

ZÁRÓ SZAKMAI BESZÁMOLÓ A
„A *NEOSARTORYA FISCHERI* ÉS ROKON FAJOK ÁLTAL TERMELT DEFENZIN-
SZERŰ ANTIMIKROBIÁLIS PROTEINEK AZONOSÍTÁSA ÉS JELLEMZÉSE”
CÍMŰ POSZTDOKTORI (PD) OTKA PÁLYÁZATHOZ

OTKA azonosító: PD 83355

Témavezető: Dr. Galgóczy László

Kutatási időszak kezdete: 2010. 10. 01.

Kutatási időszak vége: 2013. 08. 31. (kérésre az eredetileg tervezett 2013. 09. 30. helyett)

A pályázati program célja a *Neosartorya fischeri* fonalas tömlősgomba és rokon fajai által termelt defenzin-szerű antimikrobiális proteinek azonosítása és vizsgálata volt a *Neosartorya fischeri* NRRL 181 (NFAP) antifungális protein tanulmányozásán keresztül.

A munkát indokolta, hogy az élővilágban széles körben elterjedt defenzinek szerkezetéhez nagymértékben hasonló antimikrobiális proteinek jelenlétét mindössze csak öt fonalgombából mutatták ki a pályázat kezdetéig. A rendszertanilag távol álló gombafajok termelte, szerkezetileg hasonló defenzin-szerű proteinek hatásmódja és antimikrobiális spektruma jelentős eltér egymástól, így külön-külön is értékes alapot szolgáltathatnak alap és alkalmazott kutatások számára (pl. szerkezet-antimikrobiális hatás összefüggés vizsgálata; új peptid-alapú antifungális szerek kifejlesztése a gyógyászatban, növényvédelemben és élelmiszertartósításban). Az NFAP, a *N. fischeri* NRRL 181 izolátum (anamorfja: *Aspergillus fischerianus*) genomjában megtalálható szekvenciából származtatott hipotetikus antifungális protein, jelenléte csak *in silico* bizonyított. Klónozásáról, izolálásáról, antimikrobiális spektrumáról, hatásmódjáról és biológiai szerepéről még nem számoltak be. Az NFAP átfogó vizsgálata jelentősen bővíti a fonalgombák által termelt defenzin-szerű antimikrobiális proteinekről meglévő ismereteinket lehetőséget teremtve új, hatékony peptid-alapú antimikrobiális szerek kifejlesztésére. Tekintettel az NFAP-hez hasonló szerkezetű proteinek elterjedésére az élővilágban, kitűzött céljaink teljesítése mikrobiológiai problémákon túlmutató kérdésekre is választ adhat.

A kutatási tervben a következő konkrét célkitűzések szerepeltek:

- 1. Az NFAP és ortológjainak azonosítása *N. fischeri* NRRL 181 izolátumból és rokon fajokból.**
- 2. Az NFAP *in vitro* antimikrobiális tulajdonságainak vizsgálata.**
- 3. Heterológ expressziós rendszer létrehozása az NFAP termelésére.**
- 4. Szerkezeti mutáns NFAP-k létrehozása, *in vitro* antimikrobiális tulajdonságuk vizsgálata, az NFAP szerkezete és hatásfoka közötti összefüggés feltárása.**
- 5. Az NFAP hatásmechanizmusának és biológiai szerepének vizsgálata.**

A támogatási időszak alatt a következő konkrét eredményeket értük el (Az eddig nem publikált eredmények részletesen bemutatva.):

- 1. Izoláltuk és klónoztuk az NFAP-t kódoló gént és cDNS-t a *N. fischeri* NRRL 181 izolátumból.**

A meghatározott génszekvenciákat a GenBank nemzetközi adatbázisba deponáltuk (GenBank ID: AM983570.1). Az általunk izolált gén kismértékű egyezést mutatott nukleotidsorrendjében a korábban már izolált és jellemzett *Penicillium chrysogenum* (PAF) és *Aspergillus giganteus* antifungális proteinek (AFP) kódoló génekkel.

Ezt az eredményünket az alábbi folyóiratcikkben,

Kovács, L., et al. (2011) Isolation and characterization of *Neosartorya fischeri* antifungal protein (NFAP). Peptides 32, 1724-1731. IF2011=2.434.

könyvfejezetben

Galgóczy, L., et al. (2010) Defensin-like antifungal proteins secreted by filamentous fungi. In: Méndez-Vilas, A. (szerk.) Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology Vol. 1, Microbiology Book Series-Number 2. Badajoz: Formatex Research Center, 2010. pp. 550-559. (ISBN: 978-84-614-6194-3)

és nemzetközi konferencián közöltük:

Kovács, L., et al. (2010) Investigation of *Neosartorya fischeri* antimicrobial protein (NFAP). Power of Microbes in Industry and Environment 2010, september 22-25 2010. Malinska/Croatia. Programme and Abstracts. 92.

Az e feladat során kidolgozott kísérleti és elemzési módszereket a támogatási időtartam alatt szélesebb körben is sikeresen alkalmazni tudtuk és felhasználtuk más antimikrobiális peptidok és fehérjék illetve génjeik azonosításához és jellemzéséhez. Ezen eredményekből hazai

Virágh, et al. (2012) Isolation of thaumatin-like proteins from zygomycetous fungi. Clusiana 51(1) Supplement, 114-116. IF2012=0.000.

és nemzetközi konferencia anyagok születtek:

Virágh, M., et al. (2011) Structure efficacy relationship in *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* antibiotic peptide. Acta Microbiol. Immunol. Hung. 58 Supplement, 237-238. IF2011=0.787.

Virágh, M., et al. (2011) Isolation of thaumatin-like antimicrobial protein encoding genes in *Rhizopus* species. In: 2nd CEFSE workshop, Novi Sad, Serbia, 8-10 September 2011, Book of Abstracts, 82.

Virágh, M., et al. (2011) Construction of *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* structural mutant antimicrobial peptides. In: 2nd CEFSE workshop, Novi Sad, Serbia 8-10 September 2011, Book of Abstracts, 81.

2. Vizsgálataink során *nfap* ortológ gén jelenlétét további 4 *N. fischeri* és egy *Neosartorya spathulata* izolátum esetén mutattunk ki.

Neosartorya nemzetségbe tartozó, 12 fajt képviselő, 33 izolátumot vontunk be a vizsgálatainkba (*N. aurata*, *N. botucatensis*, *N. fennelliae*, *N. glabra*, *N. hiratsukae*, *N. pseudofischeri*, *N. quadricinta*, *N. spathulata*, *N. spinosa*, *N. stramenia*, *N. tatenoi*, *N. udagawae*). A 4 további *N. fischeri* izolátum (NRRL 4075, NRRL 4161, NRRL 4585, A-7223) által hordozott NFAP-t kódoló gén nukleotidsorrendje 100% megegyezést mutatott az NRRL 181 izolátumával. A *N. spathulata* SZMC 1380-ból izolált gén 99,5% hasonlóságot mutat az *nfap*-vel, eltérés mindössze a szignálszekvencia 14. aminosavát kódoló tripletben található (izoleucin-valin csere). A kitűzött céljaink között szereplő filogenetikai vizsgálatokat az NFAP homológok kis száma miatt nem tudtuk elvégezni, ezért vizsgáltuk az NFAP filogenetikai kapcsolatát, más tömlősgombából izolált, defenzin-szerű antifungális fehérjével. A filogenetikai vizsgálat eredményeként megállapítottuk, hogy az NFAP a PAF-tól és az *Aspergillus niger* által termelt ANAFP-tól elkülönülő AFP-rokon kládban helyezkedik el.

Vizsgálataink eredményeit az alábbi folyóiratcikkben

Galgóczy, L., et al. (2013) Antifungal peptides homologous to the *Penicillium chrysogenum* antifungal protein (PAF) are widespread among Fusaria. Peptides 39, 131-137. IF2012=2.522.

és hazai konferencián mutattuk be:

Galgóczy L., et al. (2012) Do the ascomycetous filamentous fungi have an "immune system" based on β -defensin-like molecules? Clusiana 51(1) Supplement, 35-36. IF2012=0.000.

3. Kidolgoztuk az NFAP termelésére alkalmas táptalajt és tenyésztési körülményeket, a fermentléből izoláltuk és azonosítottuk az NFAP-t.

Az NFAP antimikrobiális tulajdonságainak vizsgálatához elengedhetetlen volt a tiszta protein nagy mennyiségben történő előállítása. Az AFP-hez és a PAF-hoz hasonlóan az NFAP-t kódoló gén promóter régiójában is számos olyan szekvenciamotívumot mutattunk ki, amelyek külső környezeti hatásokra és eltérő stressz körülményekre termelődő fehérjék kötőhelyeit jelentik. Ezek figyelembevételével sikerült optimalizálnunk az NFAP termelődését elősegítő tápközeget és tenyésztési körülményeket. Mindezek ellenére az ioncserés kromatográfián alapuló fehérjetisztítási eljárás optimalizálása után is csak viszonylag kis mennyiségben sikerült a fehérjét előállítanunk (1250 ± 123 μ g egy liter fermentléből). Ez a mennyiség összevethető az AFP és a PAF tisztítása során elért, a szakirodalomban megtalálható adatokkal. A tisztított proteint N-terminális szekvenálással azonosítottuk.

Ennek a pontnak az eredményei az alábbi publikáció

Kovács, L., et al. (2011) Isolation and characterization of *Neosartorya fischeri* antifungal protein (NFAP). Peptides 32, 1724-1731. IF2011=2.434.

és nemzetközi konferenciaszereplés részét képezik:

Kovács, L., et al. (2010) Investigation of *Neosartorya fischeri* antimicrobial protein (NFAP). Power of Microbes in Industry and Environment 2010, september 22-25 2010. Malinska/Croatia. Programme and Abstracts. 92.

4. Meghatároztuk az NFAP antimikrobiális spektrumát, illetve aktivitását eltérő környezeti körülmények között.

Antimikrobiális érzékenységi tesztheink során kimutattuk, hogy az NFAP hatékonyan gátolta számos, humán patogénként is ismert fonalas tömlősgomba spóráinak csírázását és hifáinak növekedését, míg a legtöbb járomspórás gombaizolátum rezisztensnek mutatkozott az NFAP-vel szemben. Az NFAP hatására az érzékeny gombán létrejövő fenotipikus változások a szakirodalomban leírt rokon proteinekéhez (AFP, PAF) hasonlóak: torzult, elágazó hifanövekedés. Az NFAP a PAF-hoz és az AFP-hez hasonlóan nem mutatott antimikrobiális hatást a vizsgálatainkba bevont Gram-pozitív, Gram-negatív baktérium- és különböző élesztőgomba izolátumokkal szemben. Kimutattuk, hogy az NFAP antifungális hatását tág pH tartományon belül és 30 perces, 100 °C-on történő hőkezelés után is megőrizte, továbbá azt, hogy a protein nagymértékben ellenáll proteolitikus kezeléssel szemben.

In vitro antifungális érzékenységi tesztheink eredményét az alábbi folyóiratcikkekben

Kovács, L., et al. (2011) Isolation and characterization of *Neosartorya fischeri* antifungal protein (NFAP). Peptides 32, 1724-1731. IF2011=2.434.

Galgóczy, L., et al. (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., et al. (2013) 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 Expres. Purif. submitted, in major revision. IF2012=1.429.

és nemzetközi konferenciákon közzöltük:

Kovács, L., et al. (2010) Investigation of *Neosartorya fischeri* antimicrobial protein (NFAP). Power of Microbes in Industry and Environment 2010, september 22-25 2010. Malinska/Croatia. Programme and Abstracts. 92.

Kovács, L., et al. (2011) Antifungal activity of the *Neosartorya fischeri* antifungal protein (NFAP) against filamentous fungal isolates from clinical sources. Clin. Microbiol. Infect. 17(S4), 327. IF2011=4.540.

Az ennél a pontnál kidolgozott kísérleti módszereket (többek közt antifungális és antimikrobiális hatás és érzékenység tesztelése, klinikai és más gyakorlati jelentőséggel bíró gombatorzsek vizsgálata, fiziológiai és morfológiai tesztek) sikeresen alkalmaztuk a támogatási időtartam alatt egyéb antifungális proteinek és antimikrobiális hatású vegyületek, valamint klinikai jelentőségű gombacsoportok vizsgálatában. E kutatásokból az alábbi folyóiratcikkek,

Galgóczy, L., et al. (2011) In vitro antifungal activity of phenothiazines and their combination with amphotericin B against different *Candida* species. Mycoses 54, 737-743. IF2011=2.247.

Galgóczy, L., et al. (2011) In vitro antibacterial effect of a mumijo preparation from Mongolia. Afr. J. Microbiol. Res. 5, 3832-3835. IF2011=0.533.

Galgóczy, L., et al. (2012) In vitro interactions of amantadine hydrochloride, R(-)-deprenyl hydrochloride and valproic acid sodium salt with antifungal agents against filamentous fungal species causing central nervous system infection. Acta Biol. Hung. 63, 490-500. IF2012=0.504.

Galgóczy, L., et al. (2013) Antifungal peptides homologous to the *Penicillium chrysogenum* antifungal protein (PAF) are widespread among Fusaria. Peptides 39, 131-137. IF2012=2.522.

Homa, M., et al. (2013) *Fusarium* keratitis in South India: causative agents, their antifungal susceptibilities and a rapid identification method for the *Fusarium solani* species complex. Mycoses 56, 501-511. IF2012=1.278.

Váradi, Gy., et al. (2013) Synthesis of PAF, an antifungal protein from *P. chrysogenum* by native chemical ligation: Disulfide pattern and fold recovered in oxidative refolding. Chem. Eur. J., accepted, DOI: : 10.1002/chem.201301098. IF2012=5.831.

Nyilasi, I., et al. (2013) Susceptibility of clinically important dermatophytes against statins and different statin-antifungal combinations, Med. Mycol. DOI:10.3109/13693786.2013.828160. IF2012=1.979.

hazai

Virágh, M., et al. (2012) Isolation of thaumatin-like proteins from zygomycetous fungi. Clusiana 51(1) Supplement, 114-116. IF2012=0.000.

Galgóczy, L., et al. (2012) *Fusarium* keratitis in South India: identification, phylogeny, antifungal susceptibility and evaluation of a rapid identification method for the *Fusarium solani* species complex. Meeting of the Hungarian Society for Microbiology 2012, Keszthely, Hungary, Abstracts. 13.

és nemzetközi konferenciaszereplések anyagai készültek:

Virágh, M., et al. (2011) Structure efficacy relationship in *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* antibiotic peptide. Acta Microbiol. Immunol. Hung. 58 Supplement, 237-238. IF2011=0.787.

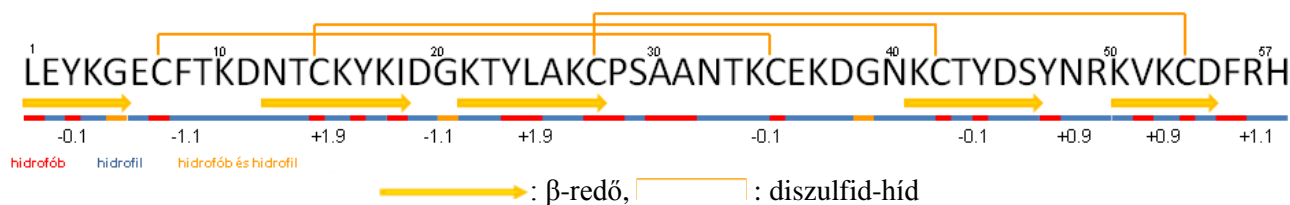
Virágh, M., et al. (2011) Construction of *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* structural mutant antimicrobial peptides. In: 2nd CEFSE workshop, Novi Sad, Serbia 8-10 September 2011, Book of Abstracts, 81.

- Galgóczy, L., et al (2012) Investigation the antibacterial effect of a Mongolian mumijo preparation. 14th DKMT Euroregional Conference on Environment and Health. Szeged, Hungary, 18-19 May 2012. CD-ROM.
- Shobana, C.S., et al. (2011) Molecular investigation of *Fusarium* isolates from keratomycosis. Clin. Microbiol. Infect. 17(S4), 463. IF2011=4.540.
- Homa, M., et al. (2012) Molecular investigation of South-Indian *Fusarium* isolates from keratomycosis and their susceptibilities to conventional antifungal agents. Mycoses 55 Supplement, 192. IF2012=1.278.
- Váradi, Gy., et al. (2012) Synthesis of PAF, an antifungal protein from *Penicillium chrysogenum* by native chemical ligation. 32nd European Peptide Society Symposium, Athen, Greece 2-7 September 2012. Proceedings.
- Galgóczy, L., et al. (2013) Isolation and characterization of a *Penicillium chrysogenum* antifungal protein homolog from *Fusarium polyphialidicum*. International Scientific Conference on Bacteriocins and Antimicrobial Peptides 2013 Kosice, Slovakia, Conference proceedings. 14-15.
- Guba, M., et al. (2013) Antidermatophytic activity of a *Bacillus mojavensis* strain isolated from mumijo a traditional Mongolian medicine. Conference abstracts of 4th CEFORM, accepted.
- Homa, M., et al. (2013) *Fusarium napiforme*, a new emerging pathogen from human keratomycosis. Conference abstracts of 4th CEFORM, accepted.

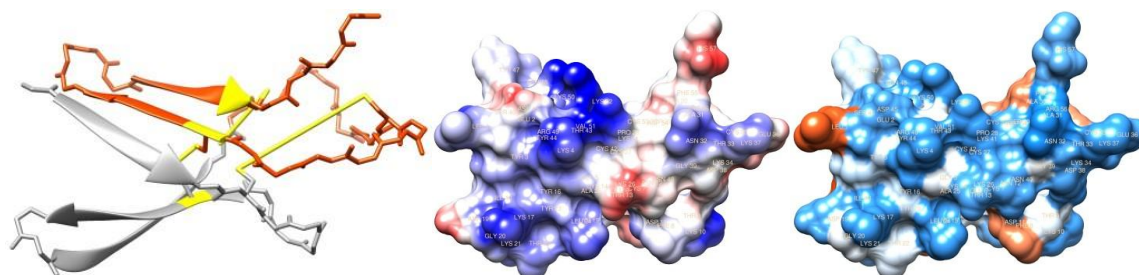
5. *In silico* módszerekkel meghatároztuk az NFAP lehetséges térszerkezetét, fizikai és kémiai tulajdonságait.

In silico vizsgálatainkhoz a szakirodalomban leírt, az interneten ingyenesen hozzáférhető szoftvereket használtunk [1-7]. Az érett NFAP egy 57 aminosavból felépülő, 2 doménből álló 6625,5 Da tömegű antifungális protein. Izoelektromos pontja 8,93, töltöttsége +5,0 (pH=7). *In silico* módszerekkel meghatározott harmadlagos szerkezete (Megbízhatóság a Ramachadran-plot alapján: 90,2%) hasonló a defenzinekéhez: 5 antiparellal állású β -redő, hurokrégiókkal összekapcsolva, összességében β -hordó szerkezetet mutatva. Az NFAP antimikrobiálisan aktív szerkezetét 3 diszulfid-híd stabilizálja, amik a 7-35; 14-42; 27-53 pozícióban lévő ciszteinek között jönnek létre (**1. Ábra**). Hasonlóan az AFP-hez és a PAF-hoz, az NFAP is amfipatikus felszínnel rendelkezik, amit pozitívan és negatívan töltött felületi régiók hoznak létre (**1. Ábra**), és szintén rendelkezik egy központi hidrofób maggal, amit a 3-as, 16-os, 23-as, 44-es pozícióban lévő tirozin molekulák és a 18-as pozícióban megtalálható izoleucin alkot.

A



B



1. Ábra. A: Az NFAP aminosavsorrendje, feltételezett másodlagos szerkezete; **B:** feltételezett harmadlagos szerkezete, elektrosztatikus és hidrofóbicitás felszíne (jobbról balra.) Az egyes aminosavak alatt a hidrofóbicitásuk, az egyes szakaszok alatt a töltöttségüket jeleztük.

Az NFAP a PAF-hoz hasonlóan nem rendelkezik oligonukleotid/oligoszacharid- és kitin-kötő doménnel, amik jelenlétét az AFP esetén bizonyították. Az NFAP *in silico* előre jelzett harmadlagos szerkezete különbözik az AFP és a PAF esetén kísérletesen meghatározottól: Az AFP és a PAF nem hordozza az NFAP estén kimutatható C-terminális „farok régiót” (F55-H57), illetve az NFAP kompakt β -hordót mutató szerkezetéből kinyúlik a T33-D38 alkotta hurokrégió (**2. Ábra**).

In silico vizsgálataink eredményeiről részben az alábbi folyóiratcikkekben,

- Kovács, L., et al. (2011) Isolation and characterization of *Neosartorya fischeri* antifungal protein (NFAP). Peptides 32, 1724-1731. IF2011=2.434

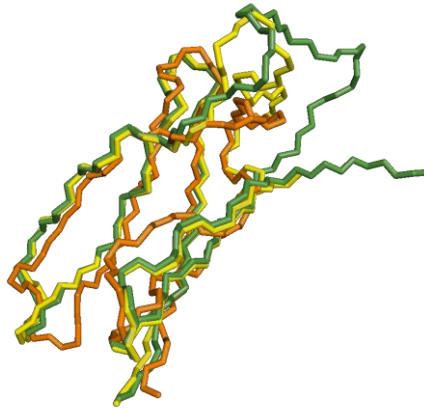
Galgóczy, L., et al. (2013) Potential applications of filamentous fungus derived β -defensin-like antifungal proteins in agriculture. Review on Agriculture and Rural Development. 2, Supplement CD of XII Wellmann International Scientific Conference. IF2012=0.000.

hazai

Galgóczy L., et al. (2012) Do the ascomycetous filamentous fungi have an “immune system” based on β -defensin-like molecules? Clusiana 51(1) Supplement, 35-36. IF2011=0.000.

és nemzetközi konferencián számoltunk be:

Kovács, L., et al. (2010) Investigation of *Neosartorya fischeri* antimicrobial protein (NFAP). Power of Microbes in Industry and Environment 2010, september 22-25 2010. Malinska/Croatia. Programme and Abstracts. 92.



2. Ábra. Az NFAP (zöld, *in silico*), a PAF (sárga, pdb: 2KCN) és az AFP (narancssárga, pdb: 1afp) harmadlagos szerkezetének összehasonlítása.

6. Sikeresen megtermeltettük az NFAP-t heterológ módon *Pichia pastoris*-ban és *Aspergillus nidulans*-ban.

Mivel a *N. fischeri* NRRL 181 izolátum, az NFAP termelése szempontjából figyelembe vehető stresszfaktorok alkalmazása ellenére is csak kis mennyiségben termeli meg a proteint, a későbbi esetleges gyakorlati célú felhasználáshoz szükséges lehet az NFAP nagy mennyiségben, gazdaságosan történő előállítás. Erre a különböző heterológ expressziós rendszerek alkalmasak lehetnek.

Az NFAP-t kódoló cDNS-t pPICZ α A vektorba klónoztuk, a konstruktot a *P. pastoris* KM71H törzsébe transzformáltuk, így ez a törzs metanollal történő indukció után alkalmassá vált az NFAP nagy mennyiségű termelésére. Az alkalmazott proteintisztítási eljárástól függően a *P. pastoris*-alapú expressziós rendszer hozama kb. 5-6-szorosa (5958 \pm 236 μ g egy liter fermentléből) volt a natív termelőének.

Az NFAP-t kódoló cDNS-t egy általunk létrehozott pAMA-alapú expressziós vektorba klónoztunk, a konstruktot az *A. nidulans* CS2902 törzsébe transzformáltuk, ami így konstitutívan megtermelte a proteint. Azáltal, hogy ez a gombatörzs kis mértékben, de érzékenynek bizonyult az NFAP-re, alkalmassá vált a protein hatására létrejövő élettanai változások és a protein hatásmódjának a tanulmányozására. Az *A. nidulans*-alapú konstitutív expressziós rendszer hozama kb. ugyanakkor (1680 \pm 223 μ g egy liter fermentléből) mint a natív termelő, ennek okát az alkalmazott expressziós rendszer „önmérgező” tulajdonságában kell keresni. A termelt heterológ NFAP-ot N-terminális szekvenálással és/vagy MALDI-TOF tömegspektrometriás analízissel azonosítottuk.

A *P. pastoris* KM71H és az *A. nidulans* CS2902 által termelt hNFAP hatékonyságát agardiffúziós lyuktesztrel és mikrodilúciós tesztrel vizsgáltuk. Kísérleteink alapján a hNFAP megőrizte antimikrobiális aktivitását a korábban NFAP-re érzékenynek bizonyult mikroorganizmusokkal szemben, az NFAP és a hNFAP-k növekedésgátló hatása között nem figyeltünk meg szignifikáns különbséget.

NMR spektroszkópiás vizsgálatok során megállapítottuk, hogy a *P. pastoris* által termelt hNFAP valószínűsíthetően felveszi a natív NFAP-re jellemző térszerkezetet.

Mindezen eredményeinkről az alábbi folyóiratcikkekben,

Galgóczy, L., et al. (2013) Investigation of the antimicrobial effect of *Neosartorya fischeri* antifungal protein (NFAP) after heterologous expression in *Aspergillus nidulans*. *Microbiol-SGM* 159, 411-419. IF2012=3.173.

Virágh, M., et al. (2013) 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 Expres. Purif. submitted, in major revision*. IF2012=1.429.

hazai

Kovács, L., et al. (2012) Examination of antimicrobial effect of *Neosartorya fischeri* antifungal protein (NFAP) on an NFAP-producing *Aspergillus nidulans* strain. *Clusiana* 51(1) Supplement, 102-104. IF2012=0.000.

Virágh, M., et al. (2012) Heterologous expression of *Neosartorya fischeri* antifungal protein (NFAP) in *Pichia pastoris*. Meeting of the Hungarian Society for Microbiology 2012, Keszthely, Hungary, Abstracts. 64-65.

és nemzetközi konferencián számoltunk be:

Virágh, M., et al. (2013) In vitro antifungal activity of *Neosartorya fischeri* antifungal protein (NFAP) after heterologous expression in *Pichia pastoris*. International Scientific Conference on Bacteriocins and Antimicrobial Peptides 2013 Kosice, Slovakia, Conference proceedings. 33.

7. Szerkezeti mutáns NFAP-k vizsgálatán keresztül kimutattuk, hogy a protein hidrofób magja fontos szerepet játszik a megfelelő, antifungálisan aktív térszerkezet kialakításában.

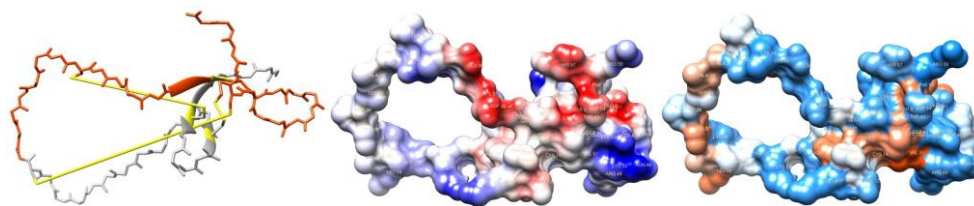
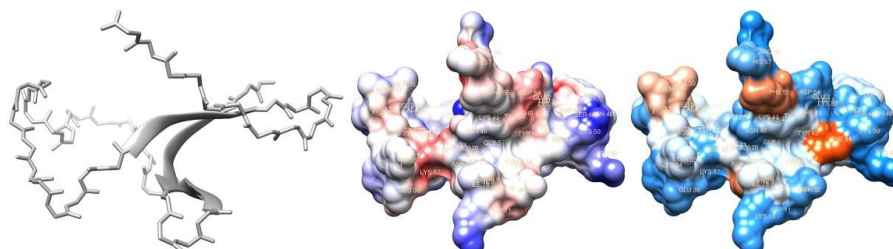
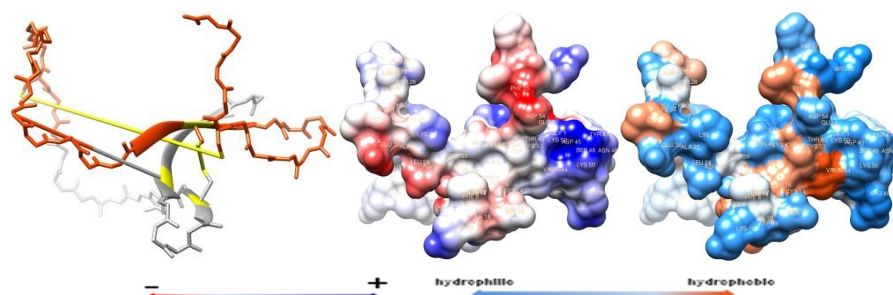
Előzetes, templát alapú, *in silico* szerkezetbecslés során kimutattuk, hogy a Y3, Y16, (Y23), Y44 és I18 által alkotott hidrofób mag elmutáltatása (NFAP Δ h) az NFAP kompakt harmadlagos szerkezetének a megszűnését eredményezi (Megbízhatóság a Ramachandran-plot alapján: 90,2%) (**3. Ábra**), így fontos szerepet játszhat az NFAP antifungális hatásának a kialakításában.

Mindezek után a hasonló szerkezetű antifungális proteineknél (AFP, PAF) is konzervált pozícióban elhelyezkedő, az NFAP hidrofób magját alkotó 3 tirozint (Y3, Y16, Y44), és egy izoleucint (I18) eltérő kombinációkban egy-egy alaninra cseréltük (Y44A; Y44,I18A; Y3,44,I18A; Y3,16,44,I18A) a QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagen) alkalmazásával. A létrehozott szerkezeti mutáns proteineket az előbbi pontban említett *P. pastoris* KM71H-alapú expressziós rendszerben termeltettük meg. A részlegesen tisztított fehérjék *in vitro* antimikrobiális aktivitását a 4. pontban említett agardiffúziós lyuk- és mikordilúciós teszttel vizsgáltuk. Előzetes vizsgálataink során az Y44A és Y44I18A mutánsok antifungális aktivitásában nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést az NFAP és *P. pastoris* által termelt hNFAP antimikrobiális hatásához képest, míg a három (Y3,44,I18A) és négy (Y3,16,44,I18A) hidrofób aminosav mutációját érintő hNFAP esetén már szignifikáns különbség volt kimutatható a protein által létrehozott növekedésgátlásban. *In vitro* antimikrobiális tesztjeink eredményének a megerősítése jelenleg is folyamatban van további, az NFAP-re korábban szenzitívnek és rezisztensnek mutatkozott gombaizolatok bevonásával.

Ez a megfigyelés igazolhatja az *in silico* vizsgálataink eredményét, vagyis azt hogy a hidrofób mag megléte elengedhetetlen az antifungálisan aktív térszerkezet kialakulásához. Erre a munkára alapozva későbbiekben tervezzük a mutáns hNFAP-k szerkezetének pontos meghatározását NMR spektroszkópiás módszerek segítségével. Ez a vizsgálat feltárja majd, hogy a hidrofób mag valóban szerepet játszik-e az NFAP térszerkezetének a kialakításában, illetve azt hogy a pontos térszerkezet valóban szükséges-e az antimikrobiális hatás kiváltásához?

In silico vizsgálataink során további javaslatokat tettünk arra, hogy az NFAP mely régiói, mely szerkezeti elemei játszhatnak még szerepet a megfelelő harmadlagos proteinszerkezet kialakításában. Feltételezéseink szerint a diszulfid-hidak (NFAP Δ C: C7,14,27,35,42,53Y) és az N-terminális β -redő (NFAP Δ N: L1G, Y3W, G5A) megszüntetése aminosavak cseréjével zavart okoz az NFAP megfelelő térszerkezetének a kialakításában (Megbízhatóság a Ramachandran-plot alapján: 94,1% és 86,5%). (**2. és 3. Ábra**). Ezekre az *in silico* eredményekre támaszkodva a későbbiekben szeretnénk megtermeltetni ezeket a mutáns proteineket, vizsgálni antimikrobiális hatékonyságukat és szerkezetüket.

Ebben a pontban összefoglalt eredményeinket egy elnyert posztdoktori ösztöndíj (lsd. 13. oldal) keretén belül további *in vitro* antifungális tesztekkel szeretnénk még megerősíteni, a vizsgálatba bevonni a diszulfid-híd és N-terminális β -redő mutáns NFAP-eket, majd NMR vizsgálatok után nemzetközi folyóiratcikkekben és konferencián közölni.

NFAP Δ hNFAP Δ CNFAP Δ N

3. Ábra. A hidrofób mag mutáns (NFAP Δ h), a cisztein mutáns (NFAP Δ C) és az N-terminális β -redő mutáns (NFAP Δ N) NFAP feltételezett harmadlagos szerkezete, elektrosztatikus és hidrofóbicitás felszíne (jobbról balra). Az ábrán az egyes mutánsok egyik legvalószínűbb, lehetséges szerkezete látható. Az ábrákon a lehetséges, de nem biztosan kialakuló diszulfid-hidakat jelöltük sárgával.

8. Megfigyeltük az NFAP hatására, a rá érzékeny gombában létrejövő élettani változásokat, illetve javaslatot tettünk az NFAP lehetséges hatásmechanizmusára.

Kísérleteink során kimutattuk, hogy az NFAP képes elektrosztatikusan kötödni az érzékeny gomba membránjához, azt szétrombolni és reaktív oxigéngyökök indukcióján keresztül apoptózist kiváltani. Bizonyítottuk, hogy az NFAP jelenlétében zavart szenved a kitin filamentumok, így a szenzitív gomba sejtfalának a megfelelő kiépülése, aminek következtében a sejtfal torzult morfológiát mutat. Ezt a megfigyelésünket később bizonyítottuk olyan *A. nidulans* törzs (*Actin GFP wA3; pyroA4; actin_GFP::pyrG (pyr G 89)*) vizsgálatával, amely az aktint zöld fluoreszcens proteinnel (GFP) fuzionáltatva termeli meg. A szakirodalomban leírtakhoz hasonlóan [9,10] a fejlődő hifában az aktin foltok egyenletesen elosztva találhatóak szubletális koncentrációjú (25 μ g/ml) NFAP jelenlétében (**4. Ábra B**), nem pedig a csúcsi részre lokalizálódva, mint a kezeletlen minta esetében (**4. Ábra A**). Mindez jelzi, hogy az érzékeny gombában az NFAP hatására az aktin polarizációja és csúcsi lokalizációja, ami szükséges a kitin tartalmú sejtfal hifacsúcson történő kiépüléséhez zavart szenved. Ennek következtében az NFAP-érzékeny gombában a hifa polarizált növekedése szintén zavart szenved vagy megszűnik az NFAP alkalmazott koncentrációjától függően. Ezt a korábbi fénymikroszkópos morfológiai megfigyeléseink is alátámasztják, mely szerint az NFAP hatására többszörösen elágazó, rövid, görbült hifák jönnek létre.

FUN-1 festéssel (Life-technologies, Invitrogen) bizonyítottuk, hogy a PAF esetén, a szakirodalomban leírtakhoz hasonlóan [11] a szubletális koncentrációjú (25 μ g/ml) NFAP hatására is csökken az érzékeny gomba metabolikus aktivitása, majd megszűnik (**5. Ábra**).

Ezeknek az eredményeinknek egy részét az alábbi folyóiratcikkekben,

Kovács, L., et al. (2011) Isolation and characterization of *Neosartorya fischeri* antifungal protein (NFAP). Peptides 32, 1724-1731. IF2011=2.434.

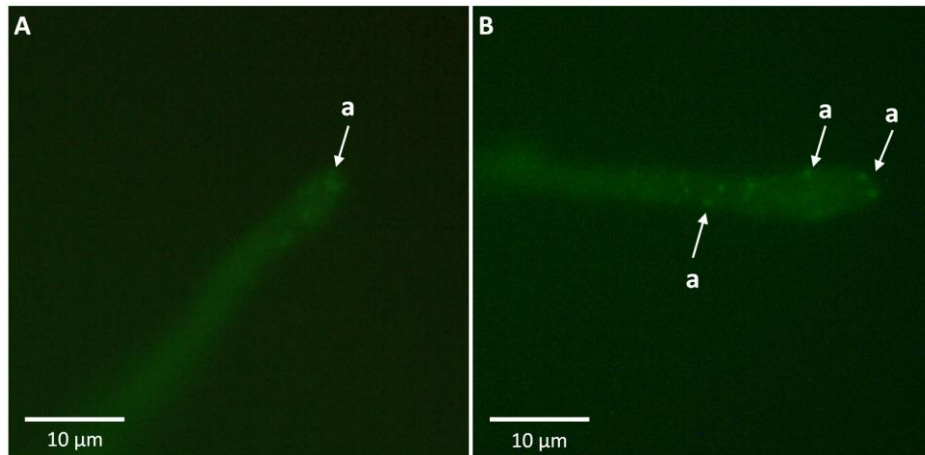
Galgóczy, L., et al. (2013) Investigation of the antimicrobial effect of *Neosartorya fischeri* antifungal protein (NFAP) after heterologous expression in *Aspergillus nidulans*. *Microbiol-SGM* 159, 411-419. IF2012=3.173.

nemzetközi

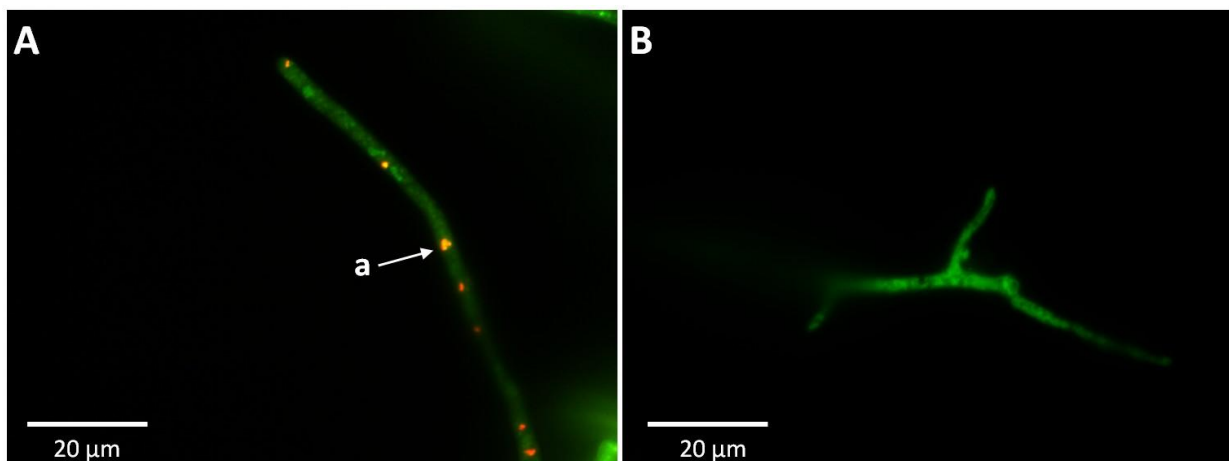
Kovács, L., et al. (2012) Investigation of antimicrobial effect of *Neosartorya fischeri* antifungal protein (NFAP). 11th European Conference of Fungal Genetics. Marburg, Germany, March 30-April 2 2012. Meeting Abstracts, 274.

és hazai konferencián közöltük:

Kovács, L., et al. (2012) Examination of antimicrobial effect of *Neosartorya fischeri* antifungal protein (NFAP) on an NFAP-producing *Aspergillus nidulans* strain. *Clusiana* 51(1) Supplement, 102-104. IF2012=0.000.



4. Ábra. Az aktin filamentumok elhelyezkedése az *Aspergillus nidulans* aktin-GFP törzs fejlődő hifáiban. **A:** kezeletlen, **B:** 25 µg/ml NFAP kezelt minta, **a:** aktin filamentumok lokalizációja.



5. Ábra. Az *Aspergillus nidulans* FGSCA4 metabolikus aktivitásának vizsgálata NFAP kezelés hatására. **A:** kezeletlen, **B:** 25 µg/ml NFAP kezelt minta. Az intravakuoláris vörös fluoreszcencia (**a**) a metabolikus aktivitást jelzi.

Habár a projekt kezdetén az NFAP pontos hatásmódjának a felderítésére DNS chip alapú és protoplaszt regenerációs kísérleteket terveztünk az időközben megjelent, hasonló témát vizsgáló publikációk [9,10,12] megjelenése után célszerűnek találtuk, hogy átgondoljuk kísérleti terveinket. A három időközben megjelent publikáció az AFP és a PAF lehetséges hatásmódjáról számol be különböző jelátviteli utakban sérült, mutáns *A. nidulans* törzsek tanulmányozásán keresztül. Azért hogy az NFAP hatásmódjának tanulmányozása során elért eredményeink összehasonlíthatóak legyenek a szakirodalomban a két rokon protein esetén leírtakkal, az előbb említett cikkekben használt kísérleti rendszerek és módszerek alkalmazása mellett döntöttünk. Az *A. nidulans* mutánsokat a pályázat 3. évére sikerült beszereznünk.

Munkánk során megállapítottuk, hogy a protein kináz A (PKA) deléciós *A. nidulans* törzs ($\Delta pkaA$: *papaA1*; *yA2*; $\Delta pkaA$::*argB*; $\Delta argB$::*trpC*; *trpC801*; *veA1*) kevésbé volt érzékeny az NFAP-re, mint a vad típusú szülői törzse (RKIS 1: *papaA1*; *yA2*). Ez jelezi azt, hogy a PAF-hoz hasonlóan [9] az NFAP is képes G-protein közvetítette jelátviteli úton a cAMP/PKA szignalizációs

kaszkád aktiválására, ami által megzavarja az aktin polimerizációt, illetve apoptózist indukál. A G-protein közvetítette szignalizációt az *A. nidulans* FGSC1035 (*yA2 fadAG203R*) G-protein mutáns törzsnek a szülői törzséhez (FGSC116: *yA2*) képest csökkent NFAP-érzékenységgel is bizonyítottunk a szakirodalomban leírt kísérleti rendszer alkalmazásával [13]. Az NFAP feltehetően az AFP-hez és a PAF-hoz hasonlóan az antifungális hatását szintén képes a stressz indukálta, a sejtfal újraépítésében szerepet játszó protein kináz C/mitogén aktiválta protein kináz (PKC/MPK) szignalizációs kaszkád PKC tagjának gátlásán keresztül is kifejteni, amit a PKC represszált *A. nidulans* törzs (*alcA-PkcA: wA2; pyroA4; pyrG89::pyr4alcA(p)::pkcAΔp*) NFAP-hiperszenzitivitása jelez a szülői törzséhez képest (R153: *wA2; pyroA4*) [9,10]. A PAF és az AFP esetén megfigyeléssel ellentétben (miszerint a PAF a PKC/MPK szignalizációs kaszkád MPK tagját szintén gátolja) [9,10] a PKC/MPK szignalizációs kaszkád MPK tagjában deléciós *A. nidulans* mutáns (*ΔmpkA*) rezisztensnek mutatkozott az NFAP-vel szemben a szülői törzséhez képest (GR5: *pyrG89; wA3; pyroA4*). Ez a megfigyelés egy, az MPK hatására aktiválódó ismeretlen célpontot feltételez, amin keresztül az NFAP képes kiváltani antifungális hatását (**6. Ábra**). Ennek a célpontnak a felderítésére további kísérletek szükségesek. Az NFAP antifungális hatása RhoA (GTPáz) függetlennek mutatkozott a PAF-hoz és az AFP-hez hasonlóan [9,10], amit az *A. nidulans* RhoA^{G14V} (A773 + pGG2 (*rhoA* G14) and pRG3AMA1 co-transformation plasmid) mutánsnak a szülői törzséhez (GR5: *pyrG89; wA3; pyroA4*) hasonló NFAP-érzékenységgel bizonyítottunk. Mikrodilúciós növekedési tesztheink eredményeit a **1. Táblázat** foglalja össze. Mindezek a megfigyelések alátámasztják az előző bekezdésben említett morfológiai és élettani változásokat.

Összefoglalva megállapíthatjuk, hogy az NFAP hatásmechanizmusa hasonlóságot mutat az AFP és a PAF esetén leírtakkal, de azoktól különbözően valószínűleg egy MPKA aktiválta eddig ismeretlen célpontja is van (**6. Ábra**).

Eredményeinket az ismeretlen célpont felderítése után kívánjuk folyóiratcikkben és konferenciakiadványban közölni. Ezeket a céljainkat egy elnyert posztdoktori ösztöndíj (lsd. 13. oldal) keretén belül kívánjuk a továbbiakban megvalósítani.

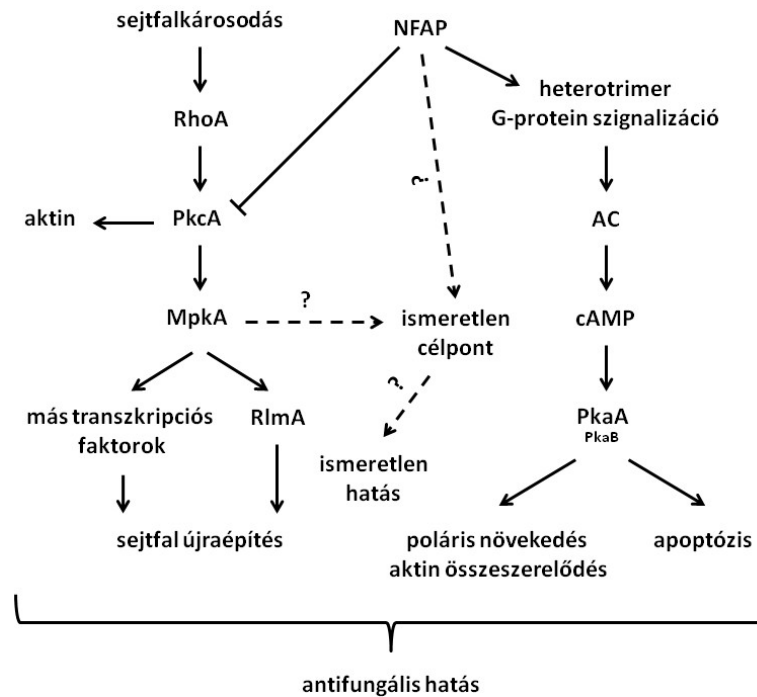
Az NFAP hatásmechanizmusáról szerzett eddigi ismereteink egy nemzetközi konferencia előadás anyagát képezi:

Galgóczy, L., et al. (2013) NFAP: A novel cysteine-rich antifungal protein from *Neosartorya fischeri*. Conference abstracts of 4th CEFORM, *accepted*.

1. Táblázat. Az eltérő koncentrációjú NFAP hatása az *Aspergillus nidulans* jelátviteli mutánsok növekedésére 30 °C-on (vagy törzstől függően 37 °C-on), 48 óra inkubáció után.

NFAP (μg/ml) / Törzs	200 μg/ml	100 μg/ml	50 μg/ml	Törzs típus
RhoA ^{G14V}	48±15,2% ^{ns}	57±4,5% ^{ns}	86±12,5% ^{ns}	mutáns
<i>ΔmpkA</i>	100% ^{***}	100% ^{***}	100% ^{**}	mutáns
GR5	47±7,5%	58±5,4%	83±11,9%	szülői
<i>alcA-PkcA</i>	48±10,6% ^{***}	57±0,6% ^{***}	64±12,5% ^{***}	mutáns
R153	72±2,8%	83±4,4%	100%	szülői
<i>ΔpkaA</i>	56±6,1% ^{***}	69±5,3% ^{***}	83±11,5% ^{**}	mutáns
RKIS 1	40±2,7%	48±1,6%	66±4,0%	szülői
FGSC 1035	52±1,9% [*]	78±0,2% ^{***}	100% ^{***}	mutáns
FGSC 116	42±6,7%	59±1,9%	75±2,3%	szülői

A növekedés mértékét a kezeletlen kontrollhoz (100%) viszonyítva adtuk meg. Jelmagyarázat: ***: p<0.0001, **: p<0.005, *: p<0.05, ^{ns}: nincs szignifikáns különbség.



6. Ábra. Az NFAP lehetséges hatásmechanizmusa Binder et al. (2010) alapján [9]. Rövidítések: AC, adenilát cikláz; cAMP, ciklikus adenzin-monofoszfát; Pka, protein kináz A; Pkc protein kináz C; Mpk, mitogén aktiválta protein kináz.

9. Az NFAP szerepet játszik a tápanyagokért és az élőhelyért folytatott versenyben a hasonló ökológiai niche-t elfoglaló gombafajokkal szemben.

Munkánk során előállítottuk a *N. fischeri* NRRL 181 NFAP-t kódoló génben deléciós mutánsát ($\Delta nfap$) [14]. Vizsgáltuk a vad típusú és deléciós mutáns törzsek növekedését, továbbá az említett törzsek *in vitro* antagonizmus képességét az adott proteinre érzékeny és ellenálló, hasonló ökológiai niche-t elfoglaló gombaizolátumokkal szemben komplett és minimál táptalajon. A minimál táptalaj csökkentett, nehezen hozzáférhető tápanyagtartalma stresszfaktort jelent a gomba számára, ami korábbi ismereteink alapján elősegíti és fokozza az NFAP expresszióját hasonlóan a többi fonalgomba defenzin-szerű proteinnél megfigyelthez [15]. A vizsgált *Neosartorya* törzsek *in vitro* antagonizmus képességét az *in vitro* antagonizmus index-szel (IVAI) jellemeztük [16].

Eredményeink összefoglalásaként megállapítottuk, hogy a vad típushoz képest a $\Delta nfap$ mutáns törzs szignifikánsan lassabb mértékű növekedést mutatott MM táptalajon. Ez a megfigyelés az NFAP-nek a gomba növekedésében betöltött szerepére enged következtetni stresszkörülmények között (**2. Táblázat**).

2. Táblázat. A vad és a $\Delta nfap$ mutáns *Neosartorya fischeri* törzsek növekedése komplett és minimál táptalajon 25 °C-on, 10 nap inkubáció után.

Idő	Komplett táptalaj		Minimál táptalaj	
	vad telepátmérő (mm)	$\Delta nfap$ telepátmérő (mm)	vad telepátmérő (mm)	$\Delta nfap$ telepátmérő (mm)
24h	13,3±0,6	10±0,0 ^{**}	11,3±0,6	11,7±0,6 ^{ns}
48h	24,3±0,6	20,3±0,6 ^{**}	19±1,0	18,3±0,6 ^{ns}
72h	35,7±0,6	32,0±1,7 [*]	27,7±0,6	25,3±0,6 [*]
96h	43,7±0,6	41,7±1,5 ^{ns}	35,7±2,1	32,3±1,2 [*]
120h	52±1,0	50,3±0,6 ^{ns}	44,7±1,2	39,7±0,6 [*]
144h	64,3±0,6	62,3±0,6 ^{ns}	56±1,0	42,7±0,6 ^{***}
168h	71,7±0,6	71,0±1,0 ^{ns}	63±2,0	48,0±1,0 ^{***}

Jelmagyarázat: ^{***}: p<0,0001, ^{**}: p<0,005, ^{*}: p<0,05, ^{ns}: nincs szignifikáns különbség.

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. Eredményeinket a **3. Táblázatban** foglaltuk össze. 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.

Eredményeink összevethetők a szakirodalomban megtalálható hasonló kísérletek eredményeivel: AFP-t termelő *A. giganteus* izolátummal végzett *in vitro* antagonizmus kísérletek során kimutatták, hogy egy hasonló ökológiai niche-t elfoglaló fonalgomba jelenléte fokozza az *afp* gén expresszióját, ezáltal a környezetben megnőtt AFP mennyisége előnyt biztosít az *A. giganteus* számára a hasonló élőhelyért folytatott küzdelemben amennyiben a kompetitor gomba érzékeny az antifungális proteinnel szemben [15]. A mi munkákhoz hasonlóan ebben a kísérleti rendszerben is az alkalmazott táptalaj összetétele befolyásolta az *A. giganteus* antagonista képességét [32]. A fonalgombák által termelt defenzin-szerű antifungális proteinek további biológiai szerepének vizsgálata során időközben megfigyelték, hogy a mitospóra fejlődéséért felelős központi szabályozó gének expressziójának modulálásával a PAF fokozza a termelő gomba aszexuális szaporodást stresszkörülmények között. Ezt a hipotézist a *P. chrysogenum* esetében sikerült alátámasztani egy *pac* deléciós törzs létrehozásával, amelyben a mitospóra kialakulásának szignifikáns csökkenése volt megfigyelhető [16], következtetésképpen a PAF a konidiogenezis beindításával, annak intenzitásának a növelésével elősegíti a gomba túlélését stresszkörülmények között amit akár egy másik gomba jelenléte is kiválthat. A *N. fischeri* által termelt NFAP aszexuális és szexuális szaporodásban való szerepét máig nem vizsgálták. A későbbiekben ezt tanulmányozni kívánjuk egy elnyert posztdoktori ösztöndíj (lsd. 13. oldal) keretében, majd a fenti eredményeinkkel együtt folyóiratcikkekben, konferenciakiadványban publikálni.

Ezen eredményeink egy részét hazai konferencián már bemutattuk

Galgóczy L., et al. (2012) Do the ascomycetous filamentous fungi have an "immune system" based on β -defensin-like molecules? *Clusiana* 51(1) Supplement, 35-36. IF2012=0.000.

és egy nemzetközi konferenciaszereplés anyagát képezi:

Galgóczy, L., et al. (2013) NFAP: A novel cysteine-rich antifungal protein from *Neosartorya fischeri*. Conference abstracts of 4th CEFORM, *accepted*.

A fenti pontokat összefoglalva elmondható, hogy a kitűzött célokat megvalósítottuk, a kutatási program fő eredményeként:

- **izoláltuk az NFAP-t**
- **meghatároztuk az NFAP antimikrobiális spektrumát és antifungális tulajdonságait eltérő környezeti körülmények között**
- ***in silico* jellemeztük az NFAP szerkezetét**
- **sikeresen megtermeltettük az NFAP-t egy élesztő- és egy fonalgomba-alapú heterológ expressziós rendszerben**
- **megfigyeltük, hogy az NFAP hidrofób magjának szerepe lehet az antifungálisan aktív szerkezet kialakításában**
- **megfigyeltük az NFAP hatására a szenzitív gombán bekövetkező morfológiai és élettani változásokat**
- **javaslatot tettünk az NFAP hatásmechanizmusára és egyik biológiai szerepére.**

3. Táblázat. A vad típusú és a $\Delta n\text{fap}$ mutáns *Neosartorya fischeri* *in vitro* antagonizmus képességének vizsgálata járomspórás és tömlősgomba izolátumokkal szemben komplett és minimál táptalajon 25°C-on, 10 nap inkubáció után.

Faj	Komplett táptalaj		Minimál táptalaj	
	vad (IVAI)	$\Delta n\text{fap}$ (IVAI)	vad (IVAI)	$\Delta n\text{fap}$ (IVAI)
Járomspórás gombák				
<i>Actinomucor elegans</i> (NRRL 1706)	37,81±1,92 ⁺	32,64±0,24 ^{+,**}	47,34±3,11 ⁺	20,55±0,13 ^{+,***}
<i>Backusella circina</i> (NRRL 3293)	23,26±1,41 ⁺	22,24±2,36 ^{+,ns}	27,66±1,73 ⁺	26,81±2,53 ^{+,ns}
<i>Gilbertella persicaria</i> (IMI 101638(+))	0,00±0,00 ⁻	0,00±0,00 ^{-,ns}	0,00±0,00 ⁰	0,00±0,00 ^{0,ns}
<i>Mortierella ramanniana</i> (NRRL 5844)	55,22±3,72 ⁻	50,64±0,53 ^{-,*}	41,02±4,87 ⁰	37,72±2,01 ^{0,ns}
<i>Mortierella nantahalensis</i> (NRRL 5842)	35,82±2,62 ⁺	29,96±2,53 ^{+,*}	51,42±2,07 ⁺	49,86±3,88 ^{+,ns}
<i>Mucor rammanianus</i> (WRL CN(M)304)	71,43±0,59 ⁻	66,27±2,28 ^{-,**}	41,02±9,38 ⁺	27,97±4,42 ^{+,*}
<i>Mycotypha africana</i> (NRRL 2978)	81,24±0,63 ⁻	79,05±0,56 ^{-,ns}	95,29±0,44 ⁻	96,35±0,33 ^{-,ns}
<i>Rhizomucor miehei</i> (CBS 360.92)	47,68±1,69 ⁰	39,71±1,88 ^{0,***}	44,72±5,23 ⁺	37,75±2,51 ^{+,*}
<i>Rhizopus oryzae</i> (CBS 146.90)	0,00±0,00 ⁻	0,00±0,00 ^{-,ns}	0,00±0,00 ⁻	0,00±0,00 ^{-,ns}
<i>Syncephalastrum racemosum</i> (SZMC 11084)	50,36±1,53 ⁰	43,69±2,47 ^{0,***}	39,30±0,39 ⁰	37,72±5,20 ^{0,ns}
Tömlősgombák				
<i>Aspergillus carbonarius</i> (SZMC 2066)	43,54±0,66 ⁰	44,63±1,13 ^{0,ns}	49,52±0,76 ⁰	46,10±2,84 ^{0,ns}
<i>Aspergillus giganteus</i> (IMI 343707)	50,80±1,62 ⁰	46,76±1,52 ^{0,ns}	42,23±7,07 ⁺	40,14±0,88 ^{+,ns}
<i>Aspergillus japonicus</i> (SZMC 2157)	43,63±0,26 ⁰	46,00±0,56 ^{0,ns}	38,03±1,72 ⁰	36,78±2,77 ^{0,ns}
<i>Aspergillus niger</i> (SZMC 2608)	52,88±2,00 ⁰	45,56±2,79 ^{0,ns}	44,29±4,62 ⁰	43,60±1,18 ^{0,ns}
<i>Aspergillus terreus</i> (SZMC 2414)	66,55±1,19 ⁻	63,67±2,97 ^{-,ns}	68,73±2,32 ⁻	64,94±3,75 ^{-,ns}
<i>Fusarium cerealis</i> (SZMC 11048)	45,45±2,31 ⁺	40,64±2,77 ^{+,*}	45,33±1,76 ⁺	29,84±4,68 ^{+,***}
<i>Fusarium graminearum</i> (SZMC 11054)	37,59±2,21 ⁺	36,50±1,12 ^{+,ns}	28,96±1,45 ⁺	32,15±3,98 ^{+,ns}
<i>Fusarium poae</i> (SZMC 11045)	36,31±2,67 ⁺	35,64±1,26 ^{+,ns}	29,40±0,88 ⁺	26,25±2,79 ^{+,ns}
<i>Fusarium polyphialidicum</i> (SZMC 11042)	40,92±2,18 ⁺	38,68±2,02 ^{+,ns}	32,20±1,34 ⁺	33,92±2,44 ^{+,ns}
<i>Penicillium chrysogenum</i> (IMI 392 788)	67,98±3,12 ⁰	67,08±2,75 ^{0,ns}	71,89±1,66 ⁰	72,38±5,35 ^{0,ns}
<i>Trichoderma longibrachiatum</i> (UAMH 7955)	9,72±0,74 ⁻	5,23±0,41 ^{-,**}	12,21±1,14 ⁻	9,47±1,36 ^{-,ns}

Jelmagyarázat: -: negatív hatás; +: pozitív hatás; 0: semleges hatás; ***: p<0,0001, **: p<0,005, *: p<0,05, ns: nincs szignifikáns különbség. IVAI: *in vitro* antagonizmus index.

Pozitív hatás (+): A *N. fischeri* visszaszorítja a másik gomba növekedését, közöttük gátlási zóna alakul ki, a másik gombaizolátum telepszélénél homorú morfológiájú növekedés tapasztalható vagy a *N. fischeri* ránő. Negatív hatás (-): A *N. fischeri* növekedése gátlódik, telepszélénél homorú morfológiájú növekedés tapasztalható, vagy a másik izolátum ránő. Semleges hatás (0): Nincs kölcsönhatás a két gombaizolátum között, nem alakul ki gátlási zóna, a telepek összeérnek, egymással szembe eső telepszéleik egyenesek.

Noha a kutatási szerződésben vállalt feladatokat teljesítettük, amelyet már az eddig megjelent tudományos közlemények és konferenciaszereplések is jól tükröznek, az eredmények egy része (pontos hatásmechanizmus, másik biológiai szerep, szerkezet-hatás összefüggés) még további vizsgálatokat igényel, így azok publikálása a következő 1-2 évre áthúzódik. Ezeket az eredményeket is, az eddigiekhez hasonlóan, rangos nemzetközi folyóiratokban és konferenciákon kívánjuk közzétenni.

Ugyanakkor fontos megemlíteni, hogy az OTKA pályázat keretében megvalósított projekt új kutatási irányok kiindulópontjává is szolgált. Ezek jelenleg három irányba haladnak, az egyik az NFAP pontos celluláris célpontjának a felderítése egy érzékeny mikroorganizmusban; a másik az NFAP és tervezett mutánsok szerkezetének a meghatározása NMR spektroszkópiás eljárásokkal, így a pontos szerkezet-hatás összefüggés feltárása; a harmadik pedig az NFAP-nek a gomba szexuális és aszexuális szaporodásában betöltött szerepének a vizsgálata. Ezekhez a munkákhoz a projekt ideje alatt sikeres együttműködést alakítottunk ki prof. Batta Gyula (DE, TEK-TTK Szerves Kémiai Tanszék, Debrecen), Dr. Maróti Gergő (SZBK, Biokémiai Intézet, Szeged) kutatócsoportjával és tovább mélyítettük már meglévő szakmai kapcsolatunkat Dr. Florentine Marx (Innsbruck Medical University, Division of Molecular Biology, Innsbruck, Austria) laboratóriumával.

A projekt megvalósításához kapcsolódóan az ösztöndíjas kutató vezetésével egy MSc diplomamunka és három BSc szakdolgozat született, illetve két PhD (Kovács Laura és Virágh Máté) és egy további BSc dolgozat (Szabó Anna) elkészítése folyamatban van.

Riba Adrienn (BSc). A *Neosartorya fischeri* antimikrobiális protein *in vitro* antifungális hatása néhány klinikai szempontból jelentős fonalaszombá izolátummal szemben. Szakdolgozat. SZTE, TTIK, Mikrobiológiai Tanszék, 2011.

Fekete Bernadett (BSc). Kationonk hatása a *Neosartorya fischeri* antimikrobiális protein aktivitására. Szakdolgozat. SZTE, TTIK, Mikrobiológiai Tanszék, 2013.

Vörös Dóra (BSc). Heterológ *Neosartorya fischeri* antifungális protein (NFAP) hatása klinikai szempontból jelentős fonalaszombá izolátumokkal szemben. Szakdolgozat. SZTE, TTIK, Mikrobiológiai Tanszék, 2013.

Tóth Liliána (MSc). Az NFAP hatásmechanizmusának és biológiai szerepének vizsgálata. Diplomamunka. SZTE, TTIK, Mikrobiológiai Tanszék, 2013.

A támogatási időtartam alatt kidolgozott kísérleti módszereket sikeresen alkalmaztuk a pályázat témájához szorosan nem illeszkedő, az ösztöndíjas irányítása alatt készült két MSc diplomamunkához és négy BSc szakdolgozathoz.

Tóth Liliána (BSc). Központi idegrendszeri szerek antimikotikumokkal való kölcsönhatásának vizsgálata *Aspergillus* fajok növekedésgátlására *in vitro*. Szakdolgozat. SZTE, TTIK, Mikrobiológiai Tanszék, 2010.

Guba Melinda (BSc). A mumio *in vitro* antibakteriális hatásának vizsgálata. Szakdolgozat. SZTE, TTIK, Mikrobiológiai Tanszék, 2011.

Homa Mónika (MSc). Keratitist okozó humán patogén *Fusarium* fajok molekuláris vizsgálata. Diplomamunka. SZTE, TTIK, Mikrobiológiai Tanszék, 2011.

Vass Veronika (BSc). Thaumatin-szerű fehérjék vizsgálata járomspórás gombákban. Szakdolgozat. SZTE, TTIK, Mikrobiológiai Tanszék, 2012.

Dunai Anett Ildikó (BSc). Keratitist okozó humán patogén *Fusarium* fajok antibiotikum érzékenység vizsgálata. Szakdolgozat. SZTE, TTIK, Mikrobiológiai Tanszék, 2012.

Csonka Dániel (MSc). *Rhizomucor pusillus* által termelt thaumatin-szerű fehérje vizsgálata. Diplomamunka. SZTE, TTIK, Mikrobiológiai Tanszék, 2013.

Jelen kutatás számos pontja kiindulási alapként szolgált az NFAP további tanulmányozását megcélzó posztdoktori ösztöndíj elnyeréséhez (A *Neosartorya* fonalaszombá nemzetség által termelt β -defenzinszerű antifungális proteinek molekuláris biológiájának és biológiai szerepének vizsgálata; témavezető: Dr. Galgóczy László, Magyary Zoltán Posztdoktori Ösztöndíj a Konvergencia Régiókban, A2-MZPD-12-0029, 2013. 09. 01.-2014. 12. 31., TÁMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001 Nemzeti Kiválósági Program). A támogatási időszak alatt a vezető kutató témavezetésével egy a témához szorosan kapcsolódó hallgatói ösztöndíj is elnyerésre került (A *Neosartorya fischeri* antifungális protein (NFAP) biológiai szerepének a vizsgálata; ösztöndíjas: Tóth Liliána, Eötvös Loránd Hallgatói Ösztöndíj, A2-ELMH-12-0098, 2013. 03. 01.-2014. 01. 01., TÁMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001 Nemzeti Kiválóság Program).

Hivatkozások

- [1] Artimo P, et al. ExPASy: SIB bioinformatics resource portal. *Nucleic Acids Res* 2012;40(W1):W597-W603.
- [2] Ceroni A, et al. DISULFIND: a disulfide bonding state and cysteine connectivity prediction server. *Nucleic Acids Res* 2006;34:W177-W181.
- [3] Cheng J, et al. SCRATCH: a protein structure and structural feature prediction server. *Nucleic Acids Res* 2005;33:W72-W76.
- [4] Sali A, et al. Evaluation of comparative protein modelling by MODELLER. *Proteins* 1995;23:318-326.
- [5] Pettersen EF, et al. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* 2004;25:1605-1612.
- [6] Guex N and Peitsch MC. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 1997;18:2714-2723.
- [7] DeLano W. PyMOL: An open-source molecular graphics tool. *CCP4 Newsletter On Protein Crystallography* 2002;40:44-53.
- [8] Laskowski RA, et al. AQUA and PROCHECK-NMR: programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. *J Biomol NMR* 1996;8:477-486.
- [9] Binder U, et al. The antifungal protein PAF interferes with PKC/MPK and cAMP/PKA signalling of *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* 2010;75:294-307.
- [10] Binder U, et al. The *Aspergillus giganteus* antifungal protein AFPNN₅₃₅₃ activates the cell wall integrity pathway and perturbs calcium homeostasis. *BMC Microbiol* 2011;11:209.
- [11] Kaiserer L, et al. Characterization of the *Penicillium chrysogenum* antifungal protein PAF. *Arch Microbiol* 2003;180:204-210.
- [12] Hegedus N, et al. The small molecular mass antifungal protein of *Penicillium chrysogenum*--a mechanism of action oriented review. *J Basic Microbiol* 2011;51:561-571.
- [13] Leiter E, et al. Antifungal protein PAF severely affects the integrity of the plasma membrane of *Aspergillus nidulans* and induces an apoptosis-like phenotype. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:2445-2453.
- [14] Tóth Liliána. Az NFAP hatásmechanizmusának és biológiai szerepének vizsgálata. Diplomamunka. SZTE, TTIK, Mikrobiológiai Tanszék, 2013.
- [15] Meyer V and Stahl U. The influence of co-cultivation on expression of the antifungal protein in *Aspergillus giganteus*. *J Basic Microbiol* 2003;43:68-74.
- [16] Szekeres A, et al. A novel, image analysis-based method for the evaluation of in vitro antagonism. *J Microbiol Methods* 2006;65:619-622.

Szeged, 2013. szeptember 30.

Dr. Galgóczy László
témavezető
tudományos munkatárs
SZTE TTIK Mikrobiológiai Tsz.