

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

Új gombaellenes stratégiák: *Neosartorya* (*Aspergillus*) *fischeri*-eredetű antifungális fehérjék és alkalmazási lehetőségeik

Galgóczi László Norbert

(Tudományos közleményekben: Galgóczy László)



Szegedi Tudományegyetem

Természettudományi és Informatikai Kar
Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszék

Szeged

2024

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	2
2. Célkitűzések	4
3. Az eredmények összefoglalása	5
3.1. <i>Neosartorya fischeri</i> antifungális proteinek általános jellemzése, termelése és izolálása	5
3.2. A <i>Neosartorya fischeri</i> antifungális proteinek spektruma, kölcsönhatása antifungális szerekkel és egymással	6
3.3. A <i>Neosartorya fischeri</i> antifungális proteinek hatásmódja	7
3.4. A <i>Neosartorya fischeri</i> antifungális proteinek szerkezete és hatásmódja közötti összefüggés	8
3.5. <i>Neosartorya fischeri</i> antifungális proteinek peptid-származékai	12
3.6. A <i>Neosartorya fischeri</i> antifungális proteinek és γ -core peptid-származékok toxicitása növényeken és állatokon	14
3.7. Az NFAP és γ -core peptid-származékok növény- és terményvédelmi alkalmazhatósága	15
3.8. Az NFAP2 alkalmazhatósága felületi humán gombás fertőzések kezelésében	16
4. Következtetések	17
5. Saját közlemények jegyzéke	21
5.1. Az értekezés alapjául szolgáló publikációk	21
5.2. Az értekezés témájához kapcsolódó, a dolgozatban idézett publikációk	23
6. Tudománymetriai adatok	26
7. Irodalomjegyzék	27

1. Bevezetés

Napjainkra aggasztó méreteket öltött a gombák által okozott fertőzések és kártételek esetszáma és nyilvánvalóvá vált, hogy az eddig alkalmazottaktól alapvetően eltérő megelőzési és kezelési stratégiák kidolgozása szükséges a gyógyászat és a mezőgazdaság számára (Fisher és mtsai. 2020).

Epidemiológiai vizsgálatok rámutattak arra, hogy a gyógyszer-rezisztens gombák által okozott végzetes kimenetelű humán fertőzések (mikózisok) száma jelentősen megugrott az utóbbi két évtizedben (Kainz és mtsai. 2020, Denning 2024). Ennek okát epidemiológiai változásokban (Flörl és Steixner 2023), az immunszuppresszált betegek növekvő és a hatékony antifungális gyógyszerek csökkenő számában egyaránt keresnünk kell (Spencer és mtsai. 2023). A mikózisok hatékony kezelését nehezíti az a tény, hogy nem áll rendelkezésünkre megfelelő számú hatékony antifungális szer, és a ma használatosak súlyos mellékhatásokat válthatnak ki hosszan tartó terápia során és végérvényesen károsíthatják a páciens egyes szerveit a gomba- és az emlőssejt között meglévő sejtfelépítés, életműködés és metabolizmus hasonlósága következtében (Spencer és mtsai. 2023). A legjelentősebb hátráltató tényező azonban az, hogy a klinikumban alkalmazott eltérő hatásmódú egy vagy több gyógyszerrel szemben a gombák egyre inkább rezisztenssé válnak (Denning 2022). Ennek ellensúlyozására és a közfigyelem felkeltésére az Egészségügyi Világszervezet (WHO, *World Health Organization*) 2022-ben egy közleményben (*WHO Fungal Priority Pathogens List to Guide Research, Development and Public Health Action*) kiadta az első állásfoglalását a gombák okozta fertőzések problémájával kapcsolatban (World Health Organization 2022), amiben kutatási, fejlesztési és cselekvési célokat is megfogalmaz. Többek között azt, hogy minél előbb, minden eszközzel meg kell akadályozni és kontroll alá vonni a gombák által okozott fertőzések és antifungális szerekkel szemben mutatott rezisztenciájuk terjedését az eddigiektől alapvetően eltérő hatásmódú antifungális szereken alapuló, gombaspecifikus innovatív stratégiák bevezetésével (World Health Organization 2022, Fisher és Denning 2023).

A gombák által okozott fertőzések megakadályozása és kezelése, nem csak az egészségügy, hanem a mezőgazdaság számára is hatalmas kihívást jelent, ugyanis az utóbbi években világszinten folyamatosan emelkedett a növénypatogén fajok által okozott szántóföldi és raktári kártételek esetszáma, dollármilliárdokban mérhető veszteséget okozva (Benedict és mtsai. 2022). Ez utóbbi gazdasági kár eltörpül a folyamatosan növekvő számú

világnépesség élelmiszerszükségletének a biztosítására gyakorolt hatás mellett. Ha ezt a veszteséget a humán élelmezés szempontjából öt legfontosabb természetett növényre (rizs, búza, kukorica, szójabab, burgonya) nézzük, akkor ez elég lehet évi 600 millió - 4 milliárd ember táplálására napi 2000 kalória biztosításával (Stukenbrock és Gurr 2023). Becslések alapján a világ népessége 2050-ben eléri a 10 milliárd főt, aminek a megfelelő táplálására legalább 60%-kal meg kell növelni a jelenlegi évi előállított élelmiszermennyiséget (World Resources Institute 2018). Ennek egyik eleme lehet a gombák által okozott kártételek mértékének csökkentése megfelelő kezelési és megelőzési stratégiák bevezetésével (Brauer és mtsai. 2019, Stukenbrock és Gurr 2023). Világosan látszik, hogy a napjainkban alkalmazott kémiai növényvédőszeren alapuló eljárások erre nem igazán megfelelőek, ugyanis a velük szemben rezisztenciát mutató növénypatogén gombák folyamatosan terjednek világszinten (Beckerman és mtsai. 2023). Európában a problémát tovább súlyosbítja az, hogy a jelenleg érvényben lévő növényvédő szerekről szóló uniós jogszabályok alapján egyre több hatékony gombaölőszert kerül kivonásra a kereskedelmi forgalomból és válik tiltottá (Marchand 2023). Ráadásul a környezet kémiai peszticidektől történő tehermentesítését is megcélzó európai uniós cselekvési terv, az „Út a szennyezőanyag-mentes levegő, víz és talaj felé” értelmében 2030-ig felére kell csökkenteni Európában a kémiai növényvédőszer használatát (Európai Bizottság 2021). Mindezek olyan alacsony környezeti terhelést jelentő fungicidek kifejlesztését teszik szükségessé, amelyekkel szemben minimális eséllyel alakul ki rezisztencia a növénypatogén gombákban (Lobo Vicente és mtsai. 2023).

A természetben előforduló gombaellenes hatással rendelkező fehérjék (antifungális proteinek, AFP-k) és peptidok ígéretes gyógyszer- (de Ullivarri és mtsai. 2020), vagy növényvédőszerjelölt biomolekulákként jöhetnek szóba (Tang és mtsai. 2023). Ilyenek lehetnek az extracelluláris, kis molekulatömegű, kationos, stabil harmadlagos szerkezettel rendelkező Eurotiomycetes-eredetű antifungális proteinek is (Marx 2004, Galgóczy és mtsai. 2010). Kutatómunkánk során egy fonalas tömlősgomba, a *Neosartorya* (újabbban: *Aspergillus*) *fischeri* NRRL 181 által termelt két, kis molekulatömegű, ciszteinben gazdag, extracelluláris antifungális proteint (*Neosartorya fischeri* antifungális proteinek, NFAP és NFAP2) gyógyászati és növényvédelmi alkalmazási lehetőségeit vizsgáltuk a fent említett problémák megoldására.

2. Célkitűzések

Új, az eddigiektől alapvetően eltérő antifungális stratégia alapját jelenthetik a természetben előforduló, gombaellenes hatással rendelkező Eurotiomycetes-eredetű AFP-k gyógyszerként vagy fungicidként történő alkalmazása (Galgóczy és mtsai. 2013a,2019, Leiter és mtsai. 2017). Kutatómunkánk során ennek a lehetőségét vizsgáltuk meg a *Neosartorya (Aspergillus) fischeri* NRRL 181 által szekretált két AFP-nek, a *N. fischeri* antifungális protein (NFAP) és *N. fischeri* antifungális protein 2 (NFAP2) tanulmányozásán keresztül és ehhez a következő konkrét célokat fogalmaztunk meg:

1. A *N. fischeri* AFP-k izolálása a natív termelőből és nagy mennyiségű termelésük megvalósítása gyógyszer- és élelmiszeripari szempontból alapvetően biztonságosnak ítélt (GRAS, *generally recognized as safe*) gomba-alapú expressziós rendszerekben.
2. A *N. fischeri* AFP-k gombaellenes spektrumának, hatékonyságának, gyógyszerekkel és egymással való kölcsönhatásának a vizsgálata.
3. A *N. fischeri* AFP-k hatásmódjának a felderítése.
4. A *N. fischeri* AFP-k szerkezetének és a gombaellenes hatás szempontjából lényeges szerkezeti elemeinek a megismerése.
5. A gombaellenes hatás szempontjából lényeges szerkezeti elemek alapján antifungális hatással rendelkező *N. fischeri* AFP peptid-származékok tervezése.
6. A *N. fischeri* AFP-k és peptid-származékok toxicitásnak a vizsgálata növényeken és állatokon.
7. Az NFAP és peptid-származékok gyakorlati alkalmazhatóságának a bizonyítása a növény- és terményvédelemben.
8. Az NFAP2 gyakorlati alkalmazhatóságának a bizonyítása a humánpatogén gombák okozta fertőzések kezelésében.

3. Az eredmények összefoglalása

3.1. *Neosartorya fischeri* antifungális proteinek általános jellemzése, termelése és izolálása

Munkánk kezdetéig mindössze csak négy AFP izolálásáról számolt be a szakirodalom. Ezek időrendben az *Aspergillus giganteus* antifungális protein (AFPg; Wnendt és mtsai. 1994), *Penicillium chrysogenum* antifungális protein (PAF, Marx és mtsai. 1995), *Aspergillus niger* antifungális peptid (AnAFP, Gun Lee és mtsai. 1999) és a PAF-fal teljesen megegyező *Penicillium nalgiovense* antifungális protein (NAF, Geisen 2000). Nuklein- és aminosav-szekvencia adatbázisokban történő keresések és hasonlósági találatok alapján feltételeztük, hogy hasonló, de eltérő spektrummal és hatásmóddal rendelkező antifungális proteineket más gombák (pl. a *Neosartorya (Aspergillus) fischeri* NRRL 181) is képesek termelni.

Kimutattuk, hogy a *N. fischeri* NRRL 181 izolátum három, különböző Eurotiomycetes-eredetű AFP csoportba sorolható fehérjét termelhet: 1) az NFAP-t (PAF-csoport), 2) a csoportnak nevet adó NFAP2-t, 3) és a *N. fischeri* „bubble” proteint, az NFBP-t (*Penicillium brevicompactum* „bubble” protein, BP-csoport) (1. Táblázat) (Sonderegger és mtsai. 2018). Ezekből kettőt, az NFAP-t és az NFAP2-t (UniProt adatbázis azonosítók: A0A2I2KHN8, illetve A0A1D0CRT2) sikerült a natív termelő folyadéktenyészetének a felülúszójából kis mennyiségben izolálnunk 1,25±0,12 mg/l (Kovács és mtsai. 2011), illetve 0,37±0,02 mg/l hozamokkal (Tóth és mtsai. 2016). A fehérjék további részletesebb jellemzéséhez és egyéb kísérletekhez meg kellett oldanunk nagy mennyiségű előállításukat egy fehérje expressziós rendszerben.

1. Táblázat. A *Neosartorya fischeri* NRRL 181 által termelt antifungális proteinek *in silico* előre jelzett fizikokémiai tulajdonságai.

Protein	Aminosavak száma	Molekulatömeg (Da)*	Ciszteinek száma*	K/R/H arány*	Becsült pI*	Töltés (pH 7)**	GRAVY*
NFAP	57	6625,52	6	11/2/1	8,93	+5,0	-1,214
NFAP2	52	5564,32	6	7/0/2	9,02	+5,2	-0,731
NFBP	64	6784,28	8	0/8/2	6,87	+0,2	-0,961

GRAVY: átlagos hidrofóbicitás érték (*grand average of hydropathy value*). *: *ExPASy ProtParam tool*-al számolva (Gasteiger et al., 2005). **: *Protein Calculator v3.4 server*-rel számolva (The Scripps Research Institute; <http://protcalc.sourceforge.net/>). NFAP, NFAP2: *Neosartorya fischeri* antifungális protein és 2, NFBP: *N. fischeri* „bubble” protein.

Az NFAP-t és szerkezeti mutáns változatait (lsd. 3.4 fejezet) nagy mennyiségben sikeresen megtermeltettük egy GRAS *Pichia pastoris* (újabbán *Komagataella phaffii*) KM71H-alapú expressziós rendszerben. Kodon optimalizáció nélkül az NFAP hozama $5,96\pm 0,24$ mg/l-nek (Virágh és mtsai. 2014), míg optimalizáció után $11,27\pm 4,65$ mg/l-nek adódott (Galgóczy és mtsai. 2017). A későbbiekben a rekombináns NFAP és NFAP2 hatásmódjának a felderítéséhez (lsd. 3.3. fejezet) és a szerkezet-hatásmód összefüggés megállapításához (lsd. 3.4 fejezet) szeretnénk volna az oldatbeli szerkezetüket magmágnesen rezonancia (NMR, *nuclear magnetic resonance*) spektroszkópiával meghatározni. Az ilyen jellegű mérést viszont nagymértékben zavarta a *P. pastoris*-alapú expressziós rendszer által poszttranszlációs módosításként a fehérjére csatolt nagy mennyiségű, hosszú és elágazó cukormotívum (glikozilációs mintázat) (O'Leary és mtsai. 2004). Ennek ellensúlyozására kidolgoztunk egy GRAS *P. chrysogenum* Q176-alapú expressziós rendszert, amiben az NFAP és az NFAP2 hozama $3,68\pm 0,19$ mg/l-nek (Sonderegger és mtsai. 2016), illetve $15\pm 1,2$ mg/l-nek adódott (Tóth és mtsai. 2018).

Az NFAP a hatásmódjának tanulmányozása céljából megtermelésre került még egy *Aspergillus nidulans* CS2902 törzsben is $1,68\pm 0,22$ mg/l hozammal (Galgóczy és mtsai. 2013b). Mivel ez a transzformáns törzs könnyen elvesztette az NFAP-termelő képességét a nem integrálódó expressziós vektor miatt, az NFAP termelésére a későbbiekben csak a *P. pastoris*- és a *P. chrysogenum*-alapú expressziós rendszereket használtuk.

3.2. A *Neosartorya fischeri* antifungális proteinek spektruma, kölcsönhatása antifungális szerekekkel és egymással

Korábbi tanulmányok megfigyelései szerint az AFPg, AnAFP, PAF és NAF antifungális spektrumai kismértékű átfedéssel, de lényegesen eltérnek egymástól (Marx 2004); továbbá a PAF képes szinergisztikus kölcsönhatásba lépni sztatinnal és flukonazollal (Galgóczy és mtsai. 2007, 2008), az AFPg pedig egy antifungális peptiddel, a cercopin A-val additív kölcsönhatásba (Moreno és mtsai. 2003). Munkánk során vizsgáltuk az NFAP és NFAP2 ilyen jellegű sajátosságait. Egy szinergisztikus kölcsönhatás előnyös lehet, mivel megengedheti a sikeres terápiás dózis csökkentését annak minden előnyével együtt, továbbá egy gombatorzs érzékenységét újra elmozdíthatja a klinikumban nem rezisztensnek ítélet koncentrációtartomány irányába (Belanger és mtsai. 2015).

Megállapítottuk az NFAP és NFAP2 antifungális spektrumait eltérő humán- és növénypatogén gombaizolátumokon, amiből azt a következtetést vontuk le, hogy az NFAP elsősorban a fonalas-, míg az NFAP2 az élesztőgombákkal szemben dózis-függő módon

hatékony. A tápközeg összetételétől és az alkalmazott inókulum mennyiségétől függően az NFAP és az NFAP2 minimális gátló koncentráció (MIC, *minimum inhibitory concentration*) értékei 6,25-200 µg/ml-nek, illetve 0,20-400 µg/ml-nek adódtak (Tóth és mtsai. 2016,2018,2020a,2022, Kovács és mtsai 2019, Gandia és mtsai. 2021, Holzknicht és mtsai. 2022, Dán és mtsai. 2024). Ennek az okát a humán szérumalbuminhoz történő nagymértékű kötődésükben vagy a tápközegben jelenlévő magas kationkoncentráció antifungális hatást csökkentő képességében kell keresnünk (Marx 2004, Galgóczy és mtsai. 2010,2019, Huber és mtsai. 2020).

Az NFAP2 hatékonynak bizonyult (multi)drog-rezisztens *Candida* izolátumok által képzett biofilmekkel szemben és szinergisztikus kölcsönhatásba lépett a klinikumban terápiás célból alkalmazott antifungális szerekkel (amfotericin B, echinokandinok, flukonazol) (Kovács és mtsai. 2019,2021).

Növénypatogén gombákkal szemben az NFAP és az NFAP2 kombinált alkalmazása indifferens kölcsönhatást mutatott és ekkor az ún. paradox hatás is megfigyelhető volt (Tóth és mtsai 2022).

Megfigyeltük, hogy az NFAP magas hőmérsékleten történő inkubáció után, viszonylag tág pH-tartományon belül, és magas koncentrációjú proteináz K-kezelés után is megőrzi antifungális hatását (Kovács és mtsai. 2011, Galgóczy és mtsai. 2017).

Az NFAP antifungális hatékonyságát a kétértékű kationokra disszociáló sók nagy mennyiségű jelenléte jelentősen csökkentette (Galgóczy és mtsai. 2013b,2017). Bizonyítottuk az NFAP2 hőstabilitását (Kovács és mtsai. 2011, Galgóczy és mtsai. 2017).

3.3. A *Neosartorya fischeri* antifungális proteinek hatásmódja

A *N. fischeri*-eredetű antifungális proteinek gyakorlati alkalmazásához elengedhetetlen azok antifungális hatásmódjának a felderítése. Mivel az NFAP elsősorban a fonalas-, míg az NFAP2 az élesztőgombákkal szemben mutatott nagymértékű gombaellenes aktivitást, ezért az NFAP hatásmódját *Aspergillus nidulans*-on (Virágh és mtsai. 2015), míg az NFAP2-ét *Candida albicans*-on tanulmányoztuk (Tóth és mtsai. 2018, Kovács és mtsai. 2019).

Felváztuk az NFAP lehetséges hatásmechanizmusát *A. nidulans*-on, ami alapján a fehérje egy membránba ágyazott heterotrimer G-proteinnel kapcsolt receptoron keresztül egy a ciklikus adenzin-monofoszfát/protein-kináz A szignalizációs útvonalat indukál, ami a polarizált hifanövekedés gátlásban és apoptózis indukciójában játszik szerepet. Ezen kívül apoptózist indukálhat még egy sejtfalintegritás útvonaltól független mitogén-aktivált protein-kináz által aktivált ismeretlen célponton keresztül. Mindezek rövid többszörösen

elágazó hifák képződésében, a metabolikus folyamatok leállításában és sejthalálban nyilvánulnak meg (Virágh és mtsai. 2015). Az NFAP hatásmechanizmusának tanulmányozása során elért eredményeink megerősítették azokat a megfigyeléseket, amelyek szerint a hasonló fizikai-kémiai tulajdonságuk ellenére az Eurotiomycetes-eredetű AFP-k különböző módon fejtik ki gombaellenes hatásukat. Az NFAP antifungális hatásmechanizmusa hasonló a PAF-éhoz (Binder és mtsai. 2010), de nagymértékben eltér az AFPg és az AFPgNN5353 által mutatottaktól (Hagen és mtsai. 2007, Binder és mtsai. 2011).

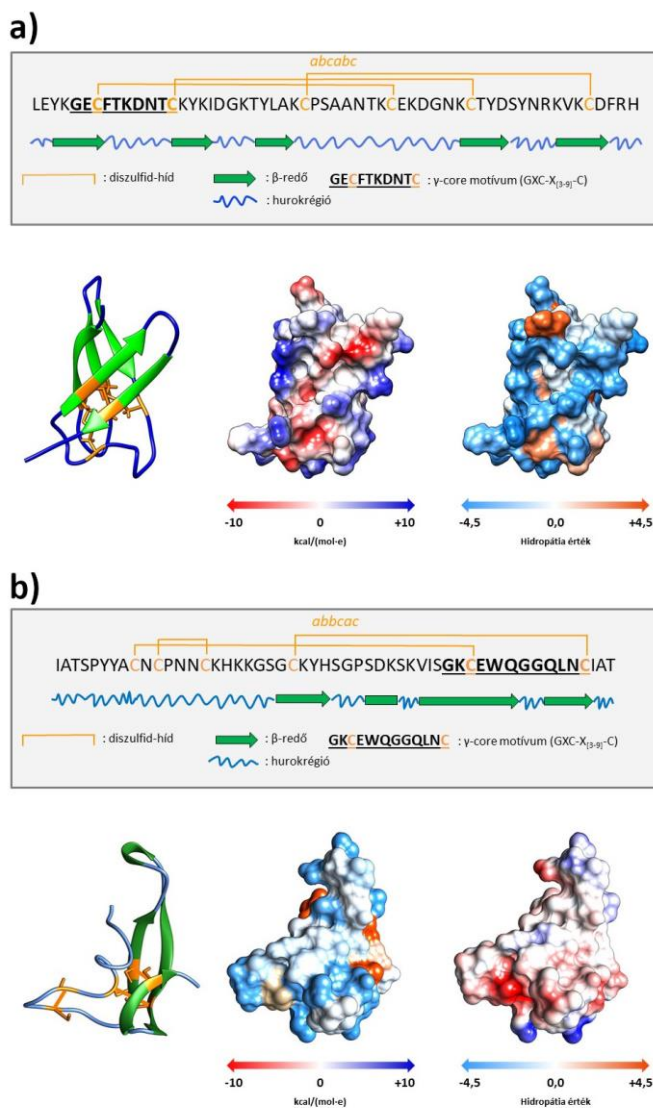
Az NFAP2 hatásmechanizmusáról kevesebbet tudunk, mint az NFAP esetében. Megállapítottuk, hogy az NFAP2 MIC értéken alkalmazva kis és nagy ionerősségű tápközegekben egyaránt roncsolja a *C. albicans* sejtmembránját, ami az egyik hatásmódja lehet. Ennek a sejtmembránroncsoló hatásnak a pontos mechanizmusa még nem ismert. Valószínűsíthető az, hogy az NFAP2, sok más gombaellenes peptidhez hasonlóan, relatíve magas koncentrációban valamelyik általános, jól leírt mechanizmussal roncsolja az élesztőgombasejtek membránját (Struyfs és mtsai. 2021).

3.4. A *Neosartorya fischeri* antifungális proteinek szerkezete és hatásmódja közötti összefüggés

Az NFAP és NFAP2 szerkezetének a megismerése elengedhetetlenül szükséges volt ahhoz, hogy megértjük a szerkezet-antifungális hatás-hatékonyság közötti összefüggéseket, és hogy funkcionálisan aktív peptid-származékokat tudjunk tervezni az egyes szerkezeti motívumok alapján. Az NFAP és az NFAP2 szerkezetéről az **1. Ábra** nyújt összefoglaló információt.

Az NFAP NMR-rel meghatározott oldatbeli szerkezete nagy hasonlóságot mutat az azonos Eurotiomycetes-eredetű AFP csoportba tartozó PAF szerkezetéhez (Batta és mtsai. 2009). Az NFAP is egy kompakt, β -hordó-szerű fehérje (**1a. Ábra**), amit hurokrégiókkal összekapcsolt öt antiparallel állású β -redő épít fel (**1a. Ábra**). A fehérje harmadlagos szerkezetét a cisztein molekulák között létrejövő három diszulfid-híd stabilizálja *abcabc* mintázatban (**1a. Ábra**) (Hajdu és mtsai. 2019), ami a PAF-csoport tagjaira általánosan jellemző (Batta és mtsai. 2009, Huber és mtsai. 2018). A PAF-hoz és a többi Eurotiomycetes-eredetű AFP-hez hasonlóan az NFAP felszínén is hidrofil és hidrofób területek váltakozva helyezkednek el (**1a. Ábra**) (Galgóczy és mtsai. 2019, Hajdu és mtsai. 2019), ami jó oldhatóságot biztosít számára különféle oldószerekben. A többiéhez hasonlóan pozitív, semleges és negatív töltöttségű területek váltakozó elhelyezkedése is megfigyelhető a felszínén (**1a. Ábra**) (Hajdu és mtsai. 2019). Az NFAP N-terminális régiójában, a PAF-

és az AFPg-csoportokra általánosan jellemző pozícióban, vagyis az első két β -redő között elhelyezkedő hurokrégióban megtalálható az evolúciósan konzervált ún. γ -core motívum (GXC-X₃₋₉-C, ahol X bármilyen aminosav lehet) a GECFTKDNTC aminosavak által alkotva (**1a. Ábra**).



1. Ábra. a) A *Neosartorya fischeri* antifungális protein (NFAP) és **b)** *N. fischeri* antifungális protein 2 (NFAP2) elsődleges szerkezete és másodlagos szerkezeti elemei. Felül mind a két panelen: Vastag betűvel, aláhúzva az evolúciósan konzervált γ -core motívum került kiemelésre (GXC-X₃₋₉-C, ahol X bármilyen aminosav lehet). A ciszteinek által képzett diszulfid-hidak (narancssárga vonal) *abcabc*, illetve *abbcac* mintázatba rendeződnek. Alul mind a két panelen sorban: Az NFAP és NFAP2 magmágneses rezonancia spektroszkópiával meghatározott harmadlagos szerkezete (*Protein Data Bank* azonosító: 5OQS, illetve 8RP9; Hajdu és mtsai. 2019, Váradi és mtsai. 2023) (bal), hidrofóbicitás (középen) és töltöttségi (jobb) felszíne. Narancssárgával a ciszteinek és a közöttük kialakuló diszulfid-hidak, zölddel a β -redők, míg kézzel a rendezetlen hurokrégiók kerültek kiemelésre. A fehérjeszerkezet az *UCSF Chimera* szoftverrel megjelenítve (Pettersen és mtsai. 2004).

Az NFAP2 oldatbeli szerkezete nagymértékben eltér az eddig meghatározott Eurotiomycetes-eredetű AFP-k által mutatottaktól, amikre a β -hordó-szerű szerkezet jellemző (Galgóczy és mtsai. 2019). Az NFAP2-t szerkezetileg két nagy egységre lehet osztani. Az első N-terminális rész (1-21 aminosavak) egy rendezetlen hurok-régió; míg második, C-terminális részt (22-52. aminosavak) három antiparallel β -redő építi fel, melyeket rövid hurokrégiók kapcsolnak össze (**1b. Ábra**). Ezt a szerkezetet a ciszteinek között létrejövő diszulfid-hidak stabilizálják *abbcac* mintázatban (**1b. Ábra**) (Váradi és mtsai. 2023b). Ez eltér a szintén hat ciszteint tartalmazó PAF, PAFB és NFAP által mutatott *abcabc* mintázattól (Galgóczy és mtsai. 2019, Hajdu és mtsai. 2019). Az NFAP2 elsődleges szerkezetében is felismerhető az evolúciósan konzervált γ -core motívum, az NFAP-vel ellentétben viszont nem az N-terminális (**1b. Ábra**), hanem a C-terminális régióban található meg az utolsó két β -redő egy-egy része és közöttük lévő hurokrégió által alkotva (GKCEWQGGQLNC) (**1b. Ábra**). Az NFAP2 felszínén az NFAP-hez hasonlóan hidrofíll és hidrofób; továbbá pozitív, semleges és negatív töltöttségű területek váltakozó elhelyezkedése figyelhető meg (**1b. Ábra**).

Mivel az NFAP harmadlagos szerkezete nagyon hasonló az élővilágban (növény, állat, ember) általánosan előforduló defenzin-szerű fehérjék harmadlagos szerkezetéhez (Mattar és mtsai. 2016, Kudryashova és mtsai 2017, Kovaleva és mtsai. 2020), ezért feltételeztük, hogy ugyanazok a szerkezeti elemek befolyásolhatják az antifungális hatékonyságát mint azoknak, azzal a különbséggel, hogy az NFAP tartalmaz egy központi hidrofób magot, ami a megfelelő mintázatban elrendeződő diszulfid-hidak szerkezetet stabilizáló hatásán felül (Lacadena és mtsai. 1995, Batta és mtsai. 2009, Váradi és mtsai. 2013) szintén részt vehet a funkcionálisan aktív feltekeredett szerkezet kialakításában és összetartásában (Munson és mtsai. 1996, Carter és mtsai. 2001, Cheung és mtsai. 2002, Camilloni és mtsai. 2016). A pre- és a pro-szekvencia megfelelő lehasadása az N-terminális részről elengedhetetlennek bizonyult az AFPg megfelelő harmadlagos szerkezetének a kialakításában (Martínez-Ruiz és mtsai. 1997). Kimutatták, hogy a β -defenzinek N-terminálisának első öt aminosava elősegíti a feltekeredést és a megfelelő diszulfid-híd mintázat kialakulását (Taylor és mtsai 2008), és már egy aminosav mutáció is ebben a régióban a harmadlagos szerkezet eltérését (Sahl és mtsai. 2005) vagy az antimikrobiális hatékonyság csökkenését, a spektrum és a toxicitás megváltozását okozhatja (Klüver és mtsai. 2006). Ezeket figyelembe véve feltételeztük, hogy az első öt N-terminális aminosav, a központi hidrofób mag és a diszulfid-hidak kialakulása meghatározó szerepet játszanak az NFAP antifungálisan hatékony szerkezetének a kialakításában és stabilizálásban. Ennek a

vizsgálatára aminosavcserék alkalmazásával olyan szerkezeti mutáns NFAP változatokat terveztünk, amelyek vagy az első öt N-terminális aminosavban eltérnek a vad típustól, vagy nem tartalmaznak központi hidrofób magot, vagy nem alakulnak ki diszulfid-hidak benne. Az alkalmazott aminosavcserék következtében az olyan alapvető fizikokémiai tulajdonságok, amelyek befolyásolhatják a gombaellenes hatékonyságot (úm. össztöltés, izoelektromos pont, hidrofóbicitás) nem változtak a vad típusához képest. A szerkezeti mutáns változatok vizsgálatán keresztül megállapítottuk, hogy az NFAP antifungálisan (megfelelően) aktív szerkezetének a kialakításában és/vagy annak stabilitásában a ciszteinek és a közöttük létrejövő diszulfid-hidak, a központi hidrofób mag és az első öt N-terminális aminosav játszik szerepet (Galgóczy és mtsai. 2017). Ez alapján a fehérje antifungális hatásának növelés és spektrumának szélesítése céljából a „szabadon” szerkeszthető elemeket az öt β -redő között található hurokrégiók jelentik. Egyik ilyen a korábban említett, első két β -redő között megtalálható, a cisztein-gazdag antimikrobiális peptidekben általánosan előforduló, az antifungális hatás kiváltásában szerepet játszható, evolúciósan konzervált, ún. γ -core motívum (Yount és Yeaman 2006).

Az NFAP2-t együttesen teljes mértékig lefedő szintetikus peptid-fragmentumokat alkalmazó, ún. funkcionális térképezési technikával megállapítottuk, hogy a fehérje N-terminális középrégiója felelős a gombaellenes hatásért, ami egy külső részén elhelyezkedő, könnyen hozzáférhető hurokrégiót alkot és képes lehet elektrosztatikusan kapcsolódni a gombasejtmembrán negatívan töltött részeihez (Tóth és mtsai. 2018). Az Eurotimycetes-eredetű AFP-k γ -core régiója részben vagy egészben felelős lehet a sejtmembránroncsoláson keresztül megvalósuló élesztőgomba-ellenes hatásért, ami a PAF esetében bizonyítást nyert annak emelet pozitív össztöltésű és hidrofílebb γ -core motívumot hordozó változatának a vizsgálatával (PAF^{Opt}) (Sonderegger és mtsai. 2018). Ezt figyelembe véve kémiai szintézis módszerrel előállítottuk az NFAP2-nek egy olyan változatát, amiben a szinte semleges össztöltésű és hidrofil γ -core motívumot kicseréltük a Sonderegger és mtsai. (2018) által a PAF módosítása esetében használt, ami nagyobb pozitív össztöltéssel rendelkezik és sokkal hidrofílebb. Ez a változás mintegy kétszeresére emelte az NFAP2 össztöltését viszont a hidrofilitását csak enyhén emelte. A PAF-fal ellentétben (Sonderegger és mtsai. 2018) a γ -core módosítás következtében az NFAP2 elvesztette a rendezett β -redőzött fehérjékre jellemző másodlagos szerkezetét annak ellenére, hogy rendelkezett az *abbcac* diszulfid-híd mintázattal. Ezen felül a γ -core módosított NFAP2 *C. albicans*-szal szembeni MIC értéke megemelkedett. Ennek ellenére a γ -core módosított NFAP2 megtartotta *C. albicans* sejtölő hatékonyságát. Ezek alapján azt a következtetést

vontuk le, hogy a PAF-fal ellentétben a γ -core régió keresztül történő fehérjemódosítás nem egy járható út az NFAP2 gombaellenes hatékonyságának és spektrumának a növelése céljából, és azt, hogy a γ -core régióknak elsősorban szerkezetkialakító és a megfelelő feltekeredést elősegítő szerepe lehet ebben a fehérjében (Váradi és mtsai. 2023b).

3.5. *Neosartorya fischeri* antifungális proteinek peptid-származékai

Számos tanulmány alapján az antimikrobiális hatással rendelkező proteinek bizonyos aminosav-szekvenciamotívumait lefedő szintetikus peptidek hatékonyan gátolhatják egyes mikroorganizmusok növekedését. Az ilyen peptidekben tudatosan végrehajtott aminosavcserékkel pedig megváltoztatható a hatékonyság, a spektrum és az emlőssejteken mutatott toxicitás (Torres és mtsai. 2019). Korábbi tanulmányok rámutattak arra, hogy a gombaellenes növényi β -defenzinek evolúciósan konzervált γ -core motívumait lefedő szintetikus peptid-származékok ugyanolyan cidikus vagy sztatikus antifungális hatással rendelkezhetnek növénypatogén fonalgombákkal szemben, mint amelyeket a teljes hosszúságú defenzinek mutatnak (Sagaram és mtsai. 2011, Lacerda és mtsai 2014). Ez igaz lehet az Eurotiomycetes-eredetű AFP-kre is (Garrigues és mtsai. 2017, Sonderegger és mtsai. 2018). Ezen peptidek gombaellenes hatékonysága és annak milyensége nagymértékben függ a γ -core régiót felépítő aminosavaktól és annak fizikokémiai tulajdonságaitól. Tudatosan alkalmazott aminosavcserékkel a hatékonyság fokozható, a spektrum szélesíthető (Sagaram és mtsai. 2011). Munkánk során vizsgáltuk azt, hogy mindezek igazak lehetnek-e a *N. fischeri* által termelt antifungális proteinekre, ezért az NFAP és NFAP2 különböző γ -core peptid-származékait állítottuk elő és tanulmányoztuk (**2. Táblázat**).

Megfigyeltük, hogy az NFAP és az NFAP2 natív γ -core régióit lefedő szintetikus, lineáris peptid-származékok nem mutatnak antifungális hatást, ami viszont megfigyelhető volt a PAF γ -core régiója alapján tervezett szintetikus peptidek esetében (Sonderegger és mtsai. 2018). Az NFAP és az NFAP2 natív γ -core régiója alapján tervezett peptidek antifungálisan hatékonyá váltak olyan aminosavcserékkel, amelyek növelték a pozitív ösztötlést és a hidrofilitást. Ebben az esetben az antifungális hatékonyság elsősorban a pozitív ösztötléstől és nem a hidrofilitás értéktől függött. Ezeknek a peptideknek a MIC értékei 12,5-100 $\mu\text{g/ml}$ -nek adódtak növénypatogén, míg 12-50 $\mu\text{g/ml}$ -nek humánpatogén gomba izolátumokkal szemben (Tóth és mtsai. 2020a,2022, Váradi és mtsai. 2024). Megfigyeléseink alapján az γ -core peptid-származékok nem dózis-függő módon hatnak, vagyis el kell érniük egy bizonyos koncentrációt aminél teljes növekedésgátlást okoznak, az

alatt semmilyen szintű ilyen hatás nem figyelhető meg. Elektronikus cirkuláris dikroizmus spektroszkópiás vizsgálatok eredményeiből azt a következtetést vontuk le, hogy a γ -core peptid-származékok gombaellenes hatása nem kíván rendezett szerkezetet (Tóth és mtsai. 2020a).

2. Táblázat. A *Neosartorya fischeri* antifungális protein (NFAP) és 2 (NFAP2) γ -core régiói alapján tervezett szintetikus peptid-származékok és azok fizikokémiai tulajdonságai.

Peptid	Aminosavak száma	Molekulatömeg (Da)*	Ciszteinek száma*	K/R/H arány*	Becsült pI*	Töltés (pH 7)**	GRAVY*
NFAP γ-core peptid-származékok							
γ ^{NFAP}	14	1707,879	2	3/0/0	6,26	-0,1	-1,500
γ ^{NFAPC13S}	14	1691,814	1	3/0/0	6,27	-0,1	-1,736
γ ^{NFAPC6S,C13S}	14	1675,749	0	3/0/0	6,28	-0,1	-1,971
γ ^{NFAPS-tBu}	14	1820,108	2	3/0/0	n.a.	n.a.	n.a.
γ ^{NFAP-opt}	14	1728,089	2	7/0/0	9,84	+5,8	-2,264
γ ^{NFAP-optC13S}	14	1712,025	1	7/0/0	10,02	+5,9	-2,500
γ ^{NFAP-optC6S,C13S}	14	1695,960	0	7/0/0	10,22	+5,9	-2,736
γ ^{NFAP-optS-tBu}	14	1840,318	2	7/0/0	n.a.	n.a.	n.a.
γ ^{NFAP-optChZ}	14	1578,539	1	0/0/0	5,52	-0,1	-2,264
γ ^{NFAP-optGZ}	14	1745,291	2	7/0/0	9,93	+5,8	-0,557
γ ^{NFAP-optGZC13S}	14	1729,226	1	7/0/0	10,14	+5,9	-0,793
γ ^{NFAP-optGZC6S,C13S}	14	1713,162	0	7/0/0	10,40	+5,9	-1,029
γ ^{NFAP-optGZS-tBu}	14	1857,520	2	7/0/0	n.a.	n.a.	n.a.
NFAP2 γ-core peptid-származékok							
γ ^{NFAP2}	16	1792,049	2	2/0/0	8,02	+0,8	-0,450
γ ^{NFAP2-opt}	14	1606,999	2	6/0/0	10,05	+5,8	-1,079

GRAVY: átlagos hidrofóbicitás érték (*grand average of hydropathy value*). *: ExPASy ProtParam tool-lal számolva (Gasteiger és mtsai. 2005). **: Protein Calculator v3.4 server-rel számolva (The Scripps Research Institute; <http://protecalc.sourceforge.net/>). C13S és C6S,C13: cisztein-cserélt változatok, S-tBu: cisztein S-*terc*-butilált változat. Tóth és mtsai. (2020a, 2022) alapján.

Az antifungálisan aktív NFAP γ -core peptid-származékok vizes oldatban -20°C-on történő tárolása során többszöri kiolvasztás-visszafagyasztás ciklust követően azt a jelenséget tapasztaltuk, hogy a peptidek veszítenek antifungális hatékonyságukból. Ennek okát abban láttuk, hogy a szintetizált γ -core peptidekben található két cisztein szabad szulfhidril-csoporttal rendelkezik, amiken keresztül oxidatív körülmények között ciklizálódni vagy dimerizálódni tudnak. Ezeknek a változatoknak eltérhet az antifungális hatékonysága az eredetileg szintetizált lineáris, monomer változatokétól. A szerkezeti integritás megőrzése elengedhetetlenül szükséges lehet a biztos és állandó mértékű

gombaellenes hatás szempontjából egy peptid-alapú fungicid készítmény esetén. Az NFAP γ -core régiója alapján tervezett és antifungálisan hatékony szintetikus, lineáris peptidek szerkezeti integritása megőrizhető volt cisztein-szerin aminosavcserékkel vagy a ciszteinek *S-terc*-butilációjával (**2. Táblázat**). Ezáltal elkerülhetővé vált, hogy hosszan tartó tárolás és többszöri kiolvasztás-fagyasztás ciklus után olyan dimer és ciklikus formák jelenjenek meg az oldatban, amik csökkenthetik a hatékonyságot. Eredményeink alapján mindkét módosítás egyaránt kis mértékben gyengítheti az antifungális hatékonyságot, de az *S-terc*-butiláció rövid időtávon belül hatékonyabbá teheti a peptidet és tágíthatja az antifungális spektrumot. Ezek a módosítások elsősorban a peptid-származékok hidrofóbicitás értékét változtatták meg (általában csökkentették), a pozitív ösztölytést nem (Váradi és mtsai. 2024).

3.6. A *Neosartorya fischeri* antifungális proteinek és γ -core peptid-származékok toxicitása növényeken és állatokon

Annak ellenére, hogy számos antifungális hatással rendelkező természetes eredetű vagy szintetikus peptidről bebizonyosodott, hogy biztonságosan alkalmazható lehet növényvédelmi vagy gyógyászati célokra, néhány azonban valamilyen károsító hatással rendelkezhet állati vagy növényi sejteken (Ciociola és mtsai. 2016, Rautenbach és mtsai. 2016, Li és mtsai. 2021, Lima és mtsai. 2022). A *N. fischeri* által termelt NFAP, NFAP2 és azok γ -core peptid-származékainak mezőgazdasági és a gyógyászati célú gyakorlati alkalmazása megkívánja azt, hogy ne mutassanak károsító hatást növényeken és állatokon.

Növényeken elvégzett toxicitásteresztek alapján az NFAP és az antifungálisan hatékony γ -core peptid-származékai a MIC értékeik többszörösénél sem befolyásolták a *Medicago truncatula* csíranövények fejlődését és nem voltak szövetroncsoló hatással a paradicsomnövény levelén (Tóth és mtsai. 2020a,2022). Ugyanezek nem okozták a vörösvértetek hemolízisét és egy γ -core peptid-származék kivételével nem befolyásolták különböző humán sejtvonalak (keratinociták, bélhámsejtek, monociták) metabolikus aktivitását (életképességét) (Tóth és mtsai. 2022a). *Galleria mellonella* állatmodellben egyik antifungálisan aktív γ -core peptid-származék sem bizonyult ártalmasnak (Váradi és mtsai. 2024). Ezek az eredmények az NFAP és a γ -core peptid-származékaik növényvédelmi (és akár orvosi terápiás) célból történő biztonságos alkalmazhatóságát valószínűsítette.

Humán keratinocitákon, dermális fibroblasztsejteken és háromdimenziós bőrmodellen elvégzett toxicitásvizsgálatok alapján az NFAP2 egyikre nézve sem bizonyult ártalmasnak még a MIC értékének többszörösét alkalmazva sem. Az eredmények alapján azt a következtetést vontuk le, hogy az NFAP2, a PAF^{opt}, PAFB, és PAFC-hez hasonlóan

biztonságosan alkalmazható lehet felszíni mikózisok kezelésében, ugyanis vizes oldatban is kiváló penetrációs tulajdonságokkal rendelkezik és nem károsította a kültakarót (Holzknecht és mtsai. 2022).

3.7. Az NFAP és γ -core peptid-származékok növény- és terményvédelmi alkalmazhatósága

Mivel az NFAP és a γ -core régiója alapján tervezett peptid-származékok elsősorban a növénypatogén fonalgombák ellen mutattak nagymértékű hatékonyságot, ezért a gyakorlati alkalmazhatóságukat a mezőgazdaságban a növénykórokozó fonalgombákkal szembeni védelemben képzeltük el és végeztünk ilyen irányú laboratóriumi kísérleteket. Az NFAP és a γ -core peptid-származékok biológiai-eredetű fungicidként történő gyakorlati alkalmazhatóságát *Botrytis cinerea* és *Cladosporium herbarum* izolátumokkal szemben paradicsomnövényen vizsgáltuk. A *B. cinerea* számtalan termesztett zöldség és gyümölcs szürkerothadásának kórokozójaként ismert, továbbá nekrotróf parazitája a paradicsomnövény föld felletti részeinek (Williamson és mtsai. 2007). A raktározott paradicsomtermésben is hatalmas kárt okoz minden évben (Brito és mtsai 2021). Világszerte egyaránt nehézséget jelent az ellene történő védekezés a (multi)fungicid-rezisztens izolátumok megjelenése és fokozatos terjedés miatt (Fan és mtsai. 2017, Rupp és mtsai. 2017, Harper és mtsai. 2022, Weber és Petridis 2023, Jelenić és mtsai. 2024), ezért alternatív növény- és terményvédelmi megoldások szükségesek ennek a problémának a megoldására (Yin és mtsai. 2023). A *Cladosporium* nemzetség tagjai, a raktározott zöldségek és gyümölcsök kártevőjeként ismertek, elsősorban akkor amennyiben azokat valamilyen sérülés éri a tárolás vagy a szállítás során (Saleh és Al-Thani 2019).

Paradicsomnövényen elvégzett növényvédelmi kísérletek során az NFAP, a γ ^{NFAP}-opt peptid-származéka és ezek szinergisztikus koncentráció kombinációja topikális, kontakt növényvédőszerként alkalmazva megakadályozták a *B. cinerea* fertőzés kialakulását vagy annak szétterjedését a növény levágott levelén (Tóth és mtsai. 2022). Paradicsomtermésen elvégzett terményvédelmi kísérletekben az NFAP és az antifungálisan hatékony γ -core peptid-származékaik megakadályozták a *C. herbarum* által okozott fertőzést, míg *B. cinerea* fertőzés tüneteit mérsékeltek (Tóth és mtsai. 2020a,2022).

3.8. Az NFAP2 alkalmazhatósága felületi humán gombás fertőzések kezelésében

Az NFAP2 még a klinikai érzékenységi tesztek során alkalmazott RPMI-1640 tápközegben is nagymértékű hatékonyságot mutatott elsősorban humánpatogén *Candida* élesztőgombák planktonikus és szesszilis biofilmalkotó sejtjeivel szemben (Tóth és mtsai. 2018, Kovács és mtsai. 2019, 2021), ezért a gyakorlati alkalmazhatóságát az élesztőgombák által okozott fertőzések kezelésében képzeltük el és végeztünk ilyen irányú laboratóriumi kísérleteket. Mivel az NFAP2 nagymértékben képes a humán szérumalbuminhoz kötődni és eddigi kísérleteink alapján intravénásan alkalmazva nem hatékony (Kovács és mtsai. 2019, nem közölt adat), ezért gombaellenes szerként történő alkalmazását elsősorban a kültakaró vagy belső nyálkahártya felszínét érintő mikózisok kezelésben képzeltük el. A bőr vagy a nyálkahártya megfelelő és hatékony terápiája nehéz lehet, ugyanis számos a ma alkalmazott antifungális szercsoportok valamelyikével szemben rezisztenciát mutató felszíni gombás fertőzés könnyen szisztémássá válhat az immunszupresszált páciensek esetében (Barlow és mtsai 2020). Feltételezésünk szerint az NFAP2 képes lehet a felszíni (akár antifungális szerrezisztens) mikózisok kialakulását már a fertőzés korai szakaszában megakadályozni. Kísérleteink során ezt bizonyítottuk háromdimenziós bőr- (Holzknecht és mtsai. 2022), illetve egér vulvovaginális candidiázis (VVC) modellekben (Kovács és mtsai. 2019) laboratóriumi körülmények között.

Háromdimenziós bőrmoddellen végrehajtott fertőzési kísérletekben az NFAP2 topikális alkalmazása megakadályozta a *C. albicans* kolonizációját és mélyebb szöveti rétegekbe jutását. A fertőzéssel együtt járó szövetkárosodások nem voltak megfigyelhetők. Az NFAP2 alkalmazása nem befolyásolta az interleukin-6 szintet, ami azt jelezte, hogy az NFAP2 jelenlétében is aktiválódhatnak az ehhez kapcsolódó pro- és az antiinflammatorikus regeneratív folyamatok (Holzknecht és mtsai. 2022).

Flukonazol-rezisztens izolátummal végrehajtott VVC egérmoddellben az NFAP2 topikális alkalmazása szignifikánsan csökkentette a *C. albicans* élősejtszámot a vulvális és vaginális szövetekben. Hisztológiai vizsgálatok alapján az NFAP2 nem okozott súlyos patológiás reakciókat a vulvális és vaginális szövetekben, és elváltozásokat a kezelt szervek makromorfológiájában, továbbá nagymértékben gátolta a *C. albicans* hifális formába történő átalakulását. A fertőzési folyamatra aktiválódó neutrofil granulociták jelenléte az összes szöveti mintában megfigyelhető volt, ami az ehhez a sejtípushoz kapcsolódó immunfolyamatok működőképességének a valószínűségét jelezte az NFAP2 jelenlétében (Kovács és mtsai. 2019).

4. Következtetések

Kutatómunkánk elsődleges célja az volt, hogy a *N. fischeri*-eredetű NFAP és NFAP2 gombaellenes fehérjék tanulmányozásával, egy lehetséges válasszal szolgáljunk napjaink antifungális kihívásaira. Vagyis, hogy egy a gyógyászatban vagy a mezőgazdaságban alkalmazott új gombaellenes stratégia olyan olcsón, nagy mennyiségben előállítható molekulán alapuljon, amely széles spektrummal rendelkezik, bevethető szesszilis, biofilmet alkotó sejtekkel szemben is, minimális eséllyel alakul ki rezisztencia ellene, gombaszpecifikus célpontot támad, a környezetre nézve ártalmatlan és az aktuális kihívásoknak megfelelően módosítható. A *N. fischeri* antifungális proteinekkel és γ -core peptid-származékaikkal elért eredményeink a következő bekezdésekben részletezettek alapján segíthetik ennek a célnak a megvalósítását vagy mutathatnak új kutatási irányok felé.

- Annak ellenére, hogy a natív termelővel csak alacsony hozamban sikerült NFAP-t és NFAP2-t termeltetünk (Kovács és mtsai. 2011, Tóth és mtsai. 2016), az alkalmazott és kifejlesztett, GRAS *P. pastoris* és *P. chrysogenum*-alapú expressziós rendszerek alkalmasnak bizonyultak a MIC értékek figyelembevételével relatíve nagy mennyiségben történő és akár ipari körülmények között is alkalmazható előállításukra (Virágh és mtsai. 2014, Sonderegger és mtsai. 2016, Galgóczy és mtsai. 2017, Tóth és mtsai. 2018). A tenyészetek felülűszójából egy ultraszűrési folyamat után mindkét fehérje nagy tisztaságban (93-97%) izolálható volt már egylépéses kation-cserélő oszlopkromatográfiás rendszer alkalmazásával is (nem közölt adat), ami egyes felhasználási területek (pl. növényvédő- vagy terménytartósító szer) szempontjából a feldolgozási és kereskedelmi forgalomba hozataluk költséghatékonyságát jelzi.
- A környezeti körülmények között stabil harmadlagos szerkezettel rendelkező NFAP és NFAP2-nek a munkánk során megfigyelt különböző, de kismértékű átfedéssel jellemezhető antifungális spektruma alkalmassá teheti őket eltérő gombák okozta fertőzések és kártételek kezelésére vagy visszaszorítására (Tóth és mtsai. 2016,2018,2020a,2022, Kovács és mtsai 2019, Gandia és mtsai. 2021, Holzknecht és mtsai. 2022, Dán és mtsai. 2024). A megfigyelt, széles antifungális spektrumaik alapján bevethetőkké válhatnak akár újonnan felbukkanó gombakórokozókkal szemben is, ez által megoldást jelenthetnek az antifungális kezelések epidemiológiai kihívásaira.
- Az NFAP2 gyógyászati szempontból különösen előnyös tulajdonságának az bizonyult, hogy képes volt a (multi)drog-rezisztens *Candida* izolátumok által képzett biofilmeket

már önálló alkalmazása során is megsemmisíteni, továbbá, hogy a klinikumban alkalmazott antifungális szerekkel szinergisztikus kölcsönhatásba lépett ellenük (Kovács és mtsai. 2019,2021). Ez utóbbi által a biofilmek antifungális szerrel szemben mutatott érzékenységet a rezisztenciát jelentő koncentrációtartományból a klinikai szempontból érzékenynek tekinthető tartományba akár vissza lehet szorítani. Ez mintegy válaszul szolgálhat a biofilmek hagyományos antifungális szerekkel szemben mutatott nagymértékű rezisztenciájára. A megfigyelt szinergizmus felveti az NFAP2 adjuváns, kiegészítő terápiás szerként való felhasználását a klinikai gyakorlatban. Ezen kívül még alkalmas lehet orvosi műszerek és eszközök (pl. katéterek, söntök) *Candida* biofilm-mentesítésére, amelyek elsődleges forrásként szolgálhatnak nozokomiális gombafertőzések számára (Cavalheiro és Teixeira 2018).

- Az NFAP és NFAP2 kombinált alkalmazása során megfigyelt paradox hatást (ami egyedüli alkalmazás során nem volt megfigyelhető) gyógyászati szempontból nem jelenthet nagy veszélyt, hisz ezek a koncentrációk nem valószínű, hogy elérhetők az élő szervezetben. Növényvédelmi szempontból viszont kockázatos lehet, amennyiben a két különböző antifungális fehérvét egyszerre vagy egymás után alkalmazzuk.
- Növényeken, humán sejtvonalakon, vörösvértesteken, szövetmodellen és *Galleria mellonella*-n elvégzett toxicitás tesztek az NFAP és az NFAP2 más organizmuskora nézett biztonságos alkalmazhatóságát és gomba-specifikus célpontokon keresztül megvalósuló hatásmechanizmusának a meglétét feltételezik (Tóth és mtsai. 2020a,2022, Kovács és mtsai. 2019, Holzknacht és mtsai. 2022, Váradi és mtsai. 2024). Ezek a célpontok ígéretes templátul szolgálhatnak molekula-adatbázisok szerkezet-alapú szűrésére egy gyógyszer-újrachasznosítási folyamatban, hogy olyan már engedélyezett gyógyszermolekulákat találjunk, amik terápiás szempontból jobb tulajdonságokkal rendelkeznek a *N. fischeri* AFP-knél, de ugyanazt a gomba-specifikus célpontot támadják. Ilyen gombaellenes molekulák iránt egyre sürgetőbb szükség mutatkozik figyelembe véve azt, hogy a hagyományos gombaellenes szerekkel szembeni rezisztencia terjedése miatt a rájuk alapuló kezelések időtartama folyamatosan növekszik, ami egyre nagyobb kockázatot jelent a szerveket vagy a szervezetet károsító mellékhatások kialakulására (Spencer és mtsai. 2023).
- A szerkezet-antifungális hatás feltárására irányuló kísérleteink eredményei alapján megállapítható volt, hogy az antifungális hatékonyság növelése és a spektrum szélesítése céljából a NFAP és az NFAP2 „szabadon” szerkeszthető elemeit elsősorban a rendezetlen szerkezetű hurokrégiók jelentik (Galgóczy és mtsai. 2017, Tóth és mtsai. 2018, Váradi és

mtsai. 2023). Ezek a fehérjeszerkezeti elemek lehetőséget adhatnak a *N. fischeri* AFP-k szerkezetének, hatékonyságának és spektrumának a megváltoztatására, ami egy eszköz lehet az esetleges velük szemben mutatott rezisztencia elleni harcban, vagy válaszul szolgálhat az új epidemiológiai kihívásokra.

- Az NFAP és NFAP2 γ -core régió alapján tervezett szintetikus peptid-motívumok önmagukban nem mutattak semmilyen gombaellenes hatást ellentétben a PAF és a növényi antifungális proteinek γ -core motívumaival, amiknél ez megfigyelhető (Sagaram és mtsai. 2011, Sonderegger és mtsai. 2018, Tóth és mtsai 2020a és b, 2022, Váradi és mtsai. 2024). Ez arra engedett következtetni, hogy ez a fehérjerégió nem játszik szerepet az antifungális hatásuk kiváltásában, nem úgy, mint a PAF és a növényi defenzinek esetében (Sagaram és mtsai. 2011, Sonderegger és mtsai. 2018).
- Az NFAP és NFAP2 γ -core peptid-származékokra igaz volt az, hogy az aminosavcserékkel történő pozitív osztóztés növelés és hidrofóbicitás csökkentés növeli a peptid antifungális hatékonyságát ugyanúgy (Tóth és mtsai. 2020a, 2022, Váradi és mtsai. 2024), mint a növényi defenzinek γ -core peptid-származékai esetében (Sagaram és mtsai. 2011). Mivel ezen peptidek többsége nem bizonyult károsnak a toxicitás tesztek során ezért biztonságosan és megbízhatóan felhasználhatók lehetnek gyakorlati célra (Tóth és mtsai. 2020a, 2022, Váradi és mtsai. 2024), elsősorban akkor, ha biztosítjuk a szerkezeti integritásukat a ciszteinek *S-terc*-butilációjával, ami csekély hatékonyságvesztés mellett megakadályozza a kénhidakon keresztül létrejövő ciklikus és dimer formák kialakulását oxidatív körülmények között (Váradi és mtsai. 2024). Az egyre gazdaságosabbá és hatékonyabbá váló szilárd fázisú peptidszintézis módszerek következtében a közeljövőben realitása lehet a szintetikus antifungális peptidek széleskörű gyakorlati alkalmazásának (Hisashi és Fuse 2022). Elsősorban akkor, ha azt is figyelembe vesszük, hogy ezzel a módszerrel olyan változtatások (pl. D- és nem esszenciális aminosavak beépítése) is végrehajthatók a peptideken, amik élő, expressziós rendszerrel nem. Ezáltal ennek a módszernek az alkalmazásával gyorsan és hatékonyan fejleszthetővé válhatnak biztonságosan alkalmazható új antifungális peptidek válaszul a gombaellenes stratégiák rezisztenciával és epidemiológiai változásokkal szembeni kihívásaira.
- Felületi kontakt növényvédőszerként alkalmazva az NFAP és γ -core peptid-származékaik képesek voltak a megakadályozni a nekrotróf, *B. cinerea* fertőzés kialakulását paradicsomnövény levelén vagy annak intenzitását csökkenteni már mikromolos koncentrációtartományban laboratóriumi körülmények között (Tóth és mtsai. 2022).

Ezen felül hatékonynak mutatkoztak a paradicsomtermés védelmében is ugyanezzel a gombakórokozóval és *C. herbarum*-mal szemben (Tóth és mtsai. 2020a,2022). Az NFAP és γ -core peptid-származékaik egyes tulajdonságaik alapján (biomolekulák és előreláthatólag nem toxikusak más élőlénycsoportokra, mint a gombák) megfelelnek a környezet kémiai peszticidektől történő tehermentesítését is megcélzó, az „Út a szennyezőanyag-mentes levegő, víz és talaj felé” európai uniós cselekvési tervben támogatott követelményeknek (Európai Bizottság 2021).

- Figyelembe véve az NFAP2 nagymértékű élesztőgomba-ellenes hatását és azt, hogy a (multi)drog-rezisztens *Candida* izolátumok által okozott fertőzések kezelése egyre nagyobb kihívást jelent a hagyományos antimikotikumokkal (Lass-Flörl és Steixner 2023); antifungális szerként történő klinikai terápia alkalmazása ennek a *N. fischeri*-eredetű antifungális fehérjének képzelhető el. A kísérletek során használt modellrendszerekben megfigyelt hatékonysága alapján (Kovács és mtsai. 2019, Holzkecht és mtsai. 2022), az NFAP új hatásmóddal rendelkező topikális szerként alkalmas lehet rezisztens *Candida* fajok által okozott felületi bőr- vagy nyálkahártya fertőzések kezelésére. Figyelembe véve az NFAP2 vulvovaginális candidiázis modellben mutatott nagymértékű hatékonyságát (Kovács és mtsai. 2019), hüvelyzuhanyként történő alkalmazása elképzelhető hagyományos antifungális szerekkel szemben rezisztenciát mutató gomba okozta hüvelynyálkahártya fertőzés kezelésére.

5. Saját közlemények jegyzéke

5.1. Az értekezés alapjául szolgáló publikációk

Dán K, Kocsubé S, Tóth L, Farkas A, Rákhely G, **Galgóczy L**. Isolation and identification of fungal biodeteriogens from the wall of a cultural heritage church and potential applicability of antifungal proteins in protection. *J. Cult. Herit.* 2024;67:194-202. doi: 10.1016/j.culher.2024.03.002. IF₂₀₂₃: 3,5 (Scopus - Conservation - SJR indikátor: D1); Független idézők száma: 2

Galgóczy L, Kovács L, Karácsony Z, Virágh M, Hamari Z, Vágvölgyi C. Investigation of the antimicrobial effect of *Neosartorya fischeri* antifungal protein (NFAP) after heterologous expression in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology (Reading)*. 2013;159:411-419. doi: 10.1099/mic.0.061119-0. IF₂₀₁₃: 2,835 (Scopus - Microbiology - SJR indikátor: Q1); Független idézők száma: 21

Galgóczy L, Borics A, Virágh M, Ficze H, Váradi G, Kele Z, Marx F. Structural determinants of *Neosartorya fischeri* antifungal protein (NFAP) for folding, stability and antifungal activity. *Sci Rep.* 2017;7:1963. doi: 10.1038/s41598-017-02234-w. IF₂₀₁₇: 4,122 (Scopus - Multidisciplinary - SJR indikátor: D1); Független idézők száma: 8

Gandía M, Kakar A, Giner-Llorca M, Holzknacht J, Martínez-Culebras P, **Galgóczy L**, Marx F, Marcos JF, Manzanares P. Potential of antifungal proteins (AFPs) to control *Penicillium* postharvest fruit decay. *J Fungi (Basel)*. 2021;7:449. doi: 10.3390/jof7060449. IF₂₀₂₁: 5,724 (Scopus - Plant Science - SJR indikátor: Q1); Független idézők száma: 15

Hajdu D, Huber A, Czajlik A, Tóth L, Kele Z, Kocsubé S, Fizil Á, Marx F, **Galgóczy L**, Batta G. Solution structure and novel insights into phylogeny and mode of action of the *Neosartorya (Aspergillus) fischeri* antifungal protein (NFAP). *Int J Biol Macromol.* 2019;129:511-522. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.02.016. IF₂₀₁₉: 5,162 (Scopus - Medicine (miscellaneous) - SJR indikátor: Q1); Független idézők száma: 6

Holzknacht J, Dubrac S, Hedtrich S, **Galgóczy L**, Marx F. Small, cationic antifungal proteins from filamentous fungi inhibit *Candida albicans* growth in 3D skin infection models. *Microbiol Spectr.* 2022;10:e0029922. doi: 10.1128/spectrum.00299-22. IF₂₀₂₂: 3,7 (Scopus - Microbiology (medical) - SJR indikátor: Q1); Független idézők száma: 7

Kovács L, Virágh M, Takó M, Papp T, Vágvölgyi C, **Galgóczy L**. Isolation and characterization of *Neosartorya fischeri* antifungal protein (NFAP). *Peptides.* 2011;32:1724-1731. doi: 10.1016/j.peptides.2011.06.022. IF₂₀₁₁: 2,434 (Scopus - Biochemistry - SJR indikátor: Q2); Független idézők száma: 58

- Kovács R, Holzknecht J, Hargitai Z, Papp C, Farkas A, Borics A, Tóth L, Váradi G, Tóth GK, Kovács I, Dubrac S, Majoros L, Marx F, **Galgóczy L**. *In vivo* applicability of *Neosartorya fischeri* antifungal protein 2 (NFAP2) in treatment of vulvovaginal candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2019;63:e01777-18. doi: 10.1128/AAC.01777-18. IF₂₀₁₉: 4,904 (Scopus - Pharmacology (medical) - SJR indikátor: D1); Független idézők száma: 14
- Kovács R, Nagy F, Tóth Z, Forgács L, Tóth L, Váradi G, Tóth GK, Vadászi K, Borman AM, Majoros L, **Galgóczy L**. The *Neosartorya fischeri* antifungal protein 2 (NFAP2): A new potential weapon against multidrug-resistant *Candida auris* biofilms. *Int J Mol Sci*. 2021;22:771. doi: 10.3390/ijms22020771. IF₂₀₂₁: 6,208 (Scopus - Medicine (miscellaneous) - SJR indikátor: Q1); Független idézők száma: 15
- Sonderegger C, **Galgóczy L**, Garrigues S, Fizil Á, Borics A, Manzanares P, Hegedüs N, Huber A, Marcos JF, Batta G, Marx F. A *Penicillium chrysogenum*-based expression system for the production of small, cysteine-rich antifungal proteins for structural and functional analyses. *Microb Cell Fact*. 2016;15:192. doi: 10.1186/s12934-016-0586-4. IF₂₀₁₆: 3,681 (Scopus - Applied Microbiology and Biotechnology - SJR indikátor: D1); Független idézők száma: 22
- Tóth L, Kele Z, Borics A, Nagy LG, Váradi G, Virágh M, Takó M, Vágvölgyi C, **Galgóczy L**. NFAP2, a novel cysteine-rich anti-yeast protein from *Neosartorya fischeri* NRRL 181: isolation and characterization. *AMB Express*. 2016;6:75. doi: 10.1186/s13568-016-0250-8. IF₂₀₁₆: 1,825 (Scopus - Applied Microbiology and Biotechnology - SJR indikátor: Q2); Független idézők száma: 26
- Tóth L, Váradi G, Borics A, Batta G, Kele Z, Vendrinszky Á, Tóth R, Ficze H, Tóth GK, Vágvölgyi C, Marx F, **Galgóczy L**. Anti-candidal activity and functional mapping of recombinant and synthetic *Neosartorya fischeri* antifungal protein 2 (NFAP2). *Front Microbiol*. 2018;9:393. doi: 10.3389/fmicb.2018.00393. IF₂₀₁₈: 4,259 (Scopus - Microbiology - SJR indikátor: Q1); Független idézők száma: 15
- Tóth L, Váradi G, Boros É, Borics A, Ficze H, Nagy I, Tóth GK, Rákhely G, Marx F, **Galgóczy L**. Biofungicidal potential of *Neosartorya (Aspergillus) fischeri* antifungal protein NFAP and novel synthetic γ -core peptides. *Front Microbiol*. 2020;11:820. doi: 10.3389/fmicb.2020.00820. IF₂₀₂₀: 5,64 (Microbiology - SJR indikátor: Q1); Független idézők száma: 17
- Tóth L, Poór P, Ördög A, Váradi G, Farkas A, Papp C, Bende G, Tóth GK, Rákhely G, Marx F, **Galgóczy L**. The combination of *Neosartorya (Aspergillus) fischeri* antifungal proteins with rationally designed γ -core peptide derivatives is effective for plant and crop protection. *Biocontrol (Dordr)*. 2022;67:249-262. doi: 10.1007/s10526-022-10132-y. IF₂₀₂₂: 2,5 (Scopus - Agronomy and Crop Science - SJR indikátor: Q2); Független idézők száma: 7

- Várad G, Kele Z, Czajlik A, Borics A, Bende G, Papp C, Rákhely G, Tóth GK, Batta G, **Galgóczy L**. Hard nut to crack: Solving the disulfide linkage pattern of the *Neosartorya (Aspergillus) fischeri* antifungal protein 2. *Protein Sci.* 2023;32:e4692. doi: 10.1002/pro.4692. IF₂₀₂₃: 4,5 (Scopus - Biochemistry - SJR indikátor: D1); Független idézők száma: 0
- Várad G, Bende G, Borics A, Dán K, Rákhely G, Tóth GK, **Galgóczy L**. Rational design of antifungal peptides based on the γ -core motif of a *Neosartorya (Aspergillus) fischeri* antifungal protein to improve structural integrity, efficacy, and spectrum. *ACS Omega.* 2024;9:7206-7214. doi: 10.1021/acsomega.3c09377. IF₂₀₂₃: 3,7; (Scopus - Chemistry (miscellaneous) - SJR indikátor: Q2); Független idézők száma: 1
- Virágh M, Vörös D, Kele Z, Kovács L, Fizil Á, Lakatos G, Maróti G, Batta G, Vágvolgyi C, **Galgóczy L**. Production of a defensin-like antifungal protein NFAP from *Neosartorya fischeri* in *Pichia pastoris* and its antifungal activity against filamentous fungal isolates from human infections. *Protein Expr Purif.* 2014;94:79-84. doi: 10.1016/j.pep.2013.11.003. IF₂₀₁₄: 1,695 (Scopus - Biotechnology - SJR indikátor: Q2); Független idézők száma: 17
- Virágh M, Marton A, Vizler C, Tóth L, Vágvolgyi C, Marx F, **Galgóczy L**. Insight into the antifungal mechanism of *Neosartorya fischeri* antifungal protein. *Protein Cell.* 2015;6:518-528. doi: 10.1007/s13238-015-0167-z. IF₂₀₁₅: 3,817 (Scopus - Medicine (miscellaneous) - SJR indikátor: D1); Független idézők száma: 21

Az értekezés alapját képező publikációk összesített impakt faktora: 70,206

Az értekezés alapját képező publikációkra kapott független hivatkozások száma: 272

5.2. Az értekezés témájához kapcsolódó, a dolgozatban idézett publikációk

- Czajlik A, Holzknecht J, **Galgóczy L**, Tóth L, Poór P, Ördög A, Várad G, Kühbacher A, Borics A, Tóth GK, Marx F, Batta G. Solution structure, dynamics, and new antifungal aspects of the cysteine-rich miniprotein PAFC. *Int J Mol Sci.* 2021;22:1183. doi: 10.3390/ijms22031183. IF₂₀₂₁: 6,208 (Scopus - Spectroscopy - SJR indikátor: D1); Független idézők száma: 6
- Holzknecht J, Kühbacher A, Papp C, Farkas A, Várad G, Marcos JF, Manzanares P, Tóth GK, **Galgóczy L**, Marx F. The *Penicillium chrysogenum* Q176 antimicrobial protein PAFC effectively inhibits the growth of the opportunistic human pathogen *Candida albicans*. *J Fungi (Basel).* 2020;6(3):141. doi: 10.3390/jof6030141. IF₂₀₂₀: 5,816 (Scopus - Microbiology (medical) - SJR indikátor: Q1); Független idézők száma: 10
- Huber A, Hajdu D, Bratschun-Khan D, Gáspári Z, Varbanov M, Philippot S, Fizil Á, Czajlik A, Kele Z, Sonderegger C, **Galgóczy L**, Bodor A, Marx F, Batta G. New antimicrobial potential and structural properties of PAFB: A cationic, cysteine-rich protein from *Penicillium*

- chrysogenum* Q176. Sci Rep. 2018;8:1751. doi: 10.1038/s41598-018-20002-2. IF₂₀₁₈: 4,011 (Scopus - Multidisciplinary - SJR indikátor: D1); Független idézők száma: 44
- Huber A, **Galgóczy** L, Váradi G, Holzknicht J, Kakar A, Malanovic N, Leber R, Koch J, Keller MA, Batta G, Tóth GK, Marx F. Two small, cysteine-rich and cationic antifungal proteins from *Penicillium chrysogenum*: A comparative study of PAF and PAFB. Biochim Biophys Acta Biomembr. 2020;1862:183246. doi: 10.1016/j.bbamem.2020.183246. IF₂₀₂₀: 3,747 (Scopus - Biophysics - SJR indikátor: Q1); Független idézők száma: 20
- Galgóczy** L, Papp T, Lukács G, Leiter E, Pócsi I, Vágvölgyi C. Interactions between statins and *Penicillium chrysogenum* antifungal protein (PAF) to inhibit the germination of sporangiospores of different sensitive Zygomycetes. FEMS Microbiol Lett. 2007;270:109-115. doi: 10.1111/j.1574-6968.2007.00661.x. IF₂₀₀₇: 2,274 (Scopus - Microbiology - SJR indikátor: Q2); Független idézők száma: 23
- Galgóczy** L, Papp T, Pócsi I, Hegedus N, Vágvölgyi C. *In vitro* activity of *Penicillium chrysogenum* antifungal protein (PAF) and its combination with fluconazole against different dermatophytes. Antonie Van Leeuwenhoek. 2008;94:463-470. doi: 10.1007/s10482-008-9263-x. IF₂₀₀₈: 1,673 (Scopus - Medicine (miscellaneous) - SJR indikátor: Q1); Független idézők száma: 10
- Galgóczy** L, Kovács L, Vágvölgyi C. Defensin-like antifungal proteins secreted by filamentous fungi. In: Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology, Vol. 1., Microbiology Book Series-Number 2, ed. (Szerk.: Méndez-Vilas A) Formatex, Bajadoz, Spain (2010): 550-559. ISBN-13: 978-84-614-6195-0. Független idézők száma: 9
- Galgóczy** L, Virágh M, Kovács L, Tóth L, Vágvölgyi C. Potential applications of filamentous fungus derived β -defensin-like antifungal proteins in agriculture. In: Review on agriculture and rural development, (2) 1. (2013): 217-223. ISSN 2063-4803. Független idézők száma: 0
- Galgóczy** L, Yap A, Marx F. Cysteine-rich antifungal proteins from filamentous fungi are promising bioactive natural compounds in anti-*Candida* therapy. Isr J Chem. 2019;59:360-370. doi: 10.1002/ijch.201800168. IF₂₀₁₉: 2,32 (Scopus - Medicine (miscellaneous) - SJR indikátor: D1); Független idézők száma: 11
- Sonderegger C, Váradi G, **Galgóczy** L, Kocsubé S, Posch W, Borics A, Dubrac S, Tóth GK, Wilflingseder D, Marx F. The evolutionary conserved γ -core motif influences the anti-*Candida* activity of the *Penicillium chrysogenum* antifungal protein PAF. Front Microbiol. 2018;9:1655. doi: 10.3389/fmicb.2018.01655. IF₂₀₁₈: 4,259 (Scopus - Chemistry (miscellaneous) - SJR indikátor: Q1); Független idézők száma: 9

Tóth L, Boros É, Poór P, Ördög A, Kele Z, Váradi G, Holzknicht J, Bratschun-Khan D, Nagy I, Tóth GK, Rákhely G, Marx F, **Galgóczy L**. The potential use of the *Penicillium chrysogenum* antifungal protein PAF, the designed variant PAF^{opt} and its γ -core peptide P γ ^{opt} in plant protection. *Microb Biotechnol.* 2020;13:1403-1414. doi: 10.1111/1751-7915.13559. IF₂₀₂₀: 5,813 (Scopus - Applied Microbiology and Biotechnology - SJR indikátor: Q1); Független idézők száma: 14

Váradi G, Tóth GK, Kele Z, **Galgóczy L**, Fizil Á, Batta G. Synthesis of PAF, an antifungal protein from *P. chrysogenum*, by native chemical ligation: native disulfide pattern and fold obtained upon oxidative refolding. *Chemistry.* 2013;19:12684-12692. doi: 10.1002/chem.201301098. IF₂₀₁₃: 5,696 (Scopus - Chemistry (miscellaneous) - SJR indikátor: D1); Független idézők száma: 15

Váradi G, Batta G, **Galgóczy L**, Hajdu D, Fizil Á, Czajlik A, Virágh M, Kele Z, Meyer V, Jung S, Marx F, Tóth GK. Confirmation of the disulfide connectivity and strategies for chemical synthesis of the four-disulfide-bond-stabilized *Aspergillus giganteus* antifungal protein, AFP. *J Nat Prod.* 2023;86:782-790. doi: 10.1021/acs.jnatprod.2c00954. IF₂₀₂₃: 3,3 (Scopus - Organic Chemistry - SJR indikátor: Q1); Független idézők száma: 1

Az értekezés témájához kapcsolódó, a dolgozatban idézett publikációk összesített impakt faktora: 45,117

Az értekezés témájához kapcsolódó, a dolgozatban idézett publikációkra kapott független hivatkozások száma: 172

Az értekezés alapjául szolgáló és a témájához kapcsolódó, a dolgozatban idézett publikációk összesített impakt faktora: 115,323

Az értekezés alapjául szolgáló és a témájához kapcsolódó, a dolgozatban idézett publikációkra kapott független hivatkozások száma: 444

6. Tudománymetriai adatok

A 10002102-es számú MTMT-azonosító alapján.

Tudományos folyóiratcikkek száma: 73

Az első, vagy utolsó szerzős tudományos folyóiratcikkek száma: 34

Összesített impakt faktor: 196,564

Összes közleményre kapott független hivatkozások száma: 1517

Független hivatkozások száma a disszertáció és egyéb típusú idézők nélkül: 1338

Az első, vagy utolsó szerzős tudományos folyóiratcikkek összesített impakt faktora: 81,473

Az első, vagy utolsó szerzős tudományos folyóiratcikkekre kapott független hivatkozások száma: 483

Az értekezés alapjául szolgáló első, vagy utolsó szerzős tudományos folyóiratcikkek összesített impakt faktora: 51,939

Az értekezés alapjául szolgáló első, vagy utolsó szerzős tudományos folyóiratcikkekre kapott független hivatkozások száma: 222

Hirsch index: 25

7. Irodalomjegyzék

- Barlow G, és mtsai. Infectious diseases In: Kumar and Clark's Clinical Medicine (10th ed.) (Szerk.: Feather A, Randall D, Waterhouse M.). Elsevier (2020): 559-563. ISBN 978-0-7020-7870-5.
- Batta G, és mtsai. Functional aspects of the solution structure and dynamics of PAF--a highly-stable antifungal protein from *Penicillium chrysogenum*. FEBS J. 2009;276:2875-2890.
- Beckerman J, és mtsai. Fifty years of fungicide Development, deployment, and future use. Phytopathology. 2023;113:694-706.
- Belanger ES, és mtsai. Combination antifungal therapy: When, where, and why. Curr Clin Micro Rpt. 2015;2:67-75.
- Benedict K, és mtsai. Economic burden of fungal diseases in the United States. Open Forum Infect Dis. 2022;9:ofac097.
- Binder U, és mtsai. The antifungal protein PAF interferes with PKC/MPK and cAMP/PKA signalling of *Aspergillus nidulans*. Mol Microbiol. 2010;75:294-307.
- Binder U, és mtsai. The *Aspergillus giganteus* antifungal protein AFP_{NNS353} activates the cell wall integrity pathway and perturbs calcium homeostasis. BMC Microbiol. 2011;11:209.
- Brauer VS, és mtsai. Antifungal agents in agriculture: Friends and foes of public health. Biomolecules. 2019;9:521.
- Brito C, és mtsai. Assessing the control of postharvest gray mold disease on tomato fruit using mixtures of essential oils and their respective hydrolates. Plants (Basel). 2021;10:1719.
- Camilloni C, és mtsai. Towards a structural biology of the hydrophobic effect in protein folding. Sci Rep. 2016;6:28285.
- Carter CW Jr, és mtsai. Four-body potentials reveal protein-specific correlations to stability changes caused by hydrophobic core mutations. J Mol Biol. 2001;311:625-638.
- Cavalheiro M és Teixeira MC. *Candida* biofilms: Threats, challenges, and promising strategies. Front Med. 2018;5:28.
- Cheung MS, és mtsai. Protein folding mediated by solvation: water expulsion and formation of the hydrophobic core occur after the structural collapse. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002;99:685-690.
- Ciociola T, és mtsai. Natural and synthetic peptides with antifungal activity. Future Med Chem. 2016;8:1413-1433.
- Dán K, és mtsai. Isolation and identification of fungal biodeteriogens from the wall of a cultural heritage church and potential applicability of antifungal proteins in protection. J. Cult. Herit. 2024;67:194-202.
- de Ullivarri MF, és mtsai. Antifungal peptides as therapeutic agents. Front Cell Infect Microbiol. 2020;10:105.
- Denning DW. Antifungal drug resistance: an update. Eur J Hosp Pharm. 2022;29:109-112.
- Denning DW. Global incidence and mortality of severe fungal disease. Lancet Infect Dis. 2024;24:e428-e438.
- Európai Bizottság. 2021. A bizottság közleménye az Európai Parlamentnek, a Tanácsnak, az Európai Gazdasági Szociális Bizottságnak és a Régiók Bizottságának - Bolygónk egészségessé tétele mindenki számára Uniós cselekvési terv: „Út a szennyezőanyag-mentes levegő, víz és talaj felé”. Brüsszel, 2021.5.12. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HU/TXT/HTML/?uri=CELEX:52021DC0400>
- Fan F, és mtsai. Multiple fungicide resistance in *Botrytis cinerea* from greenhouse strawberries in Hubei province, China. Plant Dis. 2017;101:601-606.
- Fisher MC, és mtsai. Threats posed by the fungal kingdom to humans, wildlife, and agriculture. mBio. 2020;11:e00449-20.
- Fisher MC és Denning DW. The WHO fungal priority pathogens list as a game-changer. Nat Rev Microbiol. 2023;21:211-212.
- Galgóczy L, és mtsai. Interactions between statins and *Penicillium chrysogenum* antifungal protein (PAF) to inhibit the germination of sporangiospores of different sensitive Zygomycetes. FEMS Microbiol Lett. 2007;270:109-115.
- Galgóczy L, és mtsai. *In vitro* activity of *Penicillium chrysogenum* antifungal protein (PAF) and its combination with fluconazole against different dermatophytes. Antonie Van Leeuwenhoek. 2008;94:463-470.

- Galgóczy L, és mtsai. Defensin-like antifungal proteins secreted by filamentous fungi. In: Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology, Vol. 1., Microbiology Book Series-Number 2, ed. (Szerk.: Méndez-Vilas A) Formatex, Bajadoz, Spain (2010): 550-559. ISBN-13: 978-84-614-6195-0
- Galgóczy L, és mtsai. Potential applications of filamentous fungus derived β -defensin-like antifungal proteins in agriculture. In: Review on agriculture and rural development, (2) 1. (2013a): 217-223. ISSN 2063-4803
- Galgóczy L, és mtsai. Investigation of the antimicrobial effect of *Neosartorya fischeri* antifungal protein (NFAP) after heterologous expression in *Aspergillus nidulans*. Microbiology (Reading). 2013b;159:411-419.
- Galgóczy L, és mtsai. Structural determinants of *Neosartorya fischeri* antifungal protein (NFAP) for folding, stability and antifungal activity. Sci Rep. 2017;7:1963.
- Galgóczy L, és mtsai. Cysteine-rich antifungal proteins from filamentous fungi are promising bioactive natural compounds in anti-*Candida* therapy. Isr J Chem. 2019;59:360-370.
- Gandía M, és mtsai. Potential of antifungal proteins (AFPs) to control *Penicillium* postharvest fruit decay. J Fungi (Basel). 2021;7:449.
- Garrigues S, és mtsai. Mapping and identification of antifungal peptides in the putative antifungal protein AfpB from the filamentous fungus *Penicillium digitatum*. Front Microbiol. 2017;8:592.
- Gasteiger E, és mtsai. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In: The Proteomics Protocols Handbook (Szerk.: Walker JM). Humana Press Totowa, NJ, USA (2005): 571-607.
- Geisen R. *P. nalgiovense* carries a gene which is homologous to the *paf* gene of *P. chrysogenum* which codes for an antifungal peptide. Int J Food Microbiol. 2000;62:95-101.
- Gun Lee D, és mtsai. Isolation and characterization of a novel antifungal peptide from *Aspergillus niger*. Biochem Biophys Res Commun. 1999;263:646-651.
- Hagen S, és mtsai. The antifungal protein AFP from *Aspergillus giganteus* inhibits chitin synthesis in sensitive fungi. Appl Environ Microbiol. 2007;73:2128-2134.
- Hajdu D, és mtsai. Solution structure and novel insights into phylogeny and mode of action of the *Neosartorya (Aspergillus) fischeri* antifungal protein (NFAP). Int J Biol Macromol. 2019;129:511-522.
- Harper LA, és mtsai. Fungicide resistance characterized across seven modes of action in *Botrytis cinerea* isolated from Australian vineyards. Pest Manag Sci. 2022;78:1326-1340.
- Hisashi M és Fuse S. Recent advances in the solid- and solution-phase synthesis of peptides and proteins using microflow technology. Res Dev. 2022;26:1751-1765.
- Holzknacht J, és mtsai. Small, cationic antifungal proteins from filamentous fungi inhibit *Candida albicans* growth in 3D skin infection models. Microbiol Spectr. 2022;10:e0029922.
- Huber A, és mtsai. New antimicrobial potential and structural properties of PAFB: A cationic, cysteine-rich protein from *Penicillium chrysogenum* Q176. Sci Rep. 2018;8:1751.
- Huber A, és mtsai. Two small, cysteine-rich and cationic antifungal proteins from *Penicillium chrysogenum*: A comparative study of PAF and PAFB. Biochim Biophys Acta Biomembr. 2020;1862:183246.
- Jelenić J, és mtsai. Growing our own poison—a vicious circle of more fungicides and more resistant *Botrytis cinerea* isolates. J Plant Pathol 2024. doi: 10.1007/s42161-023-01587-8
- Kainz K, és mtsai. Fungal infections in humans: the silent crisis. Microb Cell. 2020;7:143-145.
- Klüver E, és mtsai. Synthesis and structure-activity relationship of beta-defensins, multi-functional peptides of the immune system. J Pept Sci. 2006;12:243-257.
- Kovaleva V, és mtsai. Plant defensins from a structural perspective. Int J Mol Sci. 2020;21:5307.
- Kovács L, és mtsai. Isolation and characterization of *Neosartorya fischeri* antifungal protein (NFAP). Peptides. 2011;32:1724-1731.
- Kovács R, és mtsai. *In vivo* applicability of *Neosartorya fischeri* antifungal protein 2 (NFAP2) in treatment of vulvovaginal candidiasis. Antimicrob Agents Chemother. 2019;63:e01777-18.

- Kovács R, és mtsai. The *Neosartorya fischeri* antifungal protein 2 (NFAP2): A new potential weapon against multidrug-resistant *Candida auris* biofilms. *Int J Mol Sci.* 2021;22:771.
- Kudryashova E, és mtsai. Targeting and inactivation of bacterial toxins by human defensins. *Biol Chem.* 2017;398:1069-1085.
- Lacadena J, és mtsai. Characterization of the antifungal protein secreted by the mould *Aspergillus giganteus*. *Arch Biochem Biophys.* 1995;324:273-281.
- Lacerda AF, és mtsai. Antifungal defensins and their role in plant defense. *Front Microbiol.* 2014;5:116.
- Lass-Flörl C és Steixner S. The changing epidemiology of fungal infections. *Mol Aspects Med.* 2023;94:101215.
- Leiter É, és mtsai. Biofungicide utilizations of antifungal proteins of filamentous ascomycetes: current and foreseeable future developments. *Biocontrol (Dordr).* 2017;62:125-138.
- Li T, és mtsai. Activity and mechanism of action of antifungal peptides from microorganisms: A review. *Molecules.* 2021;26:3438.
- Lima AM, és mtsai. Plant antimicrobial peptides: An overview about classification, toxicity and clinical applications. *Int J Biol Macromol.* 2022;214:10-21.
- Lobo Vicente J, és mtsai. HBM4EU results support the Chemicals' Strategy for Sustainability and the Zero-Pollution Action Plan. *Int J Hyg Environ Health.* 2023;248:114111.
- Marchand PA. EU chemical plant protection products in 2023: Current state and perspectives. *Agrochemicals 2023;* 2:106-117.
- Martínez-Ruiz A, és mtsai. Characterization of a natural larger form of the antifungal protein (AFP) from *Aspergillus giganteus*. *Biochim Biophys Acta.* 1997;1340:81-87.
- Marx F, és mtsai. Cloning, structural organization and regulation of expression of the *Penicillium chrysogenum paf* gene encoding an abundantly secreted protein with antifungal activity. *Gene.* 1995;167:167-171.
- Marx F. Small, basic antifungal proteins secreted from filamentous ascomycetes: a comparative study regarding expression, structure, function and potential application. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2004;65:133-142.
- Mattar EH, és mtsai. Antimicrobial potentials and structural disorder of human and animal defensins. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2016;28:95-111.
- Moreno AB, és mtsai. Activity of the antifungal protein from *Aspergillus giganteus* against *Botrytis cinerea*. *Phytopathology.* 2003;93:1344-1353.
- Munson M, és mtsai. What makes a protein a protein? Hydrophobic core designs that specify stability and structural properties. *Protein Sci.* 1996;5:1584-1593.
- O'Leary JM, és mtsai. Identification and removal of O-linked and non-covalently linked sugars from recombinant protein produced using *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif.* 2004;38:217-227.
- Pettersen EF, és mtsai. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem.* 2004;25:1605-1612.
- Rautenbach M, és mtsai. Antifungal peptides: To be or not to be membrane active. *Biochimie.* 2016;130:132-145.
- Rupp S, és mtsai. Spread of *Botrytis cinerea* strains with multiple fungicide resistance in German horticulture. *Front Microbiol.* 2017;7:2075.
- Sagaram US, és mtsai. Structure-activity determinants in antifungal plant defensins MsDef1 and MtDef4 with different modes of action against *Fusarium graminearum*. *PLoS One.* 2011;6:e18550.
- Sahl HG, és mtsai. Mammalian defensins: structures and mechanism of antibiotic activity. *J Leukoc Biol.* 2005;77:466-475.
- Saleh I és Al-Thani R. Fungal food spoilage of supermarkets' displayed fruits. *Vet World.* 2019;12:1877-1883.
- Sonderegger C, és mtsai. A *Penicillium chrysogenum*-based expression system for the production of small, cysteine-rich antifungal proteins for structural and functional analyses. *Microb Cell Fact.* 2016;15:192.

- Sonderegger C, és mtsai. The evolutionary conserved γ -core motif influences the anti-*Candida* activity of the *Penicillium chrysogenum* antifungal protein PAF. *Front Microbiol.* 2018;9:1655.
- Spencer AC, és mtsai. Systemic fungal infections: A pharmacist/researcher perspective. *Fung Biol Rev.* 2023;44:100293.
- Struyfs C, és mtsai. Membrane-interacting antifungal peptides. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:649875.
- Stukenbrock E és Gurr S. Address the growing urgency of fungal disease in crops. *Nature.* 2023;617:31-34.
- Tang R, és mtsai. Application of antimicrobial peptides in plant protection: making use of the overlooked merits. *Front Plant Sci.* 2023;14:1139539.
- Taylor K, és mtsai. Structure-activity relationships in beta-defensin peptides. *Biopolymers.* 2008;90:1-7.
- Tóth L, és mtsai. NFAP2, a novel cysteine-rich anti-yeast protein from *Neosartorya fischeri* NRRL 181: isolation and characterization. *AMB Express.* 2016;6:75.
- Tóth L, és mtsai. Anti-candidal activity and functional mapping of recombinant and synthetic *Neosartorya fischeri* antifungal protein 2 (NFAP2). *Front Microbiol.* 2018;9:393.
- Tóth L, és mtsai. Biofungicidal potential of *Neosartorya (Aspergillus) fischeri* antifungal protein NFAP and novel synthetic γ -core peptides. *Front Microbiol.* 2020a;11:820.
- Tóth L, és mtsai. The potential use of the *Penicillium chrysogenum* antifungal protein PAF, the designed variant PAF^{opt} and its γ -core peptide P γ ^{opt} in plant protection. *Microb Biotechnol.* 2020b;13:1403-1414.
- Tóth L, és mtsai. The combination of *Neosartorya (Aspergillus) fischeri* antifungal proteins with rationally designed γ -core peptide derivatives is effective for plant and crop protection. *Biocontrol (Dordr).* 2022;67:249-262.
- Torres MDT, és mtsai. Peptide design principles for antimicrobial applications. *J Mol Biol.* 2019;431:3547-3567.
- Váradí G, és mtsai. Synthesis of PAF, an antifungal protein from *P. chrysogenum*, by native chemical ligation: native disulfide pattern and fold obtained upon oxidative refolding. *Chemistry.* 2013;19:12684-12692.
- Váradí G, és mtsai. Hard nut to crack: Solving the disulfide linkage pattern of the *Neosartorya (Aspergillus) fischeri* antifungal protein 2. *Protein Sci.* 2023b;32:e4692.
- Váradí G, és mtsai. Rational design of antifungal peptides based on the γ -core motif of a *Neosartorya (Aspergillus) fischeri* antifungal protein to improve structural integrity, efficacy, and spectrum. *ACS Omega.* 2024;9:7206-7214.
- Virágh M, és mtsai. Insight into the antifungal mechanism of *Neosartorya fischeri* antifungal protein. *Protein Cell.* 2015;6:518-528.
- Weber RWS és Petridis A. Fungicide resistance in *Botrytis* spp. and regional strategies for its management in Northern European strawberry production. *BioTech (Basel).* 2023;12:64.
- Williamson B, és mtsai. *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Mol Plant Pathol.* 2007;8:561-580.
- Wnendt S, és mtsai. Molecular cloning, sequence analysis and expression of the gene encoding an antifungal-protein from *Aspergillus giganteus*. *Curr Genet.* 1994;25:519-523.
- World Health Organization. 2022. WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action. ISBN: 978-92-4-006024-1.
- World Resources Institute. 2018. Creating a sustainable food future - A menu of solutions to feed nearly 10 billion people by 2050. ISBN 978-1-56973-953-6.
- Yin Y, és mtsai. Fungicide resistance: Progress in understanding mechanism, monitoring, and management. *Phytopathology.* 2023;113:707-718.
- Yount NY és Yeaman MR. Structural congruence among membrane-active host defense polypeptides of diverse phylogeny. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1758:1373-1386.