



Dr. Galgóczi László MTA doktora pályázat

Válaszok Prof. Dr. Emódy Levente bírálataira

Tisztelt Professzor Úr!

Szeretném megköszönni az MTA doktori értekezésem alapos bírálatát, a támogató szavakat és a gondolatébresztő kérdéseket. A kérdésekre sorrendben az alábbiakban szeretnék válaszolni.

1. Mi a két vizsgált vegyület molekulásúlya? Az ultrafiltrációs adatok szerint 30 kDa felett kell lenniük.

Válasz: Az NFAP és az NFAP2 *ExPASy ProtParam Tool*-al (<https://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam>) számított molekulatömege 6625,52 Da és 5564,32 Da. Ezek az adatok megtalálhatók a dolgozat 10. táblázatában. Azonban a hat cisztein között létrejövő három diszulfid-híd (-2 Da/diszulfid-híd) következtében a valós átlagos molekulatömegek *Peptide Mass Calculator*-ral (<https://www.peptidesynthetics.co.uk/tools/>) számítva 6619,510 Da és 5558,314 Da. A 30 kDa-os ultrafiltrációt követően az átfolyó frakciót használtuk fel a két fehérje izolálására kationcserés kromatográfiás módszerrel (Sonderegger és mtsai. 2016, Tóth és mtsai. 2018).

2. Efflux-pumpa mechanizmusok szerepet játszanak-e a két vizsgált fehérje gombasejten belüli „sorsában”?

Válasz: Jelenlegi ismereteink alapján az Eurotiomycetes-eredetű antifungális fehérjék (AFP-k) elsősorban a klasszikus szekréciós útvonalat követve jutnak ki a termelő szervezet extracelluláris környezetébe, nem efflux-pumpa mechanizmusok segítségével. Az AFP-k szintézise az endoplazmatikus retikulumban veszi kezdetét, ahol megtörténik a térszerkezet kialakulása, beleértve a diszulfid-hidak formálódását is. Ezt követően a fehérje a Golgi-készüléken keresztül transzportálódik, majd szekréciós vezikulák közvetítésével exocitózis útján távozik a sejtől. Ugyanakkor a szekréciós és efflux rendszerek szabályozása között lehet átfedés, különösen stresszhelyzetben vagy versengő környezeti feltételek esetén (Holzknecht és Marx 2024). A kérdést az AFP-kre érzékeny gombafajok szempontjából vizsgálva megállapítható, hogy az efflux pumpák AFP-kkel szembeni rezisztenciában játszott szerepe jelenleg nem kellően tisztázott. Az efflux pumpák, különösen az ABC (ATP-kötő kazetta) és az MFS (*major facilitator superfamily*) transzporterek képesek bizonyos bioaktív peptidok exportjára. Ez felveti annak lehetőségét, hogy bizonyos körülmények között vagy specifikus gombafajok esetén ezek a pumpák hozzájárulhatnak az AFP-kkel szembeni csökkent érzékenységhöz, különösen akkor, ha a fehérjék kellően kisméretűek vagy szerkezetileg

kompatibilisek a pumpák szubsztrátfelismerő mechanizmusával (Cannon és mtsai. 2009). Peptidekkel szemben mutatott ilyen jellegű rezisztenciamechanizmusok jól ismertek baktériumokban (Lee és mtsai. 2024), amely ismeretek kiterjeszthetők lehetnek a gombákra is.

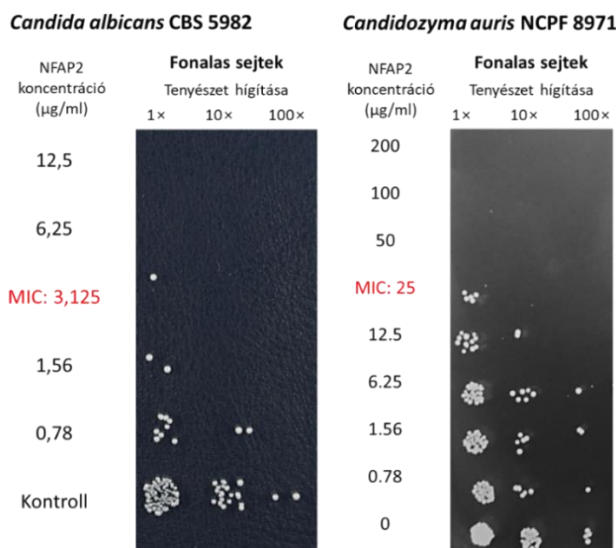
3. Milyen lehetőségeket lát a két fehérje alkalmazására a kertészet és szőlészet/borászat területén, figyelembe véve, hogy a gombák lehetnek károsak és hasznosak is a termény szempontjából.

Válasz: A dolgozatban ismertetett eredmények alapján az NFAP és NFAP2 fenntartható, növénybarát és fermentáció-kompatibilis alternatívát kínálnak a szintetikus fungicidek helyettesítésére és ígéretes lehetőségeket mutatnak a kertészet és szőlészet/borászat területén, különösen biofungicidként, amelyek kiegészíthetik vagy akár helyettesíthetik is a kémiai gombaölő szereket. Elsődleges alkalmazási terület lehet a betakarítás utáni terményvédelem. Az NFAP hatékonynak bizonyult a *Botrytis cinerea* ellen (Tóth és mtsai. 2020, 2022), ami raktározott zöldségek és gyümölcsök szürkerothadását okozza, míg az NFAP2 pedig a *Penicillium digitatum* és *Penicillium italicum* ellen, amelyek fő okozói a citrusfélék romlásának (Gandía és mtsai. 2021). Ezek alapján a NFAP és/vagy az NFAP2 alkalmas lehet a betakarított gyümölcsök (köztük a szőlő) és zöldségek eltarthatóságának meghosszabbítására, a gombás fertőzések megelőzésével. A ültetvényi növényvédelemben történő alkalmazhatóságuk korlátaira rávilágít a bírálói kérdés. Ökotoxikológiai vizsgálatok elengedhetetlenek annak tisztázásához, hogy az NFAP és NFAP2 környezetbe történő kijuttatása milyen mértékben befolyásolja a termesztett növények szempontjából kedvező rizoszférikus mikrobiom összetételét, különös tekintettel a gyökérrel asszociált (pl. mikorrhizát képző) gombafajokra. E tényezők pontos ismeretének hiányában az NFAP és NFAP2 növényvédelmi célú alkalmazhatósága elsősorban kontrollált, talajmentes körülmények között történő hidropónikus termesztési rendszerekben (például üvegházi paradicsomtermesztés) képzelhető el jelenleg, ahol az ökotoxikológiai hatásokat nem szükséges figyelembe venni. A szőlészet/borászat felől megközelítve a kérdést bizonyítottuk, hogy a NFAP hatékonyan gátolja a *B. cinerea* növekedését (Tóth és mtsai. 2020, 2022), ami egyaránt lehet előnyös vagy hátrányos. Ugyanis ez a Janus-arcú gomba, mint káros kórokozó a szőlőszemek szürkerothadását okozza nedves, hűvös időjárási körülmények között. Ugyanakkor az aszúbor készítéséhez elengedhetetlen nemes rothadást (aszúsodást) is kiváltja olyan időjárási körülmények között, amikor a páras, ködös reggeleket napos délutánok követnek. Éppen ezért az NFAP szőlőültetvényekre történő kijuttatását különös körültekintéssel, az aktuális időjárási körülmények figyelembevételével kell megtervezni amennyiben a cél prémium minőségű aszúbor előállítás. Az NFAP2 hatékonyan gátolja a *Saccharomyces cerevisiae* növekedését (Tóth és mtsai. 2016). Alkalmazása természetes eredetű adalékanyagként elképzelhető lehet a már palackozott bor újra erjedésének a megakadályozására. Ez a jelenség akkor következik be, ha a borban maradt erjeszthető cukor, és az élesztő még életképes. Ez zavarosságot, szénsavasodást, sőt palackrobbanást is okozhat.

4. A minimális gátló koncentrációt fényelnyelés alapján mérték. Történtek-e kioltással záruló vizsgálatok annak megállapítására, hogy a MIC feletti koncentrációk esetében csökkent-e a csíraszám az indító mennyiséghez képest? A hatásmechanizmus alapján élő hatás várható bizonyos koncentrációkban.

Válasz: Hasonló jellegű vizsgálatok már NFAP-val történtek. Egy 2020-ban megjelent közleményünkben (Tóth és mtsai. 2020) elektronikus cirkuláris dikroizmus spektroszkópiás vizsgálatához tartozó érzékenységi teszt eredményei alapján leírtuk, hogy minimális gátló koncentráción (MIC) alkalmazva az NFAP (100 µg/ml) csökkentette *Cladosporium herbarum* spórák telepkepző egységeinek (*colony forming unit*, CFU) a számát $2,2 \pm 0,7 \times 10^6$ -ról $1,5 \pm 0,7 \times 10^7$ -re, ami nem szignifikáns csökkenés. Ugyanakkor amennyiben az γNFAP-opt és a γNFAP-optGZ peptid-származékokat a MIC értékük nyolcszorosán alkalmaztuk, azok szignifikánsan csökkentették a CFU értékét: $2,2 \pm 0,7 \times 10^6$ -ról $1,3 \pm 0,6 \times 10^5$ -re ($p = 0,00621$), illetve $0,7 \pm 0,6 \times 10^5$ -re ($p = 0,00553$). Itt érdemes megjegyezni, hogy a kísérletbe bevitt spórák mennyisége a korábbi MIC érték meghatározása során alkalmazottnál három nagyságrenddel nagyobb volt, ami jelentősen befolyásolja egy érzékenységi teszt eredményét.

Az NFAP2 MIC érték (3,125 µg/ml) feletti sejtölő hatását *Candida albicans* korai stádiumú fonalas sejtjein vizsgáltuk úgy, hogy a kezelt kultúrából 10-es léptékű hígítási sort készítettünk és azokról 5-5 µl-t alacsony ionerősségű tápmez felületére cseppentettünk. A bemutatott **1. ábrán** jól látszik, hogy a mikrodilúciós tesztben mért MIC érték (3,125 µg/ml) felett sejtölő hatás érvényesül, ugyanis telepkepzés nem figyelhető meg. Ugyanez a jelenség korai fonalas stádiumú *Candidozyma auris* (korábban *Candida auris*) (MIC: 25 µg/ml) esetén is megfigyelhető volt (**1. ábra**).



1. ábra: *Candida albicans* és *Candidozyma auris* (korábban *Candida auris*) korai stádiumú fonalas sejtjeinek NFAP2 érzékenysége. 1×10^5 sejt/ml koncentrációjú sejtuszuszenziók 0,78–12,5 µg/ml vagy 0,78–200 µg/ml koncentrációjú NFAP2-vel alacsony ionerősségű tápközegben (0,5% glükóz, 0,25% élesztőkoncentrátum, 0,0125% pepton [m/V]) 37 °C-on, 2 órán keresztül, 160 rpm rázással kezelve. A kezelést követően a sejtek tápközeggel mosva, majd azok 10-es léptékű hígítási sorozataiból 5 µl alacsony ionerősségű agarlemezre cseppentve és 37 °C-on 24 órán át inkubálva.

5. 13. oldalon: „...a gomba és az emlőssejt között meglévő sejtfelépítés, életműködés és metabolizmus hasonlósága következtében nagyon nehéz gombára specifikus célpontot találni (Vanreppelen és mtsai. 2023, Puumala és mtsai. 2024). Ez utóbbin kívül egy új és hatékony antifungális terápiás szer kifejlesztése során még számtalan egyéb más kihívásnak is meg kell felelni.” Ha említésre került, akkor nevesítést érdemelne néhány egyéb kihívás.

Válasz: Valóban érdemes lett volna itt megemlíteni a további kihívásokat egy új és hatékony antifungális szer kifejlesztésével kapcsolatban a korlátozottan rendelkezésre álló gyógyszercélpontokon túl. Ezek az alábbiak (Niño-Vega és mtsai. 2024, Puumala és mtsai. 2024):

- A rezisztencia kialakulásának minimalizálása, ami viszonylag kis koncentrációban is gyors fungicid hatású szerek fejlesztését jelenti.
- A farmakokinetikai és farmakodinámiás korlátok leküzdése, vagyis a hatékony antifungális szereknek képesnek kell lenniük a nehezen hozzáférhető szövetek (pl. központi idegrendszer, szem, mélyebb szervek) elérésére, és ott hatékony koncentrációban való jelenlétre.
- A klinikai vizsgálatok összetettsége, ugyanis az invazív (egész szervezetet érintő) mikózisok gyakran kritikus állapotú, immunszuppresszált betegeket érintenek, akikkel szemben kontrollcsoport alkalmazása sok esetben nem megvalósítható vagy etikai kifogásokba ütközik.
- Diagnosztikai kihívások, mivel az invazív gombás fertőzések gyakran későn kerülnek felismerésre, ami rontja a megfelelő terápiás beavatkozás időzítését, és megnehezíti az új szerek hatékonyságának a mérését.
- Gazdasági megtérülés hiánya. A gombák okozta fertőzések előfordulása jóval ritkább, mint a bakteriális eredetűeké, így a gyógyszergyártók gyakran nem látnak megfelelő megtérülési lehetőséget a gombaellenes kutatás-fejlesztési programokban elsősorban akkor, ha gyors ütemben alakul ki rezisztencia a fejlesztetett antifungális szerrel szemben.
- Lassú fejlesztési folyamat. 2014 és 2024 között világszerte mindössze négy új gombaellenes hatóanyagot (itakonazol, otesekonazol, rezafungin és ibrexafungerp) hagytak jóvá, ami igen szerény ütem a gombás fertőzések fokozatosan növekvő fenyegetéséhez képest.

6. 17. oldalon: „A biofilm képzése által, egy planktonikus, élesztőforma állapotban érzékenynek tekinthető gomba klinikai szempontból akár rezisztenssé is válhat egy adott antifungális szerrel szemben.” A biofilm állapotában az antimikotikum hatásos koncentrációban való eljutása a gombasejt közelébe nehezített, de szerepet játszik a hifaképződés előrehaladása is a hatáscsökkenésben. Van adat arra vonatkozóan, hogy a vizsgálatnál későbbi biofilm állapotban mennyire hatásos a NFAP2 egyedül, vagy kombinációban?

Válasz: A dolgozatban az NFAP2 hatékonyságát 24 órás biofilmekkel kapcsolatban ismertettem. Idéntől rendelkezésre állnak ilyen jellegű adatok 48 órás *Candida albicans* és *Candidozyma auris* (korábban *Candida auris*) biofilmekkel kapcsolatban is, amiket az **1. táblázat** mutat be planktonikus sejtek érzékenységeivel összehasonlításban. Ez alapján

elmondható, hogy az NFAP2 képes teljes mértékben gátolni a *C. albicans* CBS 5982 planktonikus sejtek növekedését Roswell Park Memorial Institute-1640 (RPMI-1640) tápközegben, míg a szesszilis biofilm sejtekkel szemben 50%-os gátlás érhető el 800 µg/ml koncentrációnál. Ezzel szemben a planktonikus *C. auris* sejtek teljes növekedésgátlása nem érhető el RPMI-1640-ben, viszont azok növekedését az 50 µg/ml koncentrációjú NFAP2 50%-kal visszaszorítja. A szesszilis biofilm sejtek teljes növekedésgátlása ennél az izolátumnál sem érhető el a vizsgált koncentrációtartományon belül, viszont 50%-os növekedésgátlás igen, 200 µg/ml NFAP2 koncentrációt alkalmazva. Ilyen idős biofilmekkel szemben NFAP2-antifungális szer kombinációkat még nem teszteltünk.

1. táblázat: Az NFAP2 *in vitro* minimális (*minimum inhibitory concentration*, MIC) és 50%-os (IC₅₀) gátló koncentráció értékei klinikai szempontból releváns mikrodilúciós érzékenységi tesztben (CLSI M27-A3) *Candida albicans* és *Candidozyma auris* izolátumokkal szemben.

<i>Candida albicans</i> CBS 5982 <i>Candidozyma auris</i> NCPF 8971		
Planktonikus sejtek – MIC		
NFAP2	400 µg/ml	> 800 µg/ml
Planktonikus sejtek – IC₅₀		
	200 µg/ml	50 µg/ml
Szesszilis biofilm sejtek – MIC		
NFAP2	> 1600 µg/ml	> 1600 µg/ml
Szesszilis biofilm sejtek – IC₅₀		
	800 µg/ml	200 µg/ml

MIC: Teljes növekedésgátlás/metabolikus aktivitás gátlás-biofilm (növekedés/metabolikus aktivitás-biofilm ≤ 5%, amennyiben a kezeletlen kontrollé 100%).

IC₅₀: 50%-os növekedés/metabolikus aktivitás gátlás-biofilm (növekedés/metabolikus aktivitás-biofilm ~50%, amennyiben a kezeletlen kontrollé 100%).

Ennél a bírálói kérdésnél szeretném megjegyezni, hogy az NFAP2 legnagyobb jelentőségét a *Candida* biofilm kialakulásnak a megelőzésében látom. Ugyanis, közlés alatt álló transzkriptomikai adataink rávilágítottak arra, hogy az NFAP2 képes lehet megakadályozni a planktonikus sejtek fonalas formába történő átalakulását, továbbá a korai stádiumú fonalas sejtek rázatott tenyészetben érzékenyebbnek bizonyultak az NFAP2 gombaellenes hatásával szemben mint a planktonikus formák. *C. albicans* CBS 5982 törzs esetén a MIC érték a planktonikus forma esetében >12,5 µg/ml, míg a korai stádiumú fonalas forma esetében 3,125 µg/ml volt. Hasonló jelenség volt megfigyelhető *C. auris* NCPF 8971 törzsnél is, ahol a planktonikus forma MIC értéke >200 µg/ml, míg a fonalas sejteké 25 µg/ml volt, az OD₆₀₀-on mért fényelnyelési értékek alapján.

7. 131. oldalon: „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 szisztémás gombafertőzések növekvő számára és magas letalitására tekintettel a 2019-ben megjelent közlemény sikertelenségre utaló adatai óta alakultak-e ki elképzeléseik az NFAP2 szisztémásan alkalmazható hatásos kisserelési változatának kifejlesztésére?

Válasz: Igen, történtek ilyen jellegű fejlesztések, amelyek során az NFAP2-t zsírsavakhoz kapcsoljuk és/vagy nanorészecskékbe csomagoljuk. Ezekről a módosított változatokról és kisserelésekről, a kísérlet részleteiről és eredményeiről szabadalmi okok miatt jelenleg nem áll módomban további információt közölni.

8. Az egérkísérletek etikai engedélyére vonatkozóan csak az adott irodalmi hivatkozásban találtam utalást. Az egyszerűbb tájékozódás céljából érdemesnek tartottam volna a tézisekben is feltüntetni.

Válasz: Köszönöm szépen az észrevételt, valóban érdemes lett volna az egérkísérletekre vonatkozó etikai engedélyt a dolgozatban és tézisekben is feltüntetni a következő módon: Az állatok tartása a laboratóriumi állatok gondozására és felhasználására vonatkozó irányelvek szerint történt (National Research Council. 2011. Guide for the care and use of laboratory animals, 8th ed. National Academies Press, Washington, DC); a kísérleteket a Debreceni Egyetem Állatkísérleti Etikai Bizottsága hagyta jóvá (engedélyszám: 12/2014).

Legvégül szeretném ismét megköszönni Prof. Dr. Emődy Leventének az MTA doktori értekezésem pozitív bírálatát és az érdekes kérdéseket.

Szeged, 2025. július 03.



Dr. Galgóczi László Norbert

Irodalomjegyzék

- Cannon RD, Lamping E, Holmes AR, Niimi K, Baret PV, Keniya MV, és mtsai. Efflux-mediated antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev.* 2009;22:291–321.
- Gandía M, Kakar A, Giner-Llorca M, Holzkecht J, Martínez-Culebras P, Galgóczy L, és mtsai. Potential of antifungal proteins (AFPs) to control *Penicillium* postharvest fruit decay. *J Fungi (Basel).* 2021;7:449.
- Holzkecht J, Marx F. Navigating the fungal battlefield: cysteine-rich antifungal proteins and peptides from Eurotiales. *Front Fungal Biol.* 2024;5:1451455.
- Lee KK, Łapińska U, Tolle G, Micaletto M, Zhang B, Phetsang W, és mtsai. Heterogeneous efflux pump expression underpins phenotypic resistance to antimicrobial peptides eLife. 2024;13:RP99752.
- Niño-Vega GA, Padró-Villegas L, López-Romero E. New ground in antifungal discovery and therapy for invasive fungal infections: Innovations, challenges, and future directions. *J Fungi (Basel).* 2024;10:871.
- Puumala E, Fallah S, Robbins N, Cowen LE. Advancements and challenges in antifungal therapeutic development. *Clin Microbiol Rev.* 2024;37:e0014223.
- Sonderegger C, Galgóczy L, Garrigues S, Fizil Á, Borics A, Manzanares P, 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.
- Tóth L, Kele Z, Borics A, Nagy LG, Váradi G, Virágh M, 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, Váradi G, Borics A, Batta G, Kele Z, Vendrinszky Á, 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, Váradi G, Boros É, Borics A, Ficze H, Nagy I, és mtsai. Biofungicidal potential of *Neosartorya (Aspergillus) fischeri* antifungal protein NFAP and novel synthetic γ -core peptides. *Front Microbiol.* 2020;11:820.
- Tóth L, Poór P, Ördög A, Váradi G, Farkas A, Papp C, 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.