

DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**A *Neosartorya fischeri* által termelt defenzinszerű antifungális
protein azonosítása és jellemzése**

Kovács Laura



Témavezetők:

Prof. Dr. Vágvölgyi Csaba, tanszékvezető egyetemi tanár

Dr. Galgóczi László, tudományos munkatárs

Biológia Doktori Iskola

Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi és Informatikai Kar
Mikrobiológiai Tanszék

Szeged

2014

Bevezetés

Az utóbbi 20 évben jelentősen emelkedett a mikrobiális fertőzések esetszáma. Ennek okát elsősorban a legyengült immunrendszerű betegek növekvő számában, az immunszuppresszív terápia mind gyakoribb alkalmazásában és a széles spektrumú antibiotikumok nem megfelelő használata következtében megjelenő rezisztens (gyakran multidrog-rezisztens) mikroorganizmus-törzsek terjedésében kell keresnünk. Különösen nagymértékű növekedés következett be az opportunist gombafertőzések esetszámában, amikor a legyengült szervezetben egy egészséges emberrel szemben nem patogén gomba kórokozóként tűnik fel. Az ilyen fertőzések kezelése nehézkes, mivel a rendelkezésre álló terápiás szerek száma alacsony, gyakran szűk spektrumúak, számos mellékhatással rendelkeznek és a gazda szervezetét jelentős mértékben károsítják. A növényvédelemnek is komoly gondot jelent a gombák által okozott, a termésveszteség nagy részéért felelős fertőzések és raktári kártevők leküzdése. Az ennek érdekében tett erőfeszítések célja a természetlag megtartása, annak növelése, illetve a raktári penészkártévők visszaszorítása hatékony antifungális szerek alkalmazásával.

Mindezekből következően szükség van új, antifungális készítmények kifejlesztésére. A fonalas tömlősgombák által termelt, defenzinszerű fehérjék számos tulajdonsága megfelel az újonnan kifejlesztendő, a gyógyászatban és a növényvédelemben használatos gombaellenes szerekkel szemben támasztott legfontosabb követelményeknek; új stratégiai távlatokat nyitva meg a fonalgombák által okozott kártételek elleni védekezésben: Egymástól eltérő módon, hatékonyan gátolják mezőgazdasági, orvosi és élelmiszeripari szempontból káros fonalgombák növekedését. Gombaellenes hatással rendelkező koncentrációban a növényi- és az emlőssejtekre nem fejtenek ki mérgező hatást, a szervezetbe bekerülve nem

váltak ki gyulladást. Extrém környezeti körülmények között is stabilak. Képesek más gombaellenes fehérjékkel és antimikotikumokkal kölcsönhatásba lépve azok hatékonyságát megnövelni. A penészgombák által termelt, defenzinszerű antifungális proteinek aminosavsorrendje nagyon eltérő, konzervált homológ régiók minden esetben megfigyelhetők. Ezek alapján két nagy csoportot különíthetünk el: (1) proteinek, amik tartalmazzák a *Penicillium chrysogenum* antifungális proteinek (PAF) jellemző klasztert; és (2) proteinek, amelyekre a *Penicillium brevicompactum* "bubble protein" (BP) klaszter a jellemző. PAF klaszterrel rendelkező defenzinszerű fehérjét eddig hat különböző fajba tartozó tömlősgombából izoláltak: *Aspergillus clavatus* (AcAMP, ACLA), *Aspergillus giganteus* (AFP), *Aspergillus niger* (ANAFP), *Fusarium polyphialidicum* (FPAP), *P. chrysogenum* (PAF, PgAFP) és *Penicillium nalgiovense* (NAF). A *Neosartorya fischeri* esetében egy ortológ gén jelenlétére következtetnek genomai adatbázisok számítógépes elemzése alapján. További közös tulajdonságuk az extracelluláris termelés, a kis molekulatömeg, a bázikus jelleg, 6-8 cisztein molekula jelenléte és ebből következően több intramolekuláris diszulfid-híd kialakulása. A proteinek harmadlagos szerkezete hasonlóságot mutat a β -defenzinekéhez: 5-6 antiparallel állású β -lemez három hurokrégióval összekapcsolva (β -hordó). Kompakt struktúrájuk és a diszulfid-hidak jelenléte következtében a molekulák extrém környezeti hatásokkal és fehérjebontó enzimekkel szemben ellenállóak.

Munkánk során egy új, a *Neosartorya fischeri* NRRL 181 izolátum által termelt, antifungális aktivitással rendelkező, PAF-klasztert tartalmazó defenzinszerű fehérjét azonosítottunk és jellemeztünk, továbbá vizsgáltuk a fehérje antifungális tulajdonságait, hatásmódját és biológiai szerepét. Eredményeink jelentős mértékben bővítik a defenzinszerű antifungális

fehérjékkel kapcsolatos ismereteinket, új távlatokat nyitva meg lehetséges alkalmazásuk előtt.

Célkitűzések

Az utóbbi két évtizedben felfedezett, a fonalasszombák által termelt, kis molekulatömegű, defenzinszerű antifungális proteinek hatékonyan gátolják számos fonalasszomba növekedését, valamint spóráinak csírázását. A rendszertanilag távol álló gombafajok által termelt, szerkezetileg hasonló proteinek hatásmódja és antimikrobiális spektruma jelentősen eltér egymástól, így külön-külön is értékes alapot szolgáltathatnak alap- és alkalmazott kutatások számára.

A *N. fischeri* NRRL 181 antifungális protein (NFAP) egy, a *N. fischeri* NRRL 181 genomjában megtalálható szekvenciából származtatott hipotetikus antifungális protein (ProteinID: XP_001262586), jelenléte csak *in silico* bizonyított (GeneID: 4589416). Klónozásáról, izolálásáról, antimikrobiális spektrumáról, hatásmódjáról és biológiai szerepéről még nem számoltak be.

Mindezek alapján a következő célokat fogalmaztuk meg:

1. Az NFAP-t kódoló gén izolálása *N. fischeri* NRRL 181 izolátumból.
2. Az NFAP izolálása, szerkezetének, antimikrobiális tulajdonságainak és hatásának vizsgálata.
3. Az NFAP filogenetikai kapcsolatainak feltárása.
4. Az NFAP hatásmódjának a vizsgálata.
5. Az NFAP biológiai szerepének a vizsgálata.

Alkalmazott módszerek

DNS, RNS alapú technikák:

- DNS tisztítása
- RNS tisztítása
- cDNS szintézis
- DNS/RNS gélelektroforézis
- Polimeráz láncreakció (PCR), *double-joint-PCR*
- DNS klónozása
- Plazmid DNS tisztítása
- Southern hibridizáció
- Transzformáló vektor és lineáris deléciós konstrukció építése

Nukleotid és aminosav szekvencia adatok elemzése:

- Nukleotid szekvenciák analízise és összehasonlítása
- Nukleotid szekvenciákból származtatott aminosav szekvenciák meghatározása és analízise
- Fehérjeszerkezet meghatározás *in silico*
- Aminosav alapú filogenetikai elemzés

Fehérje alapú technikák:

- Denaturáló poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE)
- Gélszűrési kromatográfia
- Ioncserés kromatográfia

In vitro antifungális szer érzékenység vizsgálati technikák:

- Agardiffúziós teszt
- Mikrodilúciós teszt

Fonalasgombák genetikai transzformációja:

- Protoplasztok képzése
- Protoplasztok polietilén-glikol (PEG)-közvetített transzformációja integratív konstrukcióval
- Monosporangiális telepek izolálása

Fonalasgombák *in vitro* antagonizmus vizsgálata

Fény-, fluoreszcens- és pásztázó elektronmikroszkópia

Eredmények

Az *nfap* izolálása *N. fischeri* NRRL 181 izolátumból (Kovács és mtsai., 2011).

Munkánk során izoláltuk a tömlősgomba PAF-klaszterrel rendelkező, defenziszzerű fehérjékkel homológ *nfap*-t a *N. fischeri* NRRL 181 izolátumból. Az *in silico* vizsgálatok eredményeként az érett NFAP egy 57 aminosavból álló, 6,6255 kDa tömegű, cisztein-gazdag, bázikus (pI=8,93) protein. Aminosavszekvenciája 10,3-22,8% homológiát mutat a szakirodalomban korábban leírt hasonló fehérjékkel.

Az NFAP *in silico* szerkezetmeghatározása, filogenetikai analízise (Kovács és mtsai., 2011; Galgóczy és mtsai., 2013a).

Az NFAP három diszulfid-híd által stabilizált harmadlagos szerkezete (5 β -lemez hurokrégiókkal összekapcsolva) nagyon hasonló a többi fonalgomba által termelt defenziszzerű molekulák szerkezetéhez.

Vizsgáltuk az NFAP filogenetikai kapcsolatát más tömlősgomba eredetű, defenziszzerű antifungális fehérjével. Megállapítottuk, hogy az NFAP a PAF-tól és az *A. niger* által termelt ANAFP-tól elkülönülő AFP-rokon kládban helyezkedik el.

Az NFAP izolálása (Kovács és mtsai., 2011).

Az *nfap* promóter analízise során külső környezeti szignálokra és stresszhatásra termelődő transzkripció faktorok kötőhelyeit azonosítottuk. Ezek figyelembevételével sikerült optimalizálnunk az NFAP termelődését elősegítő tápközeget és tenyésztési körülményeket. Sikerült izolálnunk a *N. fischeri* NRRL 181 fermentlé antifungálisan aktív frakcióiból egy ~6,6 kDa tömegű fehérjét és az általunk alkalmazott módszerrel 1000 ml fermentléből 1250 ± 123 μ g NFAP-t tisztítanunk.

Az NFAP antifungális tulajdonságainak és hatásának vizsgálata (Kovács és mtsai., 2011).

Antimikrobiális érzékenységi vizsgálataink során öt-öt különböző fajba tartozó járomspórás és tömlősgomba-izolátumból két Ascomycota (*A. niger* és *A. nidulans*) és egy Zygomycota (*R. miehei*) érzékenynek mutatkozott az NFAP antifungális hatásával szemben (12,5-200 µg/ml). Hasonlóan a fonalgombák által termelt defenzinszerű fehérjékhez, az NFAP antifungális aktivitása is dóziszfüggő, ugyanis kimutattuk, hogy *A. niger*-rel szemben a fehérje szubletális koncentrációban alkalmazva (100 µg/ml) növekedésgátló, azonban magasabb koncentrációban (200 µg/ml) fungicid hatású. Az NFAP hatására az érzékeny gombán a szakirodalomban leírt rokon proteinekéhez (AFP, PAF) hasonló fenotipikus változásokat mutattunk ki: a spórák csírázása gátlódik; késleltetett, torzult, elágazó hifanövekedés jön létre. Az *A. corymbifera*, a *B. cinerea*, a *F. graminearum*, a *M. wolfii*, a *M. piriformis*, a *R. microsporus* var. *rhizopodiformis* és a *T. longibrachiatum* az általunk alkalmazott *in vitro* tesztekben rezisztensnek bizonyultak az NFAP-vel szemben.

Kimutattuk, hogy az NFAP a PAF-hoz és AFP-hez hasonlóan stabilitását tág pH tartományon (pH=7,0-9,0) belül és magas hőmérsékletkezelés (30 perc, 100 °C) ellenére is megőrzi, továbbá azt, hogy a protein nagymértékben ellenálló proteolitikus kezeléssel (10 mg/ml proteináz K, 30 °C, 16 h) szemben.

Az NFAP hatásmódjának vizsgálata (Galgózy és mtsai., 2013b).

Munkánk során egy plazmid-alapú expressziós rendszer létrehozásával sikerült az NFAP konstitutív heterológ expresszióját megvalósítanunk egy előzetesen kismértékben NFAP-érzékenynek bizonyult *A. nidulans* törzsben. Az NFAP-termelő *A. nidulans* törzs csökkent mértékű hifanövekedést mutatott, melynek mértéke függött a

leoltáshoz használt konídium-mennyiségtől: szignifikáns különbség nem mutatkozott 10^4 konídium/ml mennyiség alkalmazásáig, 10^5 konídium/ml esetében viszont jelentős csökkenés, 10^6 konídium/ml esetében már teljes önpusztító hatás következett be. Az expressziós rendszer NFAP hozama az „önmérgező” jellegéből fakadóan kb. ugyanakkora volt (1680 ± 223 μg egy liter fermentléből), mint a natív termelőé. Vizsgálataink során sikerült kimutatnunk, hogy az NFAP a PAF-hoz hasonlóan képes ROS-termelést kiváltani, ezáltal apoptózist és nekrozist indukálni, továbbá képes az AFP esetében megfigyelt tünetet, a kitinfilamentumok kiépülésének a zavarát is kiváltani a fejlődő hifában.

Munkánk során bizonyítottuk, hogy a hNFAP-okozta önmérgező hatást az egy- és kétértékű kationok jelenléte jelentős mértékben, dózisfüggő módon csökkentette. Az emelkedő sókoncentráció (50 és 100 mM KCl, Na_2SO_4 és MgSO_4) az NFAP-termelő transzformáns törzs esetében a micélium száraztömegének jelentős növekedését eredményezte. A KCl hatására bekövetkező hatásnál szignifikánsan nagyobb mértékű gátlást tapasztaltunk MgSO_4 esetében, a legnagyobb gátlási képességet Na_2SO_4 alkalmazásával érték el. A fent említett adatok alapján feltételezhető, hogy az NFAP képes elektrosztatikusan kötni a gombasejthez és ezt a kötődést a kationok megakadályozni.

Az NFAP biológiai szerepének tanulmányozása

Munkánk során előállítottuk a *N. fischeri* NRRL 181 NFAP-t kódoló génben deléciós mutánsát ($\Delta nfap$). Vizsgáltuk a vad típusú és deléciós mutáns törzsek növekedését, továbbá az említett törzsek *in vitro* antagonizmusra való képességét (*in vitro* antagonizmus index, IVAI) az adott proteinre érzékeny és ellenálló, hasonló ökológiai niche-t elfoglaló gombaizolátumokkal szemben komplett (CM) és minimál (MM) táptalajon.

Kimutattuk, hogy a vad típushoz képest a $\Delta nfac$ mutáns törzs szignifikánsan lassabb növekedést mutatott MM-táptalajon. Ez a megfigyelés az NFAP-nek a gomba növekedésében betöltött szerepére enged következtetni éhezés indukálta stresszkörülmények között. A vad típusú törzs szignifikánsan hatékonyabban gátolta az NFAP-érzékeny izolátumok növekedését, mint a deléciós törzs. A vad típusú törzs gátló hatása elsősorban minimál táptalajon érvényesült. Amennyiben a vad és deléciós mutáns törzsek növekedésgátló hatást mutattak ugyanazon kompetitor gombaizolátummal szemben, a deléciós törzs IVAI-értéke szignifikánsan kisebb volt. Mindezek jelzik azt, hogy elsősorban a stressz (csökkentett, nehezen hozzáférhető tápanyagtartalom; a másik gomba jelenléte, illetve az ennek következtében létrejövő tápanyagfogyás) hatására termelődő NFAP szerepet játszik az adott élőhelyért folytatott versenyben is a hasonló ökológiai niche-t elfoglaló gombával szemben.

Összefoglalás

Eredményeink összefoglalásaként elmondhatjuk, hogy:

1. Sikerült izolálnunk egy új, a tömlősgomba defenzinszerű fehérjével homológ antifungális peptidet (NFAP), illetve annak kódoló génjét *N. fischeri* (NRRL 181)-ből.
2. *In silico* meghatároztuk, hogy az NFAP harmadlagos szerkezete nagyon hasonló a tömlősgomba defenzinszerű fehérjééhez.
3. Megállapítottuk, hogy az NFAP filogenetikailag a PAF-tól és az ANAFP-tól elkülönülő AFP-rokon kládban helyezkedik el.
4. Kimutattuk, hogy az NFAP dóziszfüggő módon gátolta fonalagombák növekedését, antifungális aktivitását széles pH tartományban, magas hőmérsékletkezelés és proteolitikus kezeléssel szemben megőrzi.
5. Sikerült megvalósítanunk az NFAP aktív formában történő expresszióját *A. nidulans* CS2902 törzsben. Kutatócsoportunk először írta le Ascomycota eredetű, defenzinszerű molekula heterológ expresszióját más fonalagombában.
6. Vizsgáltuk az NFAP antifungális hatásmódját. Kimutattuk, hogy a fehérje hatásának tünetei hasonlóak a PAF-klaszterrel rendelkező defenzinszerű fehérjék okozta tünetekhez.
7. Bizonyítottuk, hogy az NFAP antifungális hatása csökken az egy- és kétértékű kationok nagy mennyiségű jelenlétében.
8. Sikerült előállítottuk egy *N. fischeri* NRRL 181 $\Delta nfap$ törzset.
9. Megfigyeltük az NFAP lehetséges szerepét a gomba növekedésében éhezés indukálta stresszkörülmények között, továbbá az élőhelyért folytatott versenyben a hasonló ökológiai niche-t elfoglaló gombával szemben.

A dolgozat alapjúl szolgáló folyóiratcikkek:

- **Kovács, L.**, Virágh, M., Takó, M., Papp, T., Vágvölgyi, Cs. and Galgóczy, L. (2011) Isolation and characterization of *Neosartorya fischeri* antifungal protein (NFAP). Peptides. 32, 1724-1731. (IF₂₀₁₁=2,434)
- Galgóczy, L., Virágh, M., **Kovács, L.**, Tóth, B., Papp, T. and Vágvölgyi, Cs. (2013a) Antifungal peptides homologous to the *Penicillium chrysogenum* antifungal protein (PAF) are widespread among Fusaria. Peptides. 39, 131-137. (IF₂₀₁₂=2,522)
- Galgóczy, L., **Kovács, L.**, Karácsony, Z., Virágh, M., Hamari, Zs. and Vágvölgyi, Cs. (2013b) Investigation of the antimicrobial effect of *Neosartorya fischeri* antifungal protein (NFAP) after heterologous expression in *Aspergillus nidulans*. Microbiology. 159, 411-419. (IF₂₀₁₂=2,852)

Egyéb folyóiratcikkek:

- Galgóczy, L., **Kovács, L.**, Krizsán, K., Papp, T. and Vágvölgyi, Cs. (2009) Inhibitory effect of cysteine and cysteine derivatives on germination of sporangiospores and hyphal growth of different Zygomycetes. Mycopathologia. 168, 125-134. (IF₂₀₀₉=1,728)
- Galgóczy, L., Papp, T., **Kovács, L.**, Ördögh, L. and Vágvölgyi, Cs. (2009) *In vitro* activity of phenothiazines and their combinations with amphotericin B against zygomycetes causing rhinocerebral zygomycosis. Med. Mycol. 47, 331-335. (IF₂₀₀₉=2,133)
- Galgóczy, L., Virágh, M., **Kovács, L.**, Tóth, L. and Vágvölgyi, Cs. (2013) Potential applications of filamentous fungus derived β -defensin-like antifungal proteins in agriculture. Review on Agriculture and Rural Development. 2, Supplement CD of XII Wellmann International Scientific Conference. (IF₂₀₁₂=0,000)
- Virágh, M., Vörös, D., Kele, Z., **Kovács, L.**, Fizil, Á., Lakatos, G., Maróti, G., Batta, G., Vágvölgyi, C., Galgóczy, L. (2014) Production of a defensin-like antifungal protein NFAP from *Neosartorya fischeri* in *Pichia pastoris* and its antifungal activity against filamentous fungal isolates from human infections. Protein Expr. Purif. 94,79-84. (IF₂₀₁₂=1,429)

Összesített impakt faktor: 20,038