptide Production*. *ACS Synth Biol*, 2018. **7**(3): p. 896-902.
160. Wibowo, D. and C.X. Zhao, *Recent achievements and perspectives for large-scale recombinant production of antimicrobial peptides*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2019. **103**(2): p. 659-671.
161. Chan, W. and P. White, *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*. 1999, Oxford University Press.
162. Fields, G.B. and R.L. Noble, *Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids*. *Int J Pept Protein Res*, 1990. **35**(3): p. 161-214.
163. Lima, R.M., et al., *Unexplored Arsenals of Legume Peptides With Potential for Their Applications in Medicine and Agriculture*. *Front Microbiol*, 2020. **11**: p. 1307.
164. Tiricz, H., et al., *Antimicrobial nodule-specific cysteine-rich peptides induce membrane depolarization-associated changes in the transcriptome of *Sinorhizobium meliloti**. *Appl Environ Microbiol*, 2013. **79**(21): p. 6737-46.
165. Carvalho Ade, O. and V.M. Gomes, *Plant defensins--prospects for the biological functions and biotechnological properties*. *Peptides*, 2009. **30**(5): p. 1007-20.
166. Lima, R.M., et al., *Legume Plant Peptides as Sources of Novel Antimicrobial Molecules Against Human Pathogens*. *Front Mol Biosci*, 2022. **9**: p. 870460.
167. Farkas, A., et al., *Medicago truncatula symbiotic peptide NCR247 contributes to bacteroid differentiation through multiple mechanisms*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014. **111**(14): p. 5183-8.
168. Penterman, J., et al., *Host plant peptides elicit a transcriptional response to control the *Sinorhizobium meliloti* cell cycle during symbiosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014. **111**(9): p. 3561-6.
169. Jenei, S., et al., *Potent Chimeric Antimicrobial Derivatives of the Medicago truncatula NCR247 Symbiotic Peptide*. *Front Microbiol*, 2020. **11**: p. 270.
170. Ordogh, L., et al., *Symbiotic plant peptides eliminate *Candida albicans* both in vitro and in an epithelial infection model and inhibit the proliferation of immortalized human cells*. *Biomed Res Int*, 2014. **2014**: p. 320796.

171. Velivelli, S.L.S., et al., *Antifungal symbiotic peptide NCR044 exhibits unique structure and multifaceted mechanisms of action that confer plant protection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2020. **117**(27): p. 16043-16054.
172. Lamiable, A., et al., *PEP-FOLD3: faster de novo structure prediction for linear peptides in solution and in complex*. Nucleic Acids Res, 2016. **44**(W1): p. W449-54.
173. Shen, Y., et al., *Improved PEP-FOLD Approach for Peptide and Miniprotein Structure Prediction*. J Chem Theory Comput, 2014. **10**(10): p. 4745-58.
174. Thevenet, P., et al., *PEP-FOLD: an updated de novo structure prediction server for both linear and disulfide bonded cyclic peptides*. Nucleic Acids Res, 2012. **40**(Web Server issue): p. W288-93.
175. Hall, M.J., R.F. Middleton, and D. Westmacott, *The fractional inhibitory concentration (FIC) index as a measure of synergy*. J Antimicrob Chemother, 1983. **11**(5): p. 427-33.
176. Fisher, M.C., et al., *Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security*. Science, 2018. **360**(6390): p. 739-742.
177. Revie, N.M., et al., *Antifungal drug resistance: evolution, mechanisms and impact*. Curr Opin Microbiol, 2018. **45**: p. 70-76.
178. Lei, J., et al., *The antimicrobial peptides and their potential clinical applications*. Am J Transl Res, 2019. **11**(7): p. 3919-3931.
179. Fernandez de Ullivarri, M., et al., *Antifungal Peptides as Therapeutic Agents*. Front Cell Infect Microbiol, 2020. **10**: p. 105.
180. Rathinakumar, R., W.F. Walkenhorst, and W.C. Wimley, *Broad-spectrum antimicrobial peptides by rational combinatorial design and high-throughput screening: the importance of interfacial activity*. J Am Chem Soc, 2009. **131**(22): p. 7609-17.
181. Buda De Cesare, G., et al., *Antimicrobial Peptides: a New Frontier in Antifungal Therapy*. mBio, 2020. **11**(6).
182. Haag, A.F., et al., *Role of cysteine residues and disulfide bonds in the activity of a legume root nodule-specific, cysteine-rich peptide*. J Biol Chem, 2012. **287**(14): p. 10791-8.
183. Shabab, M., et al., *Disulfide cross-linking influences symbiotic activities of nodule peptide NCR247*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. **113**(36): p. 10157-62.
184. Feng, X., et al., *The Critical Role of Tryptophan in the Antimicrobial Activity and Cell Toxicity of the Duck Antimicrobial Peptide DCATH*. Front Microbiol, 2020. **11**: p. 1146.
185. Gow, N.A., et al., *Candida albicans morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization*. Nat Rev Microbiol, 2011. **10**(2): p. 112-22.
186. do Nascimento Dias, J., et al., *Mechanisms of action of antimicrobial peptides ToAP2 and NDBP-5.7 against Candida albicans planktonic and biofilm cells*. Sci Rep, 2020. **10**(1): p. 10327.

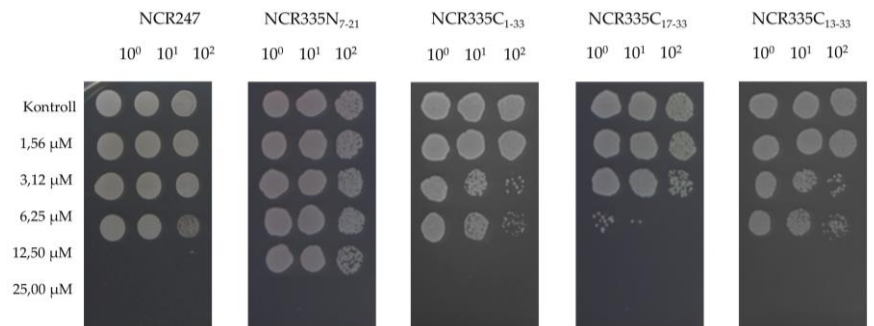
11. MELLÉKLETEK



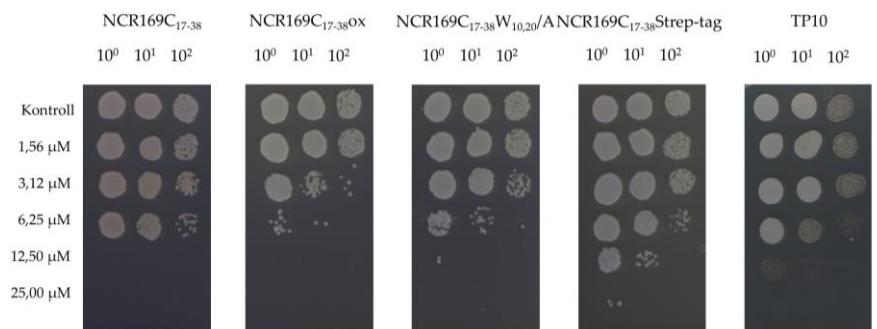
(a/1)



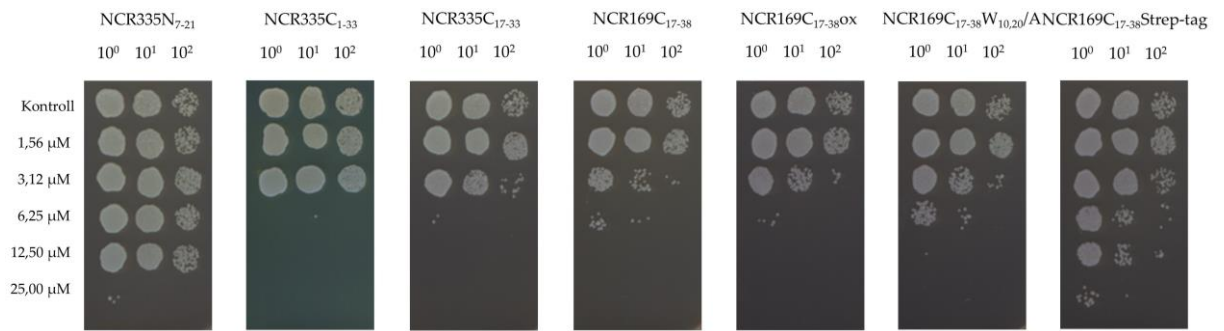
(a/2)



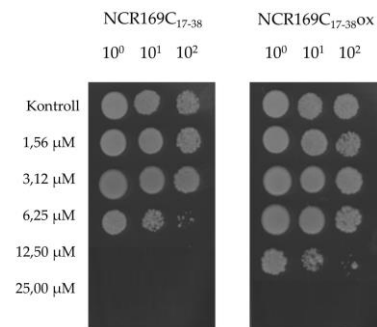
(b/1)



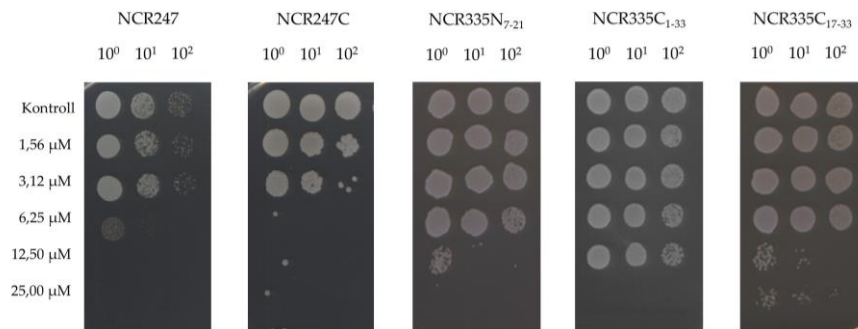
(b/2)



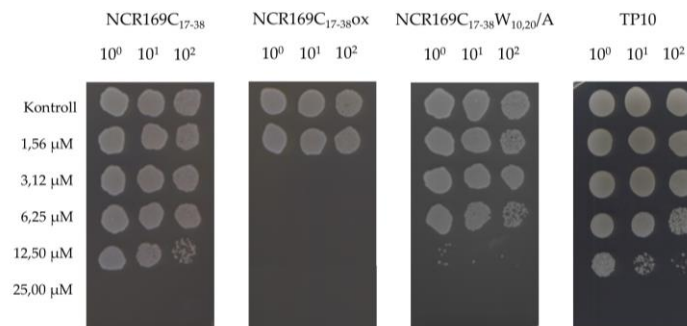
(c)



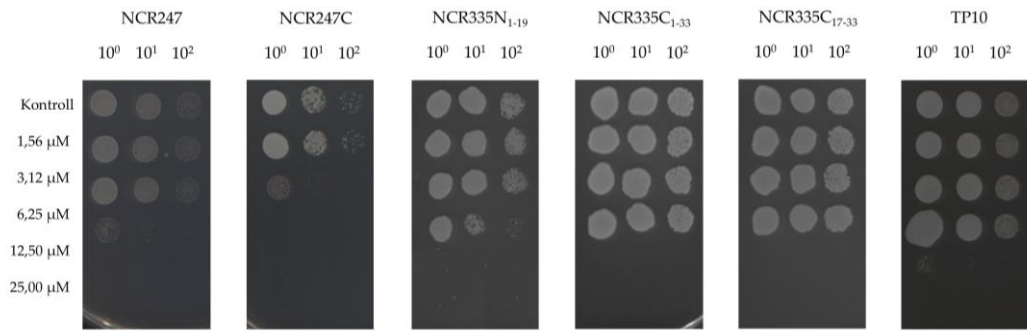
(d)



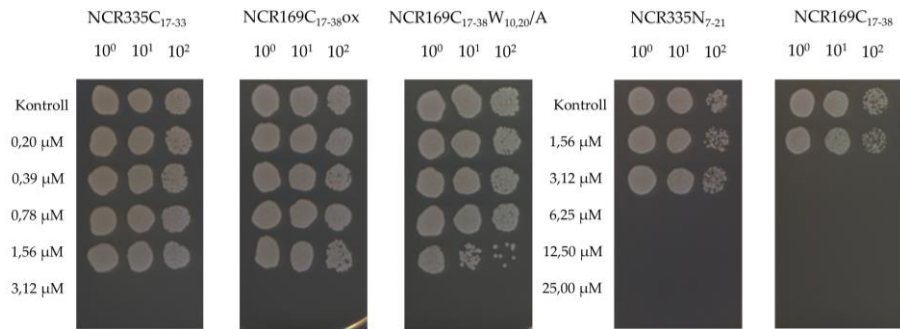
(e/1)



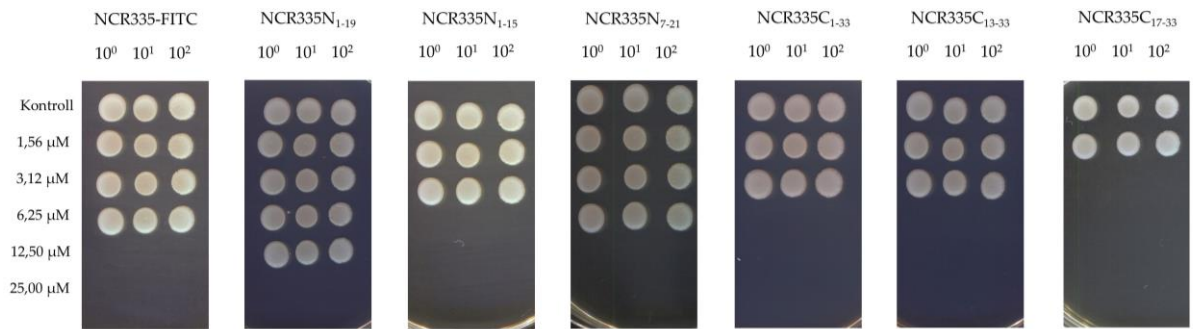
(e/2)



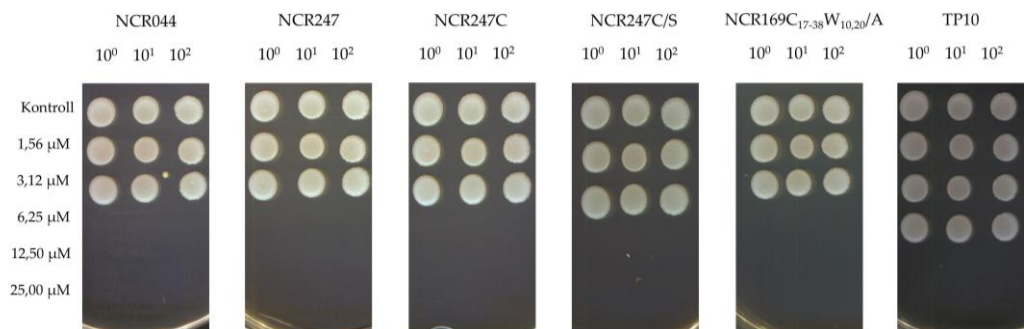
(f)



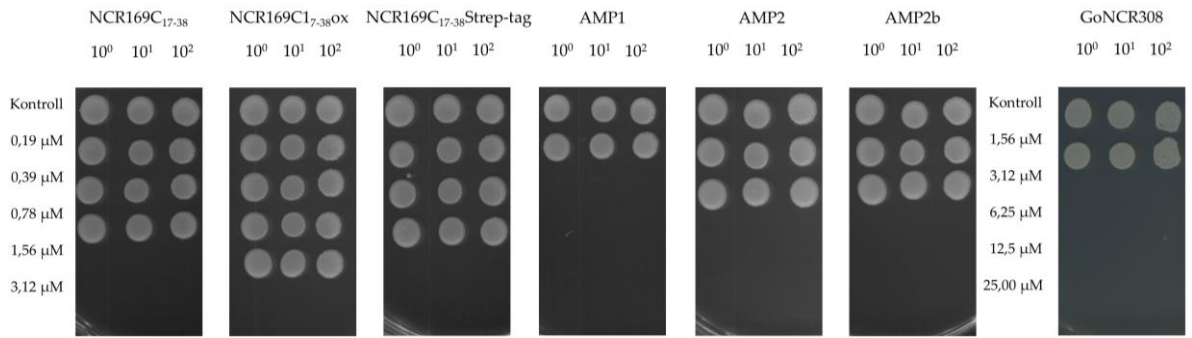
(g)



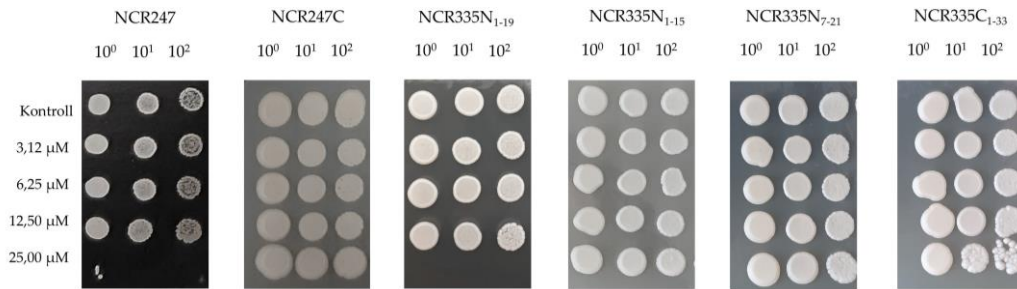
(h/1)



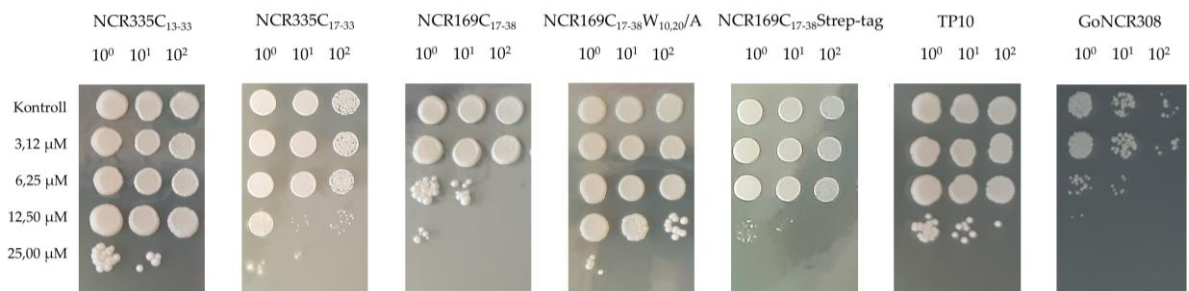
(h/2)



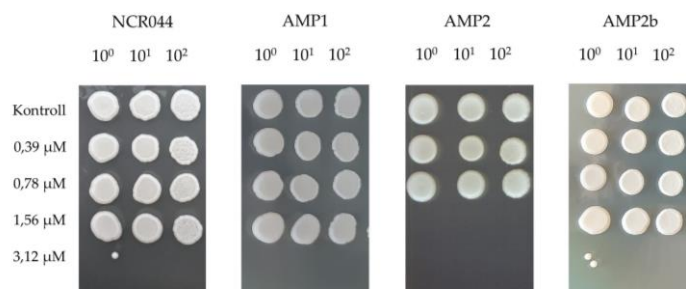
(h/3)



(i/1)



(i/2)



(i/3)

M1. ábra: *Candida* fajok és *Cryptococcus neoformans* növekedése antimikrobiális peptidekkel történt kezelés után.

(a) *Candida albicans* ATCC 10231, (b) *C. albicans* SC5314, (c) *C. albicans* SZMC 1458, (d) *C. auris* 0381, (e) *C. glabrata* CBS 138, (f) *C. parapsilosis* CBS 604, (g) *C. tropicalis* CBS 94, (h) *Cr. neoformans* IFM 5844 (i) *Cr. neoformans* IFM 5844
A peptidok neve és a hígítás mértéke az ábrák felett, a peptidok koncentrációja az ábrák bal oldalán van feltüntetve. A kezelések (a)-(h)-ig YNB, (i) X-VIVO tápoldatban történtek 48 órán keresztül.

Peptid	nC	nG1	nG2	kruskalp	kruskalp05	C.G1	C.G2	G1.G2	C.G1.p>0,05	C.G2.p>0,05	G1.G2.p>0,05
AMP2b	154	161	146	1,26E-07	0	1,98E-06	2,06E-06	0,202866657	0	0	1
NCR044	150	117	183	2,79E-19	0	0,003240255	1,12E-17	1,45E-09	0	0	0
NCR169C ₁₇₋₃₈	220	171	270	4,84E-27	0	1,57E-05	3,56E-23	3,50E-14	0	0	0
NCR169C ₁₇₋₃₈ W _{10,20/A}	232	165	298	2,31E-46	0	4,12E-17	1,42E-43	1,01E-09	0	0	0
NCR247	186	267	104	4,38E-27	0	1,14E-13	6,30E-24	2,68E-09	0	0	0
NCR335C ₁₋₃₃	163	169	157	3,32E-11	0	0,554404223	5,14E-07	2,05E-10	0,98	0	0
NCR335C ₁₃₋₃₃	232	263	202	2,07E-26	0	0,054941767	2,78E-14	2,34E-24	0,21	0	0
NCR335C ₁₇₋₃₃	202	224	179	8,31E-10	0	0,046981944	1,09E-08	4,77E-07	0,29	0	0
NCR335N ₁₋₁₉	229	230	228	0,026649	0,16	0,029567149	0,119053202	0,21231836	0,17	0,57	1
NCR335N ₇₋₂₁	172	197	148	5,15E-08	0	0,001085124	0,304352029	4,02E-08	0,01	0,9	0
TP10	202	165	240	1,19E-05	0	0,001541741	0,453843898	5,00E-06	0	0,94	0

M1. táblázat: Peptidek *Cr. neoformans* IFM 5844 sejtek méretére gyakorolt hatása

C: kontroll; G1: alacsonyabb koncentrációjú kezelés (lásd 7. táblázat); G2: magasabb koncentrációjú kezelés (lásd 7. táblázat)

n: mintanagyság; **kruskalp**: Kruskal-Wallis teszt p-értéke

C.G1: kontroll és G1 páronkénti p-értéke; C.G2: kontroll és G2 páronkénti p-értéke; G1.G2: G1 és G2 páronkénti p-értéke
p-értékek 100 szimuláció átlagából
05 a névben azok aránya, ahol p>0,05 volt (nem szignifikáns)