

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS

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. Rövidítések jegyzéke	4
2. Előszó	6
3. Bevezetés	8
4. Irodalmi áttekintés	11
4.1. Antifungális terápia	11
4.1.1. Az antifungális terápia jelenlegi kihívásai	13
4.1.2. Új lehetőségek az antifungális terápiában	22
4.2. Gombakórokozók elleni növényvédelem	29
4.2.1. A gombakórokozók elleni növényvédelem jelenlegi kihívásai	32
4.2.2. Új lehetőségek a gombakórokozók elleni növényvédelemben	36
4.3. Antifungális hatású peptidek	41
4.3.1. Antifungális hatású peptidek alkalmazási lehetőségei a gyógyászatban	44
4.3.2. Antifungális hatású peptidek alkalmazási lehetőségei a gombakórokozók elleni növényvédelemben	45
4.4. Eurotiomycetes-eredetű antifungális proteinek	46
4.4.1. Csoportosítás és szerkezet	46
4.4.2. Antifungális hatás, hatásmechanizmus és biológiai szerep	50
4.4.3. Gyakorlati alkalmazhatóság	53
5. Célkitűzések	56
6. Anyagok és módszerek	59
6.1. <i>Neosartorya fischeri</i> antifungális proteinek termelése és izolálása	59
6.2. <i>Neosartorya fischeri</i> antifungális proteinek spektruma és hatásmódja	60
6.3. <i>Neosartorya fischeri</i> antifungális proteinek szerkezete és funkcionális szerkezeti elemei	62
6.4. <i>Neosartorya fischeri</i> antifungális proteinek peptid-származékai	63
6.5. Toxicitásvizsgálatok növényeken és emlős sejteken, szövetmodellen, állatokon	63
6.6. Az NFAP és γ -core peptid-származékok növény- és terményvédelmi alkalmazhatósága	64
6.7. Az NFAP2 alkalmazhatósága felületi humán gombás fertőzések kezelésében	65

6.8. Bioinformatikai módszerek	65
6.9. Statisztikai módszerek	66
7. Eredmények és megvitatásuk	67
7.1. <i>Neosartorya fischeri</i> antifungális proteinek termelése és izolálása	67
7.1.1. Az NFAP termelése és izolálása	67
7.1.2. Az NFAP2 termelése és izolálása	70
7.2. A <i>Neosartorya fischeri</i> antifungális proteinek általános jellemzése	71
7.3. A <i>Neosartorya fischeri</i> antifungális proteinek spektruma, kölsönhatása antifungális szerekkel és egymással	72
7.3.1. A <i>Neosartorya fischeri</i> antifungális proteinek spektruma planktonikus gombasejtekkel és spórákkal szemben	72
7.3.2. Az NFAP2 spektruma szesszilis, biofilm alkotó gombasejtekkel szemben	76
7.3.3. Az NFAP2 kölsönhatása klinikumban alkalmazott antifungális szerekkel	76
7.3.4. Az NFAP és NFAP2 kölsönhatása	77
7.3.5. Környezeti faktorok és proteolitikus enzimek hatása a <i>Neosartorya fischeri</i> antifungális proteinek hatékonyságára	80
7.4. A <i>Neosartorya fischeri</i> antifungális proteinek hatásmódja	83
7.4.1. Az NFAP hatásmódja <i>Aspergillus nidulans</i> -on	83
7.4.2. Az NFAP2 hatásmódja <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -n és <i>Candida albicans</i> -on	90
7.5. A <i>Neosartorya fischeri</i> antifungális proteinek szerkezete és hatásmódja közötti összefüggés	92
7.5.1. Az NFAP szerkezete és hatásmódja közötti összefüggés	92
7.5.2. Az NFAP2 szerkezete és hatásmódja közötti összefüggés	101
7.6. <i>Neosartorya fischeri</i> antifungális proteinek peptid-származékai	106
7.6.1. Peptid-származékok tervezése a γ -core régió alapján	106
7.6.2. A γ -core régió alapján tervezett peptid-származékok antifungális spektruma és hatékonysága	107
7.6.3. Az NFAP γ -core régiója alapján tervezett peptid-származékok szerkezeti integritása és annak növelése	110
7.7. A <i>Neosartorya fischeri</i> antifungális proteinek toxicitása növényeken és állatokon	116

7.7.1. Toxicitásvizsgálatok növényeken	116
7.7.2. Toxicitásvizsgálatok emlős sejteken, szövetmodellen és állaton	119
7.8. A <i>Neosartorya fischeri</i> antifungális proteinek és peptid-származékaik gyakorlati alkalmazhatósága	125
7.8.1. Az NFAP és γ -core peptid-származékok növény- és terményvédelmi alkalmazhatósága	125
7.8.2. Az NFAP2 alkalmazhatósága felületi humán gombás fertőzések kezelésében	131
8. Következtetések és további tervek	138
9. A legfontosabb új eredmények összefoglalása	148
10. Köszönetnyilvánítás	152
11. Saját közlemények jegyzéke és tudománymetria adatok	156
11.1. Az értekezés alapjául szolgáló publikációk	156
11.2. Az értekezés témájához kapcsolódó, a dolgozatban idézett publikációk	159
11.3. Tudománymetria adatok	161
12. Irodalomjegyzék	162
13. Mellékletek	182

1. Rövidítések jegyzéke

Az alábbiakban a törzsszövegben előforduló rövidítéseknek a jegyzéke kerül megadásra. Tekintettel a dolgozat terjedelmére, a könnyebb követhetőség kedvéért minden rövidítés minden fő fejezetben egyszer kerül kiírásra és feloldásra abban az esetben amennyiben abban többször használt. Ugyanez vonatkozik a fajnevekben a nemzetség rövidítésére is. Azok a rövidítések, amelyek csak a táblázatokban és/vagy ábrákon szerepelnek, a táblázat lábjegyzetében vagy az ábraaláírásban kerülnek feloldásra.

γ^{NFAP} : az NFAP γ -core motívuma alapján tervezett peptid-származék

$\gamma^{\text{NFAP}}\text{-opt}$: a γ^{NFAP} emelt össztöltésű és hidrofilicitású változata

$\gamma^{\text{NFAP}}\text{-optGZ}$: a $\gamma^{\text{NFAP}}\text{-opt}$ GRAVY = -0,2 változata

$\gamma^{\text{NFAP}}\text{-optChZ}$: a $\gamma^{\text{NFAP}}\text{-opt}$ semleges össztöltésű változata

γ^{NFAP2} : az NFAP2 γ -core motívuma alapján tervezett peptid-származék

$\gamma^{\text{NFAP2}}\text{-opt}$: a γ^{NFAP2} emelt össztöltésű és hidrofilicitású változata

AFP: antifungális peptid/protein

AfpB: *Penicillium digitatum* antifungális protein B

AFPg: *Aspergillus giganteus* antifungális protein

Als3: agglutinin-szerű szekvenciával rendelkező protein

AnAFP: *Aspergillus niger* antifungális protein

BP: *Penicillium brevicompactum* „bubble” protein

C13S és C6S,C13S: az adott pozícióban cisztein-szerin cserélt peptid változat

COVID-19: Koronavírus-betegség 2019 (*Coronavirus disease 2019*)

CWI: sejtfalintegritás (*cell wall integrity*)

DAPI: 4',6-diamidin-2-fenilindol

ECD: elektronikus cirkuláris dikroizmus

EU: Európai Unió

ExPASy: *Expert Protein Analysis System*

FACS: fluoreszcencia-aktivált sejtválogatás analízis (*fluorescence activated cell sorting*)

FICI: frakcionális gátló koncentráció index (*fractional inhibitory concentration index*)

GTP: guanozin-trifoszfát

GRAS: alapvetően biztonságosnak ítélt (*generally recognized as safe*)

GRAVY: átlagos hidrofóbicitás érték (*grand average of hydropathy value*)

Gwt1: glükofoszfatidil-inozitol-kapcsolt sejtfal transzfer protein 1

Hsp90: hősokk fehérje 90 (*heat shock protein 90*)

IL: interleukin

LCM: alacsony ionerősségű tápközeg (*low cationic medium*)

LS: lucifer sárga CH (*lucifer yellow CH*)

MpkA: mitogén-aktivált protein-kináz

MIC: minimális gátló koncentráció (*minimum inhibitory concentration*)

M-CSF: makrofág kolónia stimuláló faktor (*macrophage colony-stimulating factor*)

NAF: *Penicillium nalgioense* antifungális protein

NFAP: *Neosartorya (Aspergillus) fischeri* antifungális protein

NFAP Δ C: cisztein-szerin cserélt NFAP változat

NFAP Δ h: hidrofób mag mutáns NFAP változat

NFAP Δ N: első öt N-terminális aminosav mutáns NFAP változat

NFAP2: *Neosartorya (Aspergillus) fischeri* antifungális protein 2

NMR: magmágneses rezonancia (*nuclear magnetic resonance*)

P γ ^{opt}: módosított PAF γ -core peptid-származék

PAF, PAFB, PAFB: *Penicillium chrysogenum* antifungális protein, B, és C

PAF^{opt}: PAF γ -core módosított változata

PDB: burgonyakivonat-glükóz tápoldat (*potato-dextrose broth*)

PeAfpA, PeAfpB, PeAfpC: *Penicillium expansum* antifungális protein A, B, és C

PI: propídiium-jodid (*propidium iodide*)

Pka: protein-kináz A

Pkc: protein-kináz C

Ras: patkány szarkóma vírus (*rat sarcoma virus*) GTPáz fehérje

ROS: reaktív oxigén származékok (*reactive oxygen species*)

RP-HPLC: fordított fázisú nagy teljesítményű folyadékkromatográfia (*reversed-phase high-performance liquid chromatography*)

RPMI-1640: Roswell Park Memorial Institute-1640 tápközeg

SEM: pásztázó elektronmikroszkópia (*scanning electron microscopy*)

S-tBu: S-*tert*-butil-alkohol, S-*tert*-butilált peptid változat

TUNEL: *terminal deoxynucleotidyl transferase biotin-dUTP nick end labeling*

UniProt: *Universal Protein Resource*

VVC: vulvovaginális candidiázis

2. Előszó

Úgy érzem, hogy az MTA doktori dolgozatom elején magyarázattal tartozom a címmel kapcsolatban. A cím talán általánosítja a munkát és sejtetheti annak nem célorientált voltát. Mindezek ellenére én mégis ezt a címet választottam. „Miért?” - teheti fel a dolgozatom olvasója a kérdést. Ennek oka a tudományos pályám alakulása, amit elsősorban -mintegy önálló életre kelve- a vizsgált objektumok alakítottak. Ugyanis az Eurotiomycetes tömlősgomba osztály tagjai által termelt kis molekulatömegű, extracelluláris antifungális fehérjék vizsgálata során született eredmények folyamatosan új kutatási lehetőségeket és irányvonalakat vetettek fel, amelyek megvalósítása során számtalan eltérő (nemcsak a mikrobiológia tudományához szorosan kapcsolódó) vizsgálati módszert sajátíthattam el vagy nyerhettem azokba bepillantást.

Eurotiomycetes-eredetű antifungális peptidekkel/proteinekkal (AFP) először 2003-ban, első éves PhD hallgató koromban dolgoztam, amikor is témavezetőmtől Prof. Dr. Vágvölgyi Csabától, Prof. Dr. Pócsi Istvánnal és Dr. Florentine Marx-szal együttműködésben egy *Penicillium chrysogenum*-eredetű antifungális fehérje (PAF) járomspórás gombákkal szemben mutatott hatékonyságának a vizsgálatát kaptam feladatul. Az elért eredményeken és a sikeres együttműködésen felbuzdulva az addigi még kezdeti stádiumban járó doktori témám rögtön megváltozott és a PAF-hoz hasonló fehérjéknek és kódoló génjeiknek a vizsgálatára irányult. Abban az időben a PAF-on kívül még csak másik kettő rokon fehérje volt ismert, egy az *Aspergillus giganteus*-ból és egy másik az *Aspergillus niger*-ből. Doktori dolgozatom és későbbi munkáim rámutattak arra, hogy a fent említettekhez hasonló fehérjék széleskörben elterjedtek az Eurotiomycetes osztály tagjai között és egy gomba nemhogy egy, de akár három eltérő tulajdonságú antifungális fehérjét is termelhet. Ismeretek a gombaellenes hatásmechanizmusokról, biológiai szerepükről, gyakorlati alkalmazhatóságukról nem igazán állt rendelkezésre abban az időben. Ezek vizsgálatára -immár posztdoktorként a kutatási témát megtartva- az akkor még *Neosartorya fischeri*-nek nevezett (mai nevén *Aspergillus fischeri*) NRRL 181 izolátum által termelt, két eltérő antifungális fehérjét (NFAP és NFAP2) választottam. Posztdoktori munkám első időszakában a fent említett kérdések megválaszolása során született eredmények rávilágítottak arra, hogy az Eurotiomycetes-eredetű antifungális fehérjék nagy gyakorlati jelentőséggel rendelkezhetnek és hasznosíthatók lehetnek új típusú, gombaellenes szerekként. Ez

utóbbi vizsgálatát a hagyományos antifungális gyógyszerekkel és növényvédő szerekkel szemben rezisztenciát mutató gombák által okozott fertőzések és kártételek ekkora már aggasztó méreteket öltő terjedése indokolta. Azonban ahhoz, hogy az Eurotiomycetes-eredetű AFP-k hatékony gombaellenes szerként egyáltalán szóba jöhessenek, számos feladatot meg kellett valósítani. Ilyen volt a nagy mennyiségű rekombináns termelésük gyógyszer- és élelmiszeripari szempontból alapvetően biztonságosnak ítélt expressziós rendszerben, hatásmechanizmusuk részletes megismerése, térszerkezetük megállapítása célzott tervezhetőségük, hatékonyságuk és antifungális spektrumuk növelése érdekében. Ezek után lehetőség nyílt bizonyos funkcionális fehérjeszerkezeti elemeik alapján antifungális hatással rendelkező peptid-származékok átgondolt és célzott tervezésére, szintézisére. A fehérjék és peptid-származékaik gyógyászati és növényvédelmi alkalmazhatóságának a vizsgálata megkövetelte olyan modellrendszerek kidolgozását, amelyekben ezeket tesztelni lehetett.

A fent említett célok megvalósítására egy ember tudása és tapasztalata kevés. Az évek során számos kiváló, nemcsak biológus munkatárstól kaptam szakmai segítséget, akik többségével a mai napig is együttműködésben dolgozok. Nekik részletekbe menő köszönetet a dolgozat végén mondok. Szerencsésnek mondhatom magam, hogy számos szakmai szervezet támogatásra méltónak ítélte munkámat, és 2010 óta a mai napig töretlenül anyagi forrást biztosítanak ehhez. Ezeknek a szervezeteknek is a dolgozat végén mondok köszönetet.

Az MTA doktori dolgozatomban a fent leírt egymásra épülő változatos posztdoktori munka főbb állomásait és azok tudományos eredményeit ismertetem a *Neosartorya (Aspergillus) fischeri* NRRL 181-es izolátum által termelt, két eltérő antifungális fehérje, az NFAP és NFAP2, továbbá peptid-származékaik vizsgálatán keresztül. Mivel a dolgozat tárgyát képező NFAP és NFAP2 még a natív termelő szervezet névváltozása előtt *Neosartorya fischeri* antifungális protein néven kerültek leírásra, a dolgozatban is ehhez a névhez ragaszkodom az *Aspergillus fischeri* antifungális protein terminológiával szemben, holott ez utóbbi pontosabb lenne.

3. 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). Ennek okait az érintett területek esetén külön-külön kell keresnünk.

Epidemiológiai vizsgálatok rámutattak arra, hogy a gyógyszer-rezisztens gombák által okozott végzetes kimenetelű humán fertőzések (mikózis) száma jelentősen megugrott az utóbbi két évtizedben elsősorban az immunszuppresszált betegek körében. Míg egy 2020. évi becslés alapján a mintegy évi 150 millió súlyos gombás fertőzésből körülbelül 1,7 millió végződik halállal (Kainz és mtsai. 2020), addigra egy újabb, 2024. évi tanulmány ez utóbbi számot már 3,8 millióra becsüli (Denning 2024). Habár egyes szerzők szerint ez a szám akár alul- vagy felülbecsült is lehet a nem rendszeres és nem megbízható epidemiológiai felmérések következtében (Ikuta és mtsai. 2024). Mindenesetre tisztán látszik az, hogy a végzetes kimenetelű gombás fertőzések esetszáma néhány év alatt megduplázódhatott. Ennek okait epidemiológiai változásokban (Flörl és Steixner 2023), az immunszuppresszált betegek növekvő és a hatékony antifungális gyógyszerek csökkenő számában egyaránt keresnünk kell (Spencer és mtsai. 2023). Immunkompetens egyének esetében a gombák elsősorban nem életveszélyes, viszont nehezen kezelhető, a kültakaró és a nyálkahártya felszínét érintő mikózisokat okozhatnak. Ezek a felszíni fertőzések az immunszuppresszált betegekben az egész szervezetet érintő, magas halálozási aránnyal együtt járó invazív fertőzéseké alakulhatnak (Reddy és mtsai. 2022). Ez utóbbiak 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). Az aggodalomra okot adó tények ellenére kevés figyelem irányult a problémára a közelmúltban, ezért a tudományos közösség döntéshozói szinten történő megoldást sürgetett (Rodrigues és Nosanchuk 2020). Ennek ellensúlyozására és

a közfigyelem felkeltésére az Egészségügyi Világszervezet (*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). Ez a közlemény mindamellett, hogy felsorolja azt a 19 gombafajt, amik a legnagyobb közegészségügyi kockázatot jelentik, 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, gombaszpecifikus 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. Felmérések alapján az évi termés 10-23%-a már a szántóföldön, míg további 10-20%-a raktári körülmények között kárba vész a gombák által okozott kártételek következtében. Ha ezt a veszteséget a humán ételmezés szempontjából öt legfontosabb termesztett 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 élelmiszymennyiséget (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). A monokultúras növénytermesztés mellett ennek egyik oka a klímaváltozás, aminek következtében olyan peszticid-rezisztens növényi kórokozó gombafajok jelennek meg azokon a mezőgazdasági területeken, ahol eddig ismeretlenek voltak. A folyamathoz hozzájárulhat, és nagymértékben gyorsíthatja

a globális kereskedelem kiszélesedése és egyre intenzívebbé válása, hisz ennek révén számos, más földrészen megjelenő rezisztens növénypatogén gombatörzs juthat el új mezőgazdasági területekre (Steinberg és Gurr 2020). Európában a problémát tovább súlyosbítja az, hogy a jelenleg érvényben lévő növényvédő szerekről szóló uniós jogszabályok alapján egyre több hatékony gombaölőszert kivonásra a kereskedelmi forgalomból és válik tiltottá (Marchand 2023a). 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).

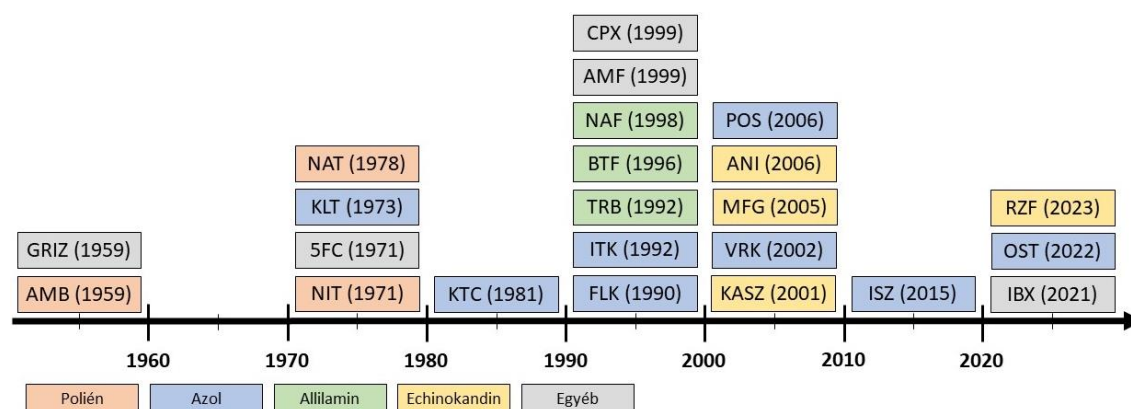
A természetben előforduló gombaellenes hatással rendelkező fehérjék és peptidek ígéretes gyógyszer- (de Ullivarri és mtsai. 2020), vagy növényvédőszerjelölt biomolekulákként jöhetnek szóba (Tang és mtsai. 2023). Kutatómunkánk során egy fonalas tömlősgomba által termelt két, kis molekulatömegű, ciszteinben gazdag, extracelluláris antifungális protein gyógyászati és növényvédelmi alkalmazási lehetőségeit vizsgáltuk a fent említett problémák megoldására. Ehhez először meg kellett valósítani a fehérjék nagy mennyiségű előállítását gyógyszer- és élelmiszeripari szempontból alapvetően biztonságosnak ítélt expressziós rendszerben azért, hogy vizsgálni lehessen antifungális spektrumukat és gombaellenes hatásmechanizmusukat, továbbá a szerkezetüket, a szerkezet-hatás összefüggést célzottan tervezett antifungálisan protein/peptid-származékok előállítása érdekében, majd modellrendszereket kellett kidolgozni gyógyászati és növényvédelmi alkalmazhatóságuk bizonyítására. A dolgozat ezen a sokrétű és összetett folyamaton kíséri végig az olvasót nem időrendi sorrendben, hanem logikai összefüggésben.

Az egyszerűsítés és könnyebb olvashatóság kedvéért a dolgozatban az antifungális peptidek és proteinek egyaránt AFP rövidítéssel kerülnek említésre. Tradicionálisan a 2-50 aminosav hosszúságú polipeptidláncokat peptideknek szokás nevezni, míg az e fölötti hosszúságúakat már proteineknek. A közös rövidítés-használatot indokolja az, hogy a dolgozat tárgyául szolgáló 57 és 52 aminosav hosszúságú antifungális proteinek (NFAP, illetve NFAP2) méretben és szerkezetben közel állnak a növényi defenzinokhoz, amikre peptidként hivatkozik a szakirodalom.

4. Irodalmi áttekintés

4.1. Antifungális terápia

A gombák okozta fertőzések (mikózisok) kezelésre jelenleg öt nagy antifungális szercsoport (1. poliének, 2. azolok, 3. allilaminok, 4. echinokandinok, és 5. egyéb) áll rendelkezésre eltérő hatásmechanizmussal, amelyek többsége a sejtmembránt vagy a sejtfalat célozza meg közvetlen vagy közvetett módon (**1. Táblázat**) (Sousa és mtsai. 2020). A súlyos, életet veszélyeztető invazív mikózisok (amikor a gomba okozta fertőzés az egész szervezetet érinti) terápiájára azonban csak az azolok, a poliének, az echinokandinok és a flucitozin alkalmasak és alkalmazottak mind a mai napig (Wall és Lopez-Ribot 2020a). Amennyiben egy idővonalon ábrázoljuk a terápiás antifungális szerek felfedezését és a klinikumba történő bevezetését, akkor tisztán látszik, hogy az 1950-es évektől mind a mai napig szinte csak ugyanazokat a korai antifungális szercsoportokat vagy ezeknek a valamilyen módon módosított változatait alkalmazzuk (**1. Ábra**) (Houšť és mtsai. 2020, Carmo és mtsai. 2023).



1. Ábra. Az Egyesült Államok Élelmiszer- és Gyógyszerügyi Hivatala (*Food and Drug Administration*) által általános terápiás célra bevezetett és mai napig alkalmazott antifungális szerek idővonala (2024. áprilisig bezárólag). 5FC: flucitozin, AMB: amfotericin B, AMF: amorolfín, ANI: anidulafungin, BTF: butenafin; KASZ: kaszpofungin, KLT: klotrimazol, CPX: ciklopirox, FLK: flukonazol, GRIZ: grizeofulvin, IBX: ibrexafungerp, ISZ: isavukonazol, ITK: itrakonazol, KTK: ketokonazol, MFG: mikafungin, NAF: naftifin, NAT: natamicin, NIT: nisztatin, OST: ostekonazol, POS: posakonazol, RZF: rezafungin, TRB: terbinafin, VRK: vorikonazol. Houšť és mtsai. (2020), továbbá Carmo és mtsai. (2023) által szerkesztett ábrák alapján összeállítva és saját szakirodalmi eredményekkel frissítve.

1. Táblázat. A gombák okozta fertőzések kezelésére általánosan használt antifungális szercsoportok, a leggyakrabban alkalmazott képviselőik, célpontjaik és hatásmódjuk.

Szercsoport	Képviselő	Célpont	Hatásmód
Poliének	Amfotericin B, Natamicin, Nisztatin	Sejtmembrán (közvetlen)	Ergoszterinhez kötve pórust képez a sejtmembránon, ami a sejt lízisét eredményezi.
Azolok	Imidazolok	Sejtmembrán (közvetett)	Az ergoszterin bioszintézist akadályozza a lanoszterin-14 α -demetiláz gátlásán keresztül, aminek következtében a sejtmembrán kiépülése és integritása sérül.
	Klotrimazol, Ketokonazol		
	Triazolok		
	Flukonazol, Itrakonazol, Posakonazol, Vorikonazol, Isavuconazol		
Allilaminok	Terbinafin, Naftifin, Butenafin	Sejtmembrán (közvetett)	Az ergoszterin bioszintézisét akadályozza a szkvalén-epoxidáz enzim gátlásával, aminek következtében a sejtmembrán kiépülése sérül. Toxikus melléktermékek keletkezése a szkvalénból.
Echinokandinok	Kaszpofungin, Mikafungin, Anidulafungin	Sejtfal (közvetett)	Az 1,3- β -D-glükán szintézist akadályozza az 1,3- β -glükán-szintáz specifikus gátlásán keresztül, aminek következtében a sejtfal kiépülése sérül.
Egyéb	Flucitozin	Nukleinsav szintézis (közvetett)	Metabolikus termékein keresztül a DNS és RNS szintézist gátolja.
	Grizeofulvin	Sejtosztódás (közvetlen)	Tubulinhoz kötődve megakadályozza a mikrotubulusok működését és ez által gátolja a sejtosztódást.
	Ciklopirox	Enzim kofaktorok (közvetlen)	Polivalens fém kationok kelátolásán keresztül számos, a sejt életműködésében szerepet játszó enzim működését gátolja
	Amorolfín	Sejtmembrán (közvetett)	Az ergoszterin bioszintézist akadályozza a Δ 14-szterin-reduktáz és a Δ 7- Δ 8-koleszterin-izomeráz gátlásán keresztül, aminek következtében a sejtmembrán kiépülése sérül.

Sousa és mtsai. (2020) által szerkesztett táblázat alapján összeállítva és saját szakirodalmi eredményekkel frissítve.

Az **1. Ábrán** az is kitűnik, hogy az utóbbi 10 évben mindösszesen három új antifungális szer (ibrexafungerp, ostekonazol, rezafungin) az eddigihez hasonló hatásmóddal és célponttal került terápiás bevezetésre annak ellenére, hogy a hasonló hatásmódú szerekkel szemben rezisztenciát mutató gombatörzsek által okozott fertőzések esetszáma folyamatosan emelkedik (Fisher és mtsai. 2022). A **2. Táblázat** ezeket az újonnan bevezetett antifungális szereket és hatásmechanizmusukat foglalja össze.

2. Táblázat. Az Egyesült Államok Élelmiszer- és Gyógyszerügyi Hivatala (*Food and Drug Administration*) által az utóbbi 10 évben a gombás fertőzések kezelésére bevezetett antifungális szerek.

Szercsoport	Képviselő	Célpont	Hatásmód	Referencia
Azolok	Tetrazolok	Sejtmembrán (közvetett)	Az ergoszterin bioszintézist akadályozza a lanoszterin-14 α -demetiláz gátlásán keresztül, aminek következtében a sejtmembrán kiépülése és integritása sérül.	Hoy 2022
	Ostekonazol			
Echinokandinok	Rezafungin	Sejtfal (közvetett)	Az 1,3- β -D-glükán szintézist akadályozza az 1,3- β -glükán-szintáz specifikus gátlásán keresztül, aminek következtében a sejtfal kiépülése sérül.	Syed 2023
Egyéb (Triterpenoid)	Ibrexafungerp			Lee 2021

A biztonságosan alkalmazható, hatékony és új hatásmechanizmusú antifungális készítmények alacsony számának oka lehet egyrészt a gyógyszergyárak érdektelensége, másrészt pedig az, hogy kifejlesztésük sokkal több nehézségbe ütközik az antibakteriális szerekéhez képest, elsősorban azért mert 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.

4.1.1. Az antifungális terápia jelenlegi kihívásai

Az utóbbi évek epidemiológiai felmérései tisztán láttatják, hogy a ma használtakétól alapvetően eltérő stratégiák kidolgozása szükséges a gombák okozta fertőzések hatékony kezelésére (Fisher és mtsai. 2022). Az ilyen új antifungális terápiás stratégiáknak követnie kell az epidemiológiai változások következtében újonnan felbukkanó kórokozók érzékenységi profilját, ami maga után vonja olyan eltérő hatásmódú antifungális szerek szükségességét, amik hatékonyak gomba biofilmekkel szemben is, minimális eséllyel alakul ki rezisztencia ellenük, és gombákra specifikus hatásmódjuk van, azért hogy ne okozzanak súlyos mellékhatásokat. Ezeken kívül szükséges még, hogy megfelelő farmakokinetikai és -dinámiai tulajdonságokkal rendelkezzenek, hogy alkalmasak legyenek az invazív fertőzések kezelésére. További nem elhanyagolható követelmény a viszonylag alacsony előállítási költség és az, hogy hozzáférhetőek legyenek a gombák okozta fertőzések által leginkább sújtott földrajzi területeken, amik általában a világ szegényebb országai (Puumala és mtsai. 2024).

Epidemiológiai változások

A gombák okozta fertőzések epidemiológiájában az utóbbi években bekövetkező jelentős változás egy összetett jelenség és számos okra vezethető vissza. Ezek közül a legfontosabbak a klímaváltozás, a profilaktikus és nem megfelelő antifungális szerhasználat, és a COVID-19 (Koronavírus-betegség 2019, *Coronavirus disease 2019*) világjárvány.

A korábbi időjárási körülményeink jelentősen átalakultak az utóbbi években a klímaváltozás következtében. Ennek egyik legszembetűnőbb jele a globális felmelegedés. A gombák nagymértékben képesek alkalmazkodni a fokozatosan emelkedő környezeti hőmérséklethez, ami termotoleránssá teszi őket. A környezetinél magasabb termotolerancia egy virulenciafaktor, ami fertőzővé tehet olyan gombafajokat, amik kórokozóként eddig nem voltak ismertek. A megváltozott környezeti körülmények hatására olyan gombafajok vagy azok vektorai elterjedhetnek olyan területeken is, ahol eddig nem voltak jelen. A klímaváltozással együtt járó szélsőséges időjárási hatások (pl. áradás, vihar, hurrikán) nagymértékben elősegít az eddig nagyon ritkán előforduló gombafertőzések kialakulását és terjedését. Ezeknek a hatásoknak a következtében újonnan felbukkant és az eddiginél szélesebb körben elterjedt gomba kórokozó lehet például az *Apophysomyces trapeziformis*, *Blastomyces* spp., *Candida auris*, *Coccidioides immitis*, *Cryptococcus deuterogattii*, *Histoplasma* spp., *Paracoccidioides* spp., és a *Talaromyces marneffe* (Nnadi és Carter 2021).

Az immunkompromittált és immunszuppresszált betegek növekvő száma miatt egyre gyakoribbá váló profilaktikus antifungális szerhasználat, a nem megfelelő vagy rendelkezésre nem álló klinikai fajazonosítási technikák, és a gyógyászatban is alkalmazott antifungális szercsoportok (pl. azolok) mezőgazdasági használata mintegy szelekciós nyomásként a normál humán mikoflóra felborulását és multidrog-rezisztens gombatörzsek kialakulását okozta. Ez az utóbbi két évtizedben hatalmas változást okozott a leggyakoribb gombás fertőzések epidemiológiájában, úgymint a candidiázis és aspergillózis. Egyre gyakoribbá váltak a gyógyszer-rezisztens nem-*albicans* *Candida* és kriptikus *Aspergillus* fajok által okozott fertőzések (Lass-Flörl és Steixner 2023).

A COVID-19 világjárvány az előző bekezdésben leírt jelenséget tovább fokozta elsősorban a COVID tünetek kezelésére használt szisztémás kortikoszteroid terápia immunrendszert gyengítő hatása következtében. Megfigyelhető volt, hogy a járvány alatt és után hatalmas ugrás következett be az azol-rezisztens kriptikus *Aspergillus* törzsek által okozott fertőzések esetszámában és mindamellett, hogy a nem-*albicans* *Candida*

fajok által okozott fertőzések száma tovább emelkedtek a *Candida albicans* ismételt előretörést mutatott velük szemben. Ázsia egyes országaiban (elsősorban Indiában) a Mucorales rend tagjai által okozott mucormikózisok drasztikus mértékben megnőtt esetszámáról tettek jelentést (>47 500 eset), aminek a többsége összefüggésbe volt hozható a COVID-19 fertőzéssel és a szisztémás kortikoszteroid terápiával (Lass-Flörl és Steixner 2023).

Az epidemiológiai változások következtében kialakuló új gombás fertőzések elleni megfelelő küzdelem egy hatékony gombaellenes terápia kidolgozásán túl megköveteli a rendszeres epidemiológiai felméréseket, a rezisztencia vizsgálatokat és az újonnan felbukkanó fajok gyors és hatékony azonosítására alkalmas diagnosztikai technikák kidolgozását (Smith és mtsai. 2023).

Rezisztencia és biofilm képzés

Egy antifungális szerrel szemben mutatott rezisztencia lehet a gomba természetes vagy szerzett tulajdonsága. Az előbbi okát a gomba általános fiziológiai tulajdonságaiban kell keresnünk, amik ellenállóvá teszik egy antifungális szer hatásával szemben. Ezért is van az, hogy mindenféle szerzett rezisztencia mechanizmus nélkül az egyes gombafajok (vagy akár egy faj eltérő izolátumainak) érzékenysége az egyes antifungális szerekre különbözhet. A szerzett rezisztencia epigenetikai változás vagy genomi mutáció következtében olyan tulajdonsággal ruházza fel a gombát a vad típushoz képest, ami által ellenállóvá válik egy antifungális szer hatásával szemben (Lockhart és mtsai. 2023). Ennek oka leggyakrabban egy nem optimális hatású vagy koncentrációjú antifungális szernek történő hosszú idejű kitettség a klinikai terápia során (Arastehfar és mtsai. 2020), vagy a humán gyógyászatban is alkalmazott antifungális szercsoportok (pl. azolok) növényvédőszerként történő alkalmazása a mezőgazdaságban (Langfeldt és mtsai. 2022).

Nem újkeletű tény, hogy az egy vagy több antifungális szerrel szemben rezisztenciát mutató gombák által okozott fertőzések esetszáma folyamatosan és nagy iramban növekszik (Fisher és mtsai. 2022, Lockhart és mtsai. 2023), de a legújabb tanulmányok alapján különösen nagy ugrás következett be a triazol (flukonazol, itraconazol, vorikonazol)-rezisztens *Aspergillus fumigatus*, a (multi)drog (amfotericin B, echinocandin, flukonazol, flucitozin)-rezisztens *Candida glabrata*, *C. auris* és a terbinafin-rezisztens dermatofita (*Trichophyton*, *Microsporum*, *Epidermophyton*) fajok okozta fertőzések esetszámában (Denning 2022, Lockhart és mtsai. 2023). A megfigyelt rezisztencia hátterében a **2. Ábrán** összefoglalt rezisztenciamechanizmusok valamelyike

állhat. Egy adott típusú antifungális szerrel szemben megszerzett rezisztencia gyakran maga után vonja egy másikkal szembeni ellenállóképesség kialakulását. Ilyenkor ún. multidrog rezisztenciáról beszélünk. Erre kiváló példa az utóbbi időkből az azol/echinokandin-rezisztens *C. glabrata* törzsek kialakulása (Perlin és mtsai. 2017).

A **poliének** a sejtmembrán permeabilitását változtatják meg úgy, hogy komplexet képeznek az ergoszterinnel. A velük szemben mutatott rezisztencia hátterében leggyakrabban az ergoszterin bioszintézis útvonal gének funkcióvesztéses mutációja áll, különösen *Aspergillus* és *Candida* fajokban. A *C. albicans*-ban a szterol C-5-deszaturáz (*ERG3*) elvesztése, továbbá a szterol C-22-deszaturáz (*ERG5*), a $\Delta(24)$ -szterol C-metiltranszferáz (*ERG6*) és a szterol C-4-metiloxidáz (*ERG25*) gének felülszabályozódása következtében kialakuló polién rezisztencia is nagyon gyakori (**2a. Ábra**) (Fischer és mtsai. 2022).

Az **azolok** az ergoszterin bioszintézist akadályozzák a lanoszterin-14 α -demetiláz gátlásán keresztül, aminek következtében a sejtmembrán kiépülése sérül. Az azolokkal szemben mutatott rezisztencia hátterében leggyakrabban az efflux pumpák túlműködése áll a *Candida* fajoknál, míg az *Aspergillus* fajoknál a lanoszterin-14 α -demetiláz pontmutációi, továbbá a promóter inszerciók következtében létrejövő változások a szterol bioszintézis útvonalban. Más gombafajoknál, mint pl. a *Cryptococcus neoformans* a lanoszterin-14 α -demetiláz és az efflux pumpák túltermelődése és hipermutációk felelősek az azol rezisztenciáért (**2a. Ábra**) (Fischer és mtsai. 2022).

A **pirimidin-analógok** metabolizmusának termékei gátolják a DNS és RNS szintézist. Rezisztencia velük szemben elsősorban a célgén, a citozin-deamináz (*FCY1*) pontmutációi következtében alakul ki, ami nagyon gyakori *Candida* fajokban. *Cryptococcus* fajokban a hipermutáció áll gyakran a rezisztencia hátterében (**2c. Ábra**) (Fischer és mtsai. 2022).

Az **allilaminok** a szkvalén-epoxidáz enzim működését gátolják, aminek a következtében sérül a sejtmembrán kiépülése és toxikus melléktermékek keletkeznek a szkvalénból. A rezisztencia okai (elsősorban *Trichophyton* fajokban) a szkvalén-epoxidáz génben bekövetkező mutáció, az allilamint lebontani képes szalicilsav-1-monoxigenáz enzim túltermelődése, az efflux pumpák túlműködése és a sejtmembrán és stresszválasz útvonalak indukciója (**2d. Ábra**) (Martinez-Rossi és mtsai. 2021).

Az **echinokandinok** az 1,3- β -glükán-szintáz specifikus gátlásán keresztül akadályozzák az 1,3- β -D-glükán szintézist és ez által a sejtfal kiépülését. Az echinokandinokkal szembeni rezisztenciát leggyakrabban az 1,3- β -glükán-szintáz

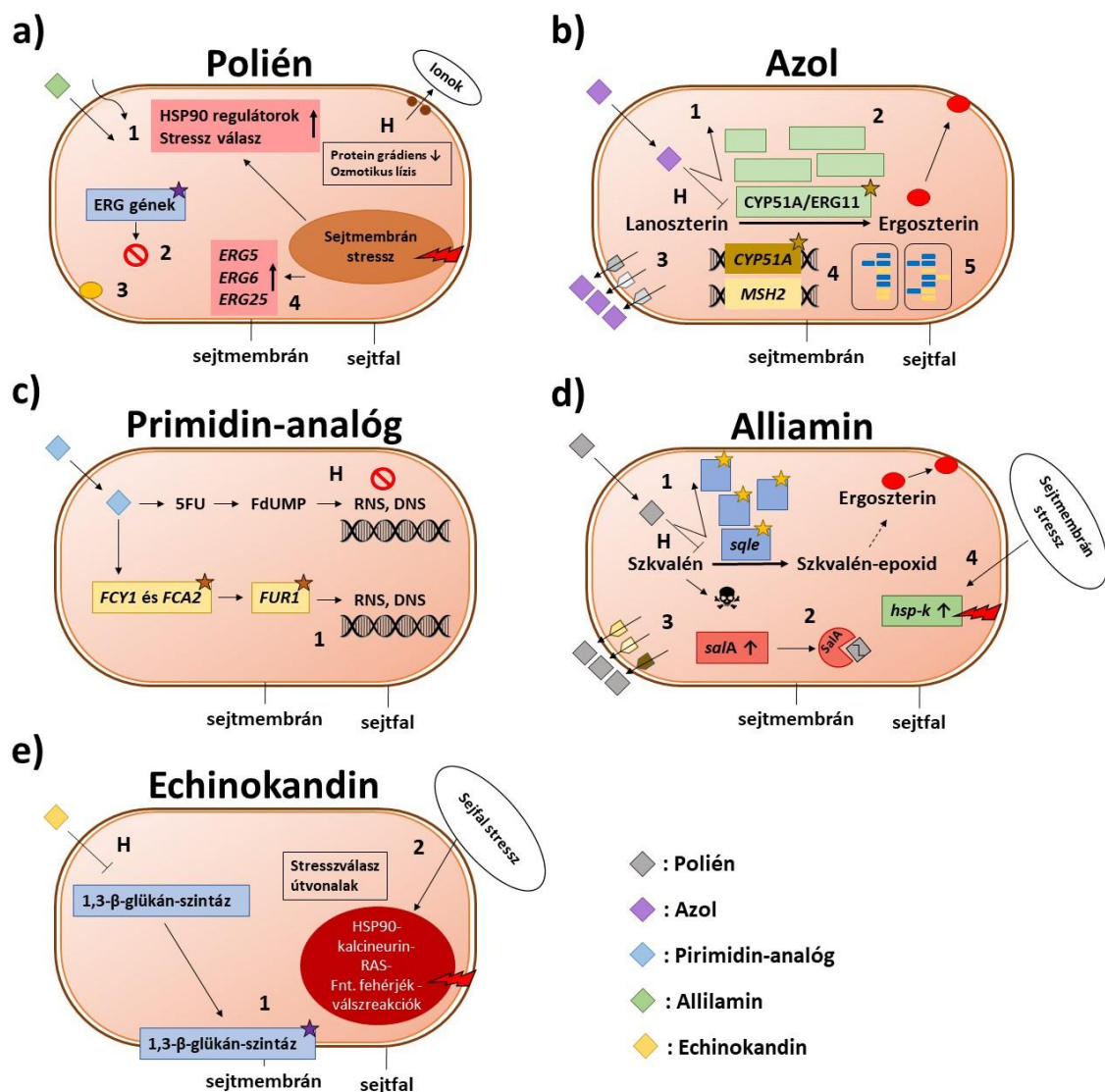
mutációi okozzák, elsősorban *Candida* és *Fusarium* fajokban. Az echinokandinokkal szembeni rezisztenciában a sejtfal stresszre termelődő Hsp90 hősokk fehérje (*heat shock protein 90*)-, a Ca^{2+} /kalcineurin-, a Ras (patkány szarkóma vírus, *rat sarcoma virus*) GTPáz fehérje-kapcsolt, és fel nem tekeredett fehérjékre adott válaszreakció útvonalak is szerepet játszanak (**2e. Ábra**) (Fischer és mtsai. 2022).

Az antifungális szerekkel szemben mutatott rezisztencia kapcsán mindenképpen szót kell ejteni a gombák biofilm képző tulajdonságáról is. A legtöbb humánpatogén gomba képes biofilmet kialakítani az emberi szervezetben vagy orvosi eszközökön és műszereken. A biofilm valamilyen felületre kitapadt gombasejtek tömegességét jelenti, amik egy saját maguk által kibocsájtott polimer vegyületekből álló extracelluláris mátrixba ágyazódnak. A biofilmképzés mechanizmusa a gombasejtek vagy spórák élő vagy élettelen felületre történő kitapadásával indul, ahol fonalas formában tovább növekedve egymáshoz kapcsolódnak és extracelluláris mátrixanyagok kibocsájtásával egy burkot képeznek maguk köré, amiben szaporodva új gombasejtekkel képesek fertőzni a környezetüket. Az extracelluláris mátrix a gombasejteket „elmaszkolja”, így nagymértékű védelmet biztosít számukra az immunrendszer humorális és celluláris védekezőképességével és az antifungális szerek hatásával szemben (Fox és mtsai. 2015). Mindehhez még hozzájárul a biofilmek nagymértékű efflux pumpa aktivitása, az antifungális szer célpontok változása a gombasejtben és a filamentációval kapcsolatos proteinek hatása (Borghi és mtsai. 2016). A biofilm képzése által, egy planktonikus, élesztőforma állapotban érzékenynek tekinthető gomba klinikai szempontból akár rezisztenssé is válhat egy adott antifungális szerrel szemben (Fuentefria és mtsai. 2018).

A fent említett tények tisztán jelzik, hogy olyan új típusú antifungális szerekre van szükségünk, amelyek hatékonyak gomba biofilmekkel szemben is és minimális a rezisztencia kialakulásának az esélye ellenük, vagy ez utóbbi csak egy nagyon lassú folyamat eredménye lehet.

Biztonságos és hatékony alkalmazás

Egy antifungális szer hatékony és biztonságos alkalmazásához elengedhetetlen ismerni annak farmakokinetikai (hatóanyag sorsa a szervezetben) és -dinámiai (a hatóanyag által kiváltott hatások a szervezetben) tulajdonságait, amik egyes szercsoportoknál különbözhetnek. Ezeket és a kórokozó gomba antifungális szerekre mutatott érzékenységet figyelembe véve egyes antifungális szerek más-más típusú és lokalizációjú fertőzések kezelésére alkalmasak (Carmo és mtsai. 2023). Súlyos mellékhatások (elsősor-



2. Ábra. A szerzett rezisztencia főbb típusai a leggyakrabban alkalmazott antifungális szercsoportokkal szemben.

a) Polién rezisztencia: 1 - sejtmembrán permeabilitás megváltozása, 2 - ergoszterin bioszintézis gének funkcióvesztéses mutációja, 3 - membrán szterin összetételének megváltozása, 4 - toleranciát elősegítő gének és stresszválasz útvonalak indukciója, H - hatásmód: polién-ergoszterin komplex képzés, ami a protein grádiens csökkenését és ozmotikus lízist eredményez. **b) Azol rezisztencia:** 1 - célpontot kódoló gén pontmutációja, 2 - célpont túltermelése, 3 - efflux pumpák túltermelése/túlműködése, 4 - célpontot kódoló és háztartási gén hipermutációja, 5 - heterorezisztencia és aneuploiditás, H - hatásmód: lanoszterin-14 α -demetiláz gátlása. **c) Pirimidin-analóg rezisztencia:** 1 - célpontot kódoló gén mutációja, H - hatásmód: RNS és DNS szintézis gátlása. **d) Allilamin rezisztencia:** 1 - célpontot kódoló gén mutációja, 2 - antifungális szer lebontása, 3 - efflux pumpák túltermelése/túlműködése, 4 - stresszválasz reakciók indukciója, H - hatásmód: szkvalén-epoxidáz gátlása. **e) Echinokandin rezisztencia:** 1 -célpontot kódoló gén pontmutációja, 2 - sejtfal stresszválasz útvonalak aktiválása, H - hatásmód: 1,3- β -glükán-szintáz gátlása. 5-FU: 5-fluorouridin, CYP51: lanoszterin-14 α -demetiláz, ERG: ergoszterin bioszintézis gének, FCY: cizotin-deamináz, FCA: flucitozin rezisztencia gén, FdUMP: fluoro-deoxiuridin-monofoszfát, Fnt.: fel nem tekeredett, Hsp90: hő sokk fehérje 90, MSH2: azol rezisztencia gén, SalA: szalicilsav-1-monoxigenáz, sqle: szkvalén-epoxidáz. Fischer és mtsai. (2022) és Martinez-Rossi és mtsai. (2021) alapján szerkesztett ábra.

-ban vese- és/vagy májkárosodás) kialakulására leginkább az invazív gombafertőzések kezelésekor, a gombaellenes szerek hosszantartó intravénás alkalmazása során kell számolnunk leginkább a poliének, triazolok és a flucitozin esetében. Kevésbé súlyos mellékhatások kialakulását (pl. központi idegrendszeri, keringés szervrendszeri, légzőszervi rendellenességek, szívritmuszavar, stb.) viszont minden antifungális szer esetében figyelembe kell venni, de az elmondható, hogy az echinokandinok jelentik ma a legbiztonságosabban alkalmazható antifungális szercsoportot (Yang és mtsai. 2021). Az echinokandinok viszont a többi antifungális szerhez képest sokkal rosszabb farmakokinetikai és -dinámiai tulajdonságokkal rendelkeznek orális alkalmazás során, így ezek kizárólag csak intravénásan alkalmazhatók (Carmo és mtsai. 2023). Az életveszélyes, invazív gombafertőzések kezelésre alkalmazott antifungális szerek farmakokinetikai és -dinámiai tulajdonságairól a **3. Táblázat** nyújt általános áttekintés.

A központi idegrendszeri gombás fertőzések hatékony kezelése különös problémát jelent az orvostudomány számára. Ennek elsődleges oka az, hogy az invazív gombás fertőzések kezelésre manapság használatos antifungális szerek penetrációja a vér-agy gáton keresztül kismértékű, amin liposzómás kiszerezésük nagyban segíthet (pl. amfotericin B) (**3. Táblázat**). Azonban a legtöbb esetben a terápia így sem sikeres annak ellenére, hogy az antifungális szer előre jelzett hatékony dózisa elméletileg elérhető lehet a központi idegrendszerben. Ennek a sikertelenségnek az okát abban keresnünk kell, hogy a központi idegrendszerre nem minden tradicionális farmakokinetikai alapelv érvényes és hogy az immunszupresszált páciensek megváltozott fiziológiája és a más egyéb alkalmazott gyógyszerek befolyással lehetnek az antifungális szerek farmakokinetikai és -dinámiai tulajdonságaira (Ashley 2019, Wirth és Ishida 2020). Ezért a központi idegrendszeri gombás fertőzések esetében a kórokozótól függetlenül magas halálozási aránnyal kell számolnunk, ami az immunszupresszált pácienseknél eléri a 90 - 100%-ot (Góralaska és mtsai. 2018).

A súlyos mellékhatások kialakulásának egyik oka a gomba és a gazda sejtfelepítésben, életműködésében és metabolizmusában meglévő hasonlóságok, amik nehézzé teszik kizárólag gombára specifikus antifungális szerek kifejlesztését. Gombára specifikus molekuláris célpontok azonosítása megoldást jelenthet a problémára. Néhány gomba képes a gazda sejtjeibe bejutni és ez által kevésbé válik kitetté az antifungális szerek és immunrendszer hatásainak. Az ilyen gombák okozta fertőzések hatékony terápiájához, jó sejtpenetrációs tulajdonságokkal rendelkező antifungális szerekre vagy terápiás megközelítésekre van szükség (Puumala és mtsai. 2024).

3. Táblázat. Az invazív gombafertőzések kezelésére általánosan alkalmazott antifungális szerek farmakokinetikai és -dinámiái jellemzői.

Szercsoport	Alkalmazás	Farmakokinetika	Farmakodinámia	Központi idegrendszeri penetráció	Főbb hatékonyság	Súlyos mellékhatás
Poliének (Amfotericin B)	Topikális Orális Intraperitoneális Intravénás	• Biohasznosíthatóság (%): 0,3 • Protein kötés (%): >90 • Metabolizmus (CYP): Nem • Kiválasztás (nem metabolizált %): vese (20 - 33), máj (40 - 43) • Eloszlás (l/kg): 0,05 - 2,2 • Kiürülés (ml/h/kg): 1 - 3 • t_{1/2} (óra): 13 - 24 • t_{max} (óra): 4	• Koncentrációfüggő antifungális hatás: Igen • Hosszú posztantifungális hatás: Igen • PD index: C_{max}/MIC	• Cerebrospinális folyadék (%): <1 • Agyszövet (%): 3 - 27	<i>Aspergillus</i> spp. <i>Blastomyces dermatitidis</i> <i>Candida</i> spp. <i>C. immitis</i> <i>C. neoformans</i> <i>Histoplasma capsulatum</i> <i>Mucor</i> spp. <i>Rhodotorula</i> , <i>Sporothrix schenckii</i> ,	Nefrotoxicitás
Triazolok (Flukonazol) (Itrakonazol) (Posakonazol) (Vorikonazol) (Isavukonazol)	Topikális Orális Intraperitoneális Intravénás	• Biohasznosíthatóság (%): 50 - >98 • Protein kötés (%): 11 - 99 • Metabolizmus (CYP): Igen vagy glükuronizáció • Kiválasztás (nem metabolizált %): vese (64 - 90), máj (<2 - 77) • Eloszlás (l/kg): 3,7 - 20 • Kiürülés (ml/h/kg): 15 - 485 • t_{1/2} (óra): 6 - 130 • t_{max} (óra): 0,5 - 6,3	• Koncentrációfüggő antifungális hatás: Nem • Hosszú posztantifungális hatás: Igen • PD index: AUC/MIC	• Cerebrospinális folyadék (%): <1 - 250 • Agyszövet (%): 50 - 200	<i>Aspergillus</i> spp. <i>B. dermatitidis</i> <i>Candida</i> spp. <i>C. immitis</i> <i>C. neoformans</i> <i>H. capsulatum</i> <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> <i>Phaeoophomycetes</i> spp. <i>S. schenckii</i>	Hepatotoxicitás
Echinokandinok (Anidulafungin) (Kaspofungin) (Mikafungin)	Intravénás	• Biohasznosíthatóság (%): - • Protein kötés (%): 92 - >99 • Metabolizmus (CYP): Igen, vagy spontán lebomlás, vagy független • Kiválasztás (nem metabolizált %): vese (1 - 4), máj (<1 - 10) • Eloszlás (l/kg): 0,3 - 2 • Kiürülés (ml/h/kg): 10 - 15 • t_{1/2} (óra): 8 - 50 • t_{max} (óra): -	• Koncentrációfüggő antifungális hatás: Igen • Hosszú posztantifungális hatás: Igen • PD index: C_{max}/MIC vagy AUC/MIC	• Cerebrospinális folyadék (%): <1 • Agyszövet (%): <1 - 25	<i>Candida</i> spp.	-
Flucitozin	Orális Intravénás	• Biohasznosíthatóság (%): 90 • Protein kötés (%): 3 - 4 • Metabolizmus (CYP): Minimális • Kiválasztás (nem metabolizált %): vese (>99) • Eloszlás (l/kg): 0,4 - 0,8 • Kiürülés (ml/h/kg): - • t_{1/2} (óra): 3 - 6 • t_{max} (óra): -	• Koncentrációfüggő antifungális hatás: Nem • Hosszú posztantifungális hatás: Nem • PD index: t > MIC	• Cerebrospinális folyadék (%): 75 • Agyszövet (%): -	<i>Candida</i> spp. <i>C. neoformans</i>	Nefrotoxicitás Hepatotoxicitás Csontvelő-károsodás

AUC: koncentráció - idő görbének a görbe alatti területe, C_{max}: maximális koncentráció a plazmában, CYP: citokróm enzimek, MIC: minimális gátló koncentráció, PD: farmakodinámia, t: idő, t_{1/2}: felezési idő, t_{max}: maximális plazmakoncentráció ideje. Mazzei és Novelli (2009), Lepak és Andes (2015), Carmo és mtsai. (2023), Ashley (2019) által szerkesztett táblázatok alapján összeállítva.

Mindezek azt jelzik, hogy elengedhetetlenül szükség van kis molekulatömegű, a vér-agy gáton jó átjutási képességgel is rendelkező olyan antifungális szerek kifejlesztésére, amik biztonságosan alkalmazhatóak és a terápiás hatékonyságukat is nagy valószínűséggel előre lehet jelezni (Wirth és Ishida 2020).

Költség és hozzáférhetőség

Egy, már bizonyított antifungális hatással rendelkező vegyület klinikai terápiás célra történő bevezetése költséges és időigényes folyamat. Egy 2015-ben megjelent becslés alapján ez az Egyesült Államokban 10 évet és kb. 300 millió dollár költséget jelent, amihez a szer kereskedelmi forgalomban lévősége alatt még kb. 400 millió dollár marketing költség adódik (Tillotson és Tillotson 2015). Viszont, ha a semmiből kell egy új antifungális szert kifejleszteni, akkor ennek az időtartama (ami magába foglalja a célpont azonosítástól az engedélyeztetés folyamatát) már 12-20 év is lehet és mintegy 1800 millió dollárba kerül 2020. évi becslés alapján (Wall és Lopez-Ribot 2020b). Figyelembe véve a ma használatos antifungális szerekkel szemben terjedő gyors rezisztenciát elképzelhető az, hogy ez a költség egyáltalán nem térül meg mielőtt a szer alkalmatlanná válna terápiás célra. Ez és amiatt, hogy a jelenlegi becslések alapján csak 5% az esélye annak, hogy az újonnan kifejlesztett gombaellenes molekulák átmennek a klinikai tesztfázisokon, a gyógyszergyárak nem igazán érdekeltek abban, hogy új antifungális szereket fejlesszenek és hozzanak forgalomba (Wall és Lopez-Ribot 2020b; Puumala és mtsai. 2024).

A különböző típusú antifungális szerek hozzáférhetősége, ára és a rájuk alapuló terápiák költsége a világ egyes országaiban eltérő (Kneale és mtsai. 2016; Pathadka és mtsai. 2020). Ez nagy kihatással van arra, hogy milyen típusú antifungális szerekkel és milyen hatékonysággal tudják felvenni a harcot a gombák okozta fertőzésekkel szemben a közepes, de leginkább az alacsony jövedelmű országokban, ami utóbbiak a leginkább érintett területek az életveszélyes gombás fertőzések szempontjából (Riera és mtsai. 2019). Kiváló példa a liposzómás amfotericin B-vel és flucitozinnal történő terapia megfizethetetlen költsége ezekben az országokban vagy, hogy ezek a szerek nem hozzáférhetőek a többségükben (de Oliveira és mtsai. 2022). Mindezek mellett, a megfelelő diagnosztikai tudás és eszköztár, továbbá a problémát enyhítő intézkedések hiánya miatt nem véletlen a halálos kimenetelő mikózisok kiugró száma ezekben az országokban (Riera és mtsai. 2019; Schmidt 2024). Ennek a problémának az enyhítésére olyan döntéshozói intézkedések szükségesek amelyek által költségtől függetlenül

világszerte hozzáférhetővé válhatnak a terápia szempontjából leghatékonyabb antifungális szerek és diagnosztikai technikák. Ezen kívül szigorú irányelveket kell lefektetni az antifungális szerek hatékony alkalmazásával kapcsolatban, ami jól képzett szakember gárdát kíván (Riera és mtsai. 2019).

4.1.2. Új lehetőségek az antifungális terápiában

A 4.1.1. fejezetben tárgyalt problémákra megoldás lehet a kombinált antifungális szerhasználat, ami két különböző hatásmódú és célpontot támadó antifungális szer egyidejű vagy egymás utáni alkalmazását jelenti. Ez csökkentheti a rezisztencia és mellékhatások kialakulásának a kockázatát, továbbá szinergisztikus kölcsönhatásba lépve fokozhatják egymás hatékonyságát és tágíthatják az antifungális spektrumot (Belanger és mtsai. 2015). Az elmúlt három évtizedben számos, más betegség kezelésére használt gyógyszerről bebizonyosodott, hogy másodlagosan antifungális hatással rendelkeznek és akár önállóan vagy adjuvánsként felhasználhatók lehetnek gombák okozta fertőzések kezelésére. Az ilyen gyógyszerek antifungális célra történő újrahasznosítása egy költség- és időhatékony folyamatot jelent egy újonnan kifejlesztendő szerrel szemben (Zhang és mtsai. 2021). Gombaszpecifikus antifungális terápia szempontjából szóba jöhető célpontok azonosításával olyan új gyógyszer-molekulák tervezhetők vagy gyógyszer-molekula-adatbázisokból újrahasznosíthatók, amelyek egy mellékhatások nélküli, biztonságosan alkalmazható antifungális terápia alapjait jelenthetik a jövőben (Ivanov és mtsai. 2022). Néhány, az eddigieknél teljesen új antifungális hatásmóddal rendelkező ígéretes gyógyszer-jelölt molekula már eljutott a klinikai tesztfázisok valamelyik szakaszába, de terápiás célra történő forgalomba hozataluk a mai még nem történt meg (Carmo és mtsai. 2023).

Kombinált antifungális szerhasználat

Két antifungális szer kombinációja során a közöttük lévő kölcsönhatás lehet szinergisztikus (kölcsonösen fokozzák egymás hatékonyságát), additív (a két szer hatékonysága összeadódik) és antagonisztikus (kölcsonösen csökkentik egymás hatékonyságát). A monoterápiás szerhasználatnál hatékonyabb antifungális kezelés eléréséhez az első a kedvező, míg az utolsó kerülendő. Meg kell jegyezni azonban azt is, hogy egy antifungális szer hatékonyságát nem csak egy másik, hanem egy nem-antifungális szerként ismert gyógyszer is növelheti. Erre kiváló példa a gombaellenes

hatással nem rendelkező ibuprofén nemszteroid gyulladásgátlószer, ami az efflux pumpák gátlása révén szinergisztikus módon növeli a flukonazol hatékonyságát *Candida* fertőzésekkel szemben. Egy antifungális szempontból szinergisztikus szerkombináció háttérében állhat az, 1) hogy az egyik szer növeli a másik biológiai hozzáférhetőségét, 2) azonos biológiai útvonal eltérő komponenseit vagy eltérő, de egymással valamilyen kapcsolatban lévő útvonalakat támadnak, továbbá, hogy 3) az egyik szer elnyomja a másikkra adott stresszválaszt. Az elsőre példa az amfotericin B és a flucitozin kölcsönhatása, amikor is előbbi sejtmembrán permeabilitást növelő hatása fokozza a flucitozin sejtbe történő felvételét. A másodikra példa a terbinafin és azol kölcsönhatása, amikor is mindkét szer az ergoszterion bioszintézis útvonalat támadja, de eltérő célpontokon. A harmadikra példa lehet a stressz válasz kialakulását megakadályozó Hsp90 gátlók és az azolok együttes alkalmazása. Mivel ezeknek a gyakran csak *in vitro* megfigyelt szerkombinációknak akár terápiás sikere is lehet, a közelmúltban számos új módszert fejlesztettek ki az szinergisztikus antifungális szerkombinációk azonosítására (Zhu és mtsai 2023). A klinikumban terápiás célból a leggyakrabban használt szerkombinációk invazív candidiázis ellen az amfotericin B - flucitozin/azol, vagy echinokandin - azol; invazív aspergillózis ellen az azol/amfotericin B - echinokandin, vagy vorikonazol - anidulafungin, mucormikózis ellen pedig az amfotericin B - posakonazol/kaszpofungin (Campitelli és mtsai. 2017).

Gyógyszer-újrahasznosítás

A gyógyszer-újrahasznosítás, vagyis amikor egy kereskedelmi forgalomba helyezett gyógyszernek az eredetin túlmutató új alkalmazási területét keressük, számos előnnyel járhat és egy új antifungális stratégia alapját jelentheti. Egy ilyen folyamat, a kereskedelmi forgalomba hozatalt is beleértve mindössze 3-12 évig tarthat és költsége (~50 millió dollár) csak töredéke egy teljesen újonnan kifejlesztett szerének (Wall és Lopez-Ribot 2020b). Különböző *in vitro* és *in silico* technikák alkalmazásával már számos antifungális szer-jelölt molekulát azonosítottak gyógyszermolekuladatbázisokból elsősorban *Candida* fajok ellen (Kim és mtsai. 2020, Wall és Lopez-Ribot 2020b, Zhang és mtsai. 2021). Újrahasznosított antifungális szerekként elsősorban egyes antibiotikumok, az immunszuppresszív szerek, koleszterinszint csökkentő sztatinek, antiaritmiás gyógyszerek, antipszichotikumok, antidepresszánsok, és nem-szteroid gyulladáscsökkentők kerülhetnek szóba (Zhang és mtsai. 2021). Az ilyen újrahasznosított antifungális szerekek számos hátulütőjük lehet: Az *in vitro* antifungális aktivitás nem

garantálja az *in vivo* hatékonyságot, antifungálisan hatékony dózisban alkalmazva súlyos mellékhatásokat válthatnak ki, alacsony koncentrációban alkalmazva rezisztencia alakulhat ki ellenük, továbbá antifungális hatásmechanizmusuk nem pontosan ismert, ami hátráltathatja a terápiás alkalmazást (Kim és mtsai. 2020, Wall és Lopez-Ribot 2020b, de Oliveira és mtsai. 2024). Sikertelen alkalmazás esetén azonban nem kell elfeledkeznünk arról, hogy templátul szolgálhatnak új antifungális szerek kifejlesztéséhez (Oliveira és mtsai. 2024).

Új gombaspecifikus célpontok azonosítása

Egy alapvetően új és biztonságosan alkalmazható antifungális szer kifejlesztése olyan gomba-specifikus célpontok azonosításával kezdődik, amik eltérnek a kereskedelmi forgalomban lévő antifungális szerek által megcélzottaktól, és amiken keresztül a kórokozó gomba szelektíven elpusztíthatóvá válik. Ez utóbbi által csökkenthető lehet a mellékhatások kialakulásának a kockázata az emberi szervezetben (Robbins és mtsai. 2016). Ezek az új gomba-specifikus célpontok lehetnek a kereskedelmi forgalomban már kapható antifungális szerek által befolyásolt útvonalak eddig meg nem célzott komponensei, vagy azoktól teljesen eltérően új útvonalak. Az újonnan azonosított célpontok felhasználhatók lehetnek az előbbieken említett gyógyszer-újrahasznosítás céljából is. A kereskedelmi forgalomban már kapható antifungális szerek által megcélzott útvonalak egyes komponenseire (pl. ergoszterin bioszintézis és sejtfal bioszintézis) kifejlesztendő új szerek egyik nagy előnye, hogy hasonló hatásmechanizmusú szerek már klinikai környezetben bizonyították a hatékonyságukat, így várható, hogy azezek az új szerek nagy valószínűséggel átmennek a klinikai tesztfázisokon (Nicola és mtsai. 2019). Az újonnan megcélzott útvonalak elsősorban azok, amik szerepet játszanak a rezisztencia kialakításában (pl. efflux pumpák, lanoszterol-demetiláz expresszió, Hsp90), a virulenciában (pl. biofilmképzés és morfológiai változás), a sejtlégzésben (mitokondrium), és a metabolizmusban (különböző enzimek) (Ivanov és mtsai. 2022). Ezekből a szempontokból figyelembe vehető útvonalak: Hsp90-kalcineurin-protein-kináz C kapcsolt útvonalak (pl. Hsp90-kapcsolt fehérjék, FK506-kötő fehérje 12), Ras GTPáz szignalizációs útvonal (pl. diaminobutirát-2-oxoglutarát-aminotranszferáz, farnezil-transzferáz), glioxálsav ciklus (pl. izocitromsav-liáz, malát-szintáz), háromértékű katinok-kapcsolt útvonalak (pl. poliketid-szintáz, sziderofór-szintáz), trehalóz bioszintézis útvonal (pl. trehalóz-6-foszfát-szintáz), lipid bioszintézis útvonal (pl. ceramid-szintáz, szerin-palmitoil- transzferáz), légzési lánc (pl. mitokondriális

citokróm bc₁-reduktáz, citokróm P450) (Vanzolini és Magnani 2024). De mindezek mellett számos egyéb célpont is figyelembe vehető (pl. transzkripció faktorok, hiszton-deacetiláz, stb.) (Nicola és mtsai. 2019).

Új antifungális szer-jelölt molekulák fejlesztése

Egy új antifungális szer kifejlesztése egy széleskörű molekula könyvtár tagjainak *in vitro* gombaellenes aktivitásra nézett szűrésével kezdődik, amit a gombában meglévő célpontjuk azonosítása követ. Ez alapján a molekula szerkezetének az optimalizációjával a hatékonyság növelhető és tesztelhető emlős fertőzés modellekben. Amennyiben ez utóbbiban is hatékornak bizonyul az új antifungális molekula, a klinikai tesztfázisok következnek, majd sikeresség esetében a kereskedelmi forgalomba hozatal (Puumala és mtsai. 2024). A korábbi fejezetben említett régi és új biológiai útvonalak egyes komponensire kifejlesztett, de még klinikai tesztfázis alatt álló antifungális készítményekről a **4. Táblázat** nyújt egy áttekintő képet. Elképzelhető, hogy ezeknek a szereknek a nagy része már átmert az utolsó klinikai tesztfázison is és jelen fejezet írását követően (2024. április) már engedélyezett és kereskedelmi forgalomba is került. Ilyen, a klinikai tesztek harmadik fázisában lévő szerek: **1) Fosmanogepix**, ami a glükofoszfatidilinozitol-kapcsolt sejtfa transzfer protein 1 (Gwt1) gátlásán keresztül megakadályozza, hogy bizonyos fehérjéken a sejt életműködése szempontjából szükséges változások létrejöjjenek. Ez a hatásmód teljesen eltér a klinikumban eddig alkalmazott szerekétől (Shaw és Ibrahim 2020). **2) Olorofim**, ami a pirimidin bioszintézist akadályozza a dihidro-orotsav-dehidrogenáz gátlásán keresztül, de hatástalan *Candida* fajokkal szemben. Ez a hatásmód is teljesen eltér a klinikumban eddig alkalmazott szerekétől (Wiederhold 2020). **3) Kelátolt amfotericin B**, ami az ergoszterint távolítja el a sejtmembránból úgy, hogy aggregátumokat képez vele. Az eddig alkalmazásban lévő amfotericin B kisserelésétől abban különbözik, hogy orális alkalmazása esetében is nagy biohasznosíthatóság érhető el (Aigner és Lass-Flörl 2020). **4) Iodikonazol**, egy új triazol, ami az eddigieknél szélesebb spektrummal rendelkezik és erősebben kötődik a lanoszterin-14 α -demetilázhoz (Sun és mtsai. 2013).

Egyéb lehetőségek

Egyéb antifungális terápiás lehetőségek biofarmakológiai termékeken vagy nanorészecskéken alapulhatnak. Biofarmakológiai termékek lehetnek pl. monoklonális antitestek, citokinek, vagy vakcinák (Nicola és mtsai. 2019).

A monoklonális antitesteken alapuló antifungális terápia egyik nagy előnye lehet a nagymértékű célpont specificitás, ezért ez egy biztonságosan alkalmazható, súlyos mellékhatások nélküli antifungális terápiás lehetőséget jelenthet. Hatékony monoklonális antitestekre példa az efungumab és a 18B7. Annak ellenére, hogy ezeken kívül számos monoklonális antitest *in vitro* és *in vivo* egyaránt hatékonynak bizonyult, rájuk alapuló, a klinikumban is alkalmazható termék jelenlegi tudomásunk alapján nincsen fejlesztés alatt. Ennek oka lehet a nem gazdaságos gyártási technológia (Nicola és mtsai. 2019).

Immunoterápián alapuló antifungális startégiát jelenthet a citokinek (pl. rekombináns M-CSF [*macrophage colony-stimulating factor*], interferon- γ) vagy egyéb fehérjék alkalmazása. A citokinek az immunrendszer stimulálásán keresztül növelhetik a gazdaszervezet védekezőképességét. Habár az eddigieknél több és összetettebb klinikai tesztek szükségesek a komplex hatásmechanizmusuk megértéséhez azért, hogy biztonságosan alkalmazhatók legyenek gombák okozta fertőzések kezelésére. Az M-CSF egy ígéretes jelölt, amit neutropénia kezelésére már hosszú ideje alkalmaznak a klinikumban (Nicola és mtsai. 2019).

A vakcináció is egy ígéretes lehetőség a gombák okozta fertőzések kialakulásának és terjedésének a megelőzésére elsősorban a világ azon területein, ahol ez gondot jelent és a kórházi kezelés nagyon költséges vagy egyáltalán nem megoldott. Ezek általában az alacsony jövedelmű országok. Vakcinák alkalmazásával nehéz emelni az immunszupresszált páciensek védekezőképességét, ezért elsősorban profilaktikus használatukat képzelik el az immunkompetens populáció körében (Pathakumari és mtsai. 2020). Jelenleg még nem kapható kereskedelmi forgalomba gombaellenes vakcina, de kettő biztosan fejlesztés alatt áll és eddig sikeresen szerepeltek klinikai tesztfázisokban. A gazdaságosan előállítható NDV-3A, egy agglutinin-szerű szekvenciával rendelkező protein (Als3) N-terminális része alumínium-hidroxid adjuvánssal keverve. Az Als3 egy immunodomináns *C. albicans* sejtfal protein, ami virulenciafaktorként működik. Az NDV-3A hatékonynak bizonyult klinikai tesztekben (fázis II) különböző *Candida* fajok okozta fertőzések kezelésére. Hatásmechanizmusa azon alapul, hogy alkalmazásával csökkenthető a kórokozó virulenciája, mindemellett pedig fokozza a fagocita effektorok termelését és aktivációját (Puumala és mtsai. 2024). A másik, az NXT-2 egy rekombináns, a széles antifungális spektrum elérése érdekében módosított Kex1 (szerin-típusú karboxipeptidáz) fehérjén alapuló vakcina. Jelenlétében anti-NXT-2 antitesteket képződnek a szervezetben, amik a gombasejtekhez kötődve elősegítik és növelik a falósejtek hatékonyságát. További előnyeit jelenti az, hogy gátolja a biofilm kialakulást és

4. Táblázat. Fejlesztés alatt álló antifungális készítmények.

Szercsoport	Szer	Hatásmód	Alkalmazás	Spektrum	Előnyök	Klinikai tesztfázis
Arilamidin	ATI-2307	A mitokondriális komplex III és IV enzimatisz aktivitásának a gátlása, ATP termelés csökkenése.	Intravénás	<i>Aspergillus</i> spp. <i>Candida</i> spp. <i>Cryptococcus</i> spp. <i>Fusarium solani</i> <i>Malassezia furfur</i>	Hatékony az összes FPPL patogén ellen, jobb biológiai hozzáférhetőség.	Fázis I
Depsipeptid	Aureobazidin A	Inozitol-foszfozceramid-szintáz gátlása.	Orális Intravénás	<i>Aspergillus</i> spp. <i>Candida</i> spp.	Széles antifungális spektrum.	Preklinikai
GPI gátló	Fosmanogepix (APX001)	A GPI-kapcsolt sejtfal transzfer protein 1 gátlása (Gwt1).	Orális Intravénás	<i>Aspergillus</i> spp. <i>Candida</i> spp. <i>Coccidioides</i> spp. <i>Fusarium</i> spp. <i>Rhizopus arrhizus</i> <i>Scedosporium</i> spp.	Hatékony antifungális szer-rezisztens <i>C. albicans</i> és <i>C. auris</i> törzsekkel szemben.	Fázis III
Hisztón-deaciláz gátló	MGCD290	Stresszválasz reakciók csökkentése a hisztón-deaciláz és a Hsp90 gátlásán keresztül.	Orális	<i>Aspergillus</i> spp. <i>Candida</i> spp. <i>Fusarium</i> spp. <i>Mucor</i> spp. <i>Rhizopus</i> spp. <i>Rhodotorula</i> spp. <i>Trichosporon</i> spp. <i>Scedosporium apiospermum</i>	Szinergisztikus kölcsönhatás echinokandinokkal és azolokkal.	Fázis II
Nukleozid peptid	Nikkomycin Z	Az 1-es típusú kitin-szintáz gátlása.	Orális	<i>Blastomyces dermatitidis</i> <i>Candida</i> spp. <i>Coccidioides</i> spp. <i>Histoplasma capsulatum</i> <i>Sporothrix globosa</i>	Szinergisztikus kölcsönhatás echinokandinokkal és itrakonazollal <i>Candida albicans</i> , <i>Candida parapsilosis</i> és <i>Cryptococcus neoformans</i> ellen.	Fázis I/II
Orotomid	Olorofim (F901318)	A pirimidin bioszintézis gátlása a dihidro-orotsav-dehidrogenáz gátlásán keresztül.	Orális Intravénás	<i>Aspergillus</i> spp. <i>B. dermatitidis</i> <i>Coccidioides</i> spp. <i>Fusarium</i> spp. <i>H. capsulatum</i> <i>Lomentospora prolificans</i> <i>Microsporum gypseum</i> <i>Penicillium</i> spp. <i>Pseudallescheria boydii</i> <i>S. apiospermum</i> <i>Sporothrix schenckii</i> <i>Trichophyton</i> spp.	Hatékony antifungális szer-rezisztens gombák ellen.	Fázis III

Polién(analóg)	AM-2-19	Az ergoszterin eltávolítása a sejtmembránból aggregátumképzésen keresztül.	n.a.	<i>Aspergillus</i> spp. <i>Candida</i> spp. <i>Cryptococcus</i> spp. <i>Coccidioides</i> spp. <i>H. capsulatum</i>	Hatékony amfotericin B-rezisztens <i>Aspergillus</i> törzsek ellen. Nem köt a koleszterinhez.	<i>In vivo</i> kísérletek
	BSG005		Intravénás	<i>Aspergillus</i> spp. <i>Candida</i> spp. <i>Cryptococcus</i> spp. <i>Mucor</i> spp. <i>Pneumocystis</i> spp.	Fungicid hatás antifungális szer-rezisztens <i>Aspergillus</i> és <i>Candida</i> izolátumokkal szemben. Kevésbé nefrotoxikus mint az amfotericin B.	Fázis 1
	Kelátolt amfotericin B (CAmB)		Orális	<i>Aspergillus</i> spp. <i>Blastomyces</i> spp. <i>Candida</i> spp. <i>Coccidioides</i> spp. <i>Fusarium</i> spp. <i>Histoplasma</i> spp. <i>Paracoccidioides</i> spp. <i>Scedosporium</i> spp.	Jobb biohasznosíthatóság.	Fázis III
Sziderofór(analóg)	GR-2397 (ASP2397, VL-2397)	Nem ismert, felvétele a Sit1 transzporterén keresztül történik.	Intravénás	<i>Aspergillus</i> spp. <i>Candida</i> spp. <i>F. solani</i> <i>Trichosporon asahii</i>	Hatékony azol-rezisztens <i>Aspergillus</i> törzsek ellen.	Fázis II
Tetrazol	Quilsekonazol (VT-1129)	Az ergoszterin bioszintézis gátlása a lanoszterol-14 α -demetiláz gátlásán keresztül.	Orális	<i>Candida</i> spp. <i>Coccidioides</i> spp.	Gomba lanoszterin-14 α -demetiláz specifikus.	Preklinikai
	VT-1598			<i>Aspergillus</i> spp. <i>B. dermatitidis</i> <i>Candida</i> spp. <i>Coccidioides</i> spp. <i>C. neoformans</i> <i>H. capsulatum</i> <i>R. arrhizus</i>		Fázis 1
	Albakonazol		Orális	<i>Aspergillus</i> spp. <i>Candida</i> spp. <i>Cryptococcus</i> spp.	Széles antifungális spektrum. Jó biohasznosíthatóság.	Fázis II
Triazol	Iodikonazol		Felszíni	<i>Aspergillus</i> spp. Dermatofita fajok	Széles antifungális spektrum. Nagy kötőképesség a lanoszterin-14 α -demetilázhoz.	Fázis III
	SUBA-itrakonazol		Orális	<i>Aspergillus</i> spp. <i>Candida</i> spp.	Jó biohasznosíthatóság.	Fázis II

ATP: adenosin-trifoszfát, FPPL: elsődleges fontosságú patogén gombák listája (*Fungal Priority Pathogens List*, World Health Organization 2022), GPI: glükoszilfoszfatidilinozitol, Hsp90: hősokk fehérje 90 (*heat shock protein 90*), n.a.: nincs adat, SUBA: emelt biohasznosíthatóság (*super bioavailable*). Pfaller és mtsai. (2009), Bouz és Doležal (2021), Puumala és mtsai. (2024) által szerkesztett táblázatok alapján összeállítva.

gazdaságosan előállítható. Eddigi tesztek alapján alkalmas lehet *A. fumigatus*, *C. albicans*, *C. neoformans* és *Pneumocystis jirovecii* fertőzések ellen. Jelenleg a klinikai tesztfázisok első szakaszában van (Puumala és mtsai. 2024).

Az utóbbi években felmerült a nanotechnológia alkalmazása gombák okozta fertőzések kezelésében, amikor is nanorészecskéhez kötve vagy nanokapszulába csomagolva javíthatóvá válik egy antifungális szer farmakokinetikai és/vagy -dinámiai tulajdonságai. Ilyenek lehetnek a lipid nanorészecskék, pl. amfotericin B liposzómális kettősrétegben (Ambisome) vagy a nanopolimerek. Fém nanorészecskéknél is hatékony gombaellenes hatást tulajdonítanak (Sousa és mtsai. 2020). Klinikai alkalmazásuk eddig nem ismert.

4.2. Gombakórokozók elleni növényvédelem

A világszinten jelenleg legelterjedtebben használt kémiai fungicideket 15 nagy csoportra lehet osztani kémiai tulajdonságaik és hatásmódjuk alapján (**5. Táblázat**). Ezek lehetnek ún. kontakt vagy szisztémás fungicidek. A kontakt fungicidek nem jutnak be a növényi szövetekbe csak felszíni védelmet biztosítanak számukra a kórokozó gombával szemben. Ezzel ellentétben a szisztémás fungicidek bejutnak a növénybe és az érhalózatán keresztül egyenletesen elosztva az egész növény védelmét biztosítják olyan kórokozókkal szemben is, amelyek képesek a növénybe behatolni. Az **5. Táblázat** csak néhány kiragadott példát tartalmaz, ugyanis a kémiai fungicidek száma folyamatosan nő és újabbnál újabbak kerülnek piaci bevezetésre elsősorban az Egyesült Államokban (Lamberth 2022, Beckerman és mtsai. 2023). Ezzel szemben az Európai Unióban (EU) egy ellentétes folyamat játszódik le, ugyanis egyre több fungicid kerül(t) (ideiglenesen vagy végérvényesen) piaci kivezetésre és válik tiltottá az „Út a szennyezőanyag-mentes levegő, víz és talaj felé” cselekvési terv és egyéb szabályozások értelmében (Európai Bizottság 2021, Marchand 2023a,b). Szükséghelyzetre való tekintettel néhány már kivezetett fungicid ideiglenesen újra alkalmazható lehet. Az éppen aktuálisan engedélyezett fungicidek listája folyamatosan nyomon követhető a megfelelő EU-s webportálokon. A gombák, azonban nem csak a szántóföldön, hanem raktári körülmények között is súlyos károkat tudnak okozni a betakarított terményben, ui. azt súlyos egészségkárosító másodlagos anyagcseretermékekkel, ún. mikotxinokkal képesek szennyezni (Eskola és mtsai. 2020).

5. Táblázat. A világszinten legelterjedtebben alkalmazott kémiai fungicid csoportok.

Csoport	Kémiai család	Hatóanyag példa	Célpont	Hatásmód	Hatás
Anilin-pirimidin	Anilin-pirimidin	Ciprodinil	Cisztationin- β -szintáz	A metionin bioszintézis gátlásán keresztül hidrolitikus enzimek szekréciójának a gátlása, amelyek a fertőzés kialakításához szükségesek.	Szisztémás
		Pirimetanil	Cisztationin- β -liáz		
Demetiláció gátló	Triazol	Epoxikonazol	Lanoszterin-14 α -demetiláz	Lanoszterin-14 α -demetiláz gátlásán keresztül az ergoszterin bioszintézis gátlása.	Szisztémás
		Protiokonazol			
		Tebukonazol			
Dikarboximid	Dikarboximid	Iprodion	MAP/hisztidin-kináz	Sznál transzdukció gátlása.	Szisztémás
		Vinklozolin			
Ditiokarbamát (származékok)	Ditiokarbamát (származékok)	Mankoceb	Többféle	Többféle.	Kontakt
Fenil-amid	Acilalanin	Metalaxil (Mefenoxám)	RNS polimeráz I	RNS szintézis gátlása.	Szisztémás
	Metilalanin	Benalaxil			
Fenil-pirrol	Fenil-pirrol	Fludioxonil	MAP/hisztidin-kináz	Sznál transzdukció gátlása.	Kontakt
Foszfónát	Etil-foszfónát	Foszetil	Foszfónát	Micélium növekedés és sporuláció gátlása.	Szisztémás
Inorganikus molekulák	Inorganikus kén	Kén	Fehérjék	Csírázás, sejtlégzés és metabolizmus gátlása.	Kontakt
	Inorganikus réz	Réz-hidroxid	Aminosavak		
		Rézoxiklorid	Fehérjék		
Karbamát	Karbamát	Propamokarb	Acetilkolin-észteráz	A lipid bioszintézis gátlásán keresztül a sejtmembrán bioszintézis gátlása.	Szisztémás
Karboxilsav-amid	Karboxilsav-amid	Dimetomorf	Cellulóz-szintáz	A cellulóz-szintáz gátlásán keresztül a sejtfa bioszintézis gátlása.	Szisztémás
		Mandipropamid			

Kinon gátló	Enoát-észter	Pikoxistrobin	Citokróm b	Sejtlégzés gátlása.	Szisztémás
	Karboxamid	Fenpikoxamid	Citokróm bc ₁ komplex III		
	Metoxi-akrilát	Azoxistrobin			
	Metoxi-karbamát	Piraklostrobin	Citokróm b		
	Szulfonamid	Amisulbrom			
Metil-benzimidazol-karbamát	Tiofanát	Benomil		Mitózis és sejtosztódás gátlása.	Szisztémás
		Karbendazim	β-tubulin		
		Tiofanát			
Morfolin/amin	Pirimidin-amin	Fenpropimorf	Δ8–Δ7szetrol-izomeráz Δ14szterol-reduktáz	A Δ8–Δ7szetrol-izomeráz/Δ14szterol-reduktáz gátlásán keresztül az ergoszterin bioszintézis gátlása.	Szisztémás
	Spiroketál-amin	Spiroxamin	Δ14szterol-reduktáz		
Szukcinát-dehidrogenáz inhibitor	Aromás amid	Fluxapioxad		Szukcinát-dehidrogenáz gátlása gátlásán keresztül a mitokondriális ATP képződés gátlása.	Szisztémás
	Pirazol-karboxiamid	Bixafen	Szukcinát-dehidrogenáz		
	Piridil-etil-benzamid	Fluopirám	komplex II		
	Piridin-karboxamid	Boszkalid			
Több célponton ható szerek	Dinitril	Klórtonil		Többféle.	Kontakt
	Ftálimid	Folpet Kaptán	Többféle		

ATP: adenosin-trifoszfát, MAP: mitogén-aktivált protein. Gikas és mtsai. (2015) és Corkley és mtsai. (2022) által szerkesztett táblázatok alapján összeállítva.

4.2.1. A gombakórokozók elleni növényvédelem jelenlegi kihívásai

A gombakórokozók elleni növényvédelemnek folyamatosan új kihívásokkal kell szembenéznie mind szántóföldi, mind raktári körülmények között (Gikas és mtsai. 2015, Fisher és mtsai. 2020, Davies és mtsai. 2021). Ezek közül a legfontosabbak: a klímaváltozás következtében megjelenő új fajok olyan mezőgazdasági területeken ahol eddig ott nem voltak ismertek, a fungicidekkel szembeni rezisztencia folyamatos terjedése, továbbá a kémiai fungicidek káros hatása a környezetre és az emberi egészségre.

Klímaváltozás és új patogén fajok

Mára már világossá vált az, hogy a klímaváltozás hatására a gombák okozta növényi fertőzések esetszáma és kártételek mértéke mind szántóföldi (Nnadi és Carter 2021), mind raktári körülmények között folyamatosan növekszik vagy ezek ugrásszerű további növekedése várható a közeljövőben (Van der Fels-Klerx és mtsai. 2016). Ennek közvetlen és közvetett okai egyaránt lehetnek. A közvetlen okok között meg kell említeni az olyan növénypatogén gombafajok megjelenését olyan mezőgazdasági területeken, ahol eddig ezek ismertlenek voltak, pl. *Alternaria solani*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium graminearum* fajkomplexum, *Magnaporthe oryzae*, *Penicillium digitatum*, *Phytophthora infestans*, *Pythium* spp. *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. További közvetlen okoként meg kell említeni a magasabb átlaghőmérsékletet, ami pl. lerövidítheti a patogén generációs idejét; a megemelkedett CO₂-szintet, ami növelheti, de csökkentheti is a fertőzés súlyosságát; továbbá a páratartalom növekedését vagy az aszályos időszak meghosszabbodását, amik növelhetik a kórokozó gomba virulenciáját (Singh és mtsai. 2023). Mindezek hatással lehetnek a raktári körülmények közötti mikotoxinokkal történő szennyeződések milyenségére és mértékére is (pl. *Apergillus flavus* és *F. graminearum* fajkomplexum megjelenése) (Casu és mtsai. 2024). Közvetett okként kell megemlíteni a növény védekezőképességének a csökkenését, továbbá a rizobiom megváltozását, ami csökkentheti a kórokozóval szembeni hasznos kompetitor mikroorganizmusok számát a talajban a gyökér közelében (Singh és mtsai. 2023).

Rezisztencia

A széleskörben elterjedt nem megfelelő kémiai fungicid használat (úm. téves szerhasználat, nem megfelelő időben és koncentrációban történő alkalmazás, csapadékos

időjárási periódusok figyelmen kívül hagyása) következtében egyre több rezisztens növénypatogén gombatorzs jelent meg az elmúlt két évtizedben (Stukenbrock és Gurr 2023). Ez nagyrészt a gombák genomi plaszticitásának és széles genetikai eszköztárának köszönhető, amik kiváló adaptációs és ellenálló tulajdonságokkal ruházzák fel azokat a fungicidek hatásával szemben (Hawkins és Fraaije 2018, Vande Zande és mtsai. 2023). A kémiai fungicidek ellen kifejlesztett rezisztenciamechanizmusokról a **6. Táblázat** nyújt átfogó képet. A rezisztencia hátterében leggyakrabban a következő négy mechanizmus valamelyike vagy ezekből egyszerre több is állhat: 1) A célpont génmutációja, 2) a célpont túltermelése, 3) a fungicid koncentrációjának csökkentése a sejten efflux folyamatok által, 4) detoxifikáció, vagyis a fungicid metabolikus úton történő lebontása.

Metil-benzimidazol-karbamátokkal szemben mára mintegy 115 gombafaj mutat rezisztenciát elsősorban a β -tubulin gén pontmutációjának következtében, ami miatt a szer nem vagy csak nagyon gyengén képes hozzá kötődni és a működését akadályozni. A szukcinát-dehidrogenáz inhibitorok széleskörű alkalmazása viszonylag hamar rezisztens gombatorzsek kialakulását eredményezte az enzim 257. pozícióban található hisztidinjében bekövetkező aminosavcsere által, ami megakadályozza a szer ahhoz történő kötődését. Az anilin-pirimidinekkel szembeni leggyakoribb rezisztenciamechanizmus az energia-függő efflux pumpák (adenozin-trifoszfát-kötő kazetta transzporterek) túltermelése, amik a fungicid koncentrációját nem hatékony szintre csökkentik a sejten belül. A kinon gátlókkal szembeni rezisztencia hátterében a mitokondriális citokrómban a gén pontmutációja áll, aminek a következtében a szer nem képes a kötőhelyéhez kapcsolódni és a sejtlegzést gátolni. A morfolin/aminokkal szemben a liszttharmatosodást okozó gombák érzékenysége csökkenhet eddig ismeretlen molekuláris mechanizmus által. Az azolokkal szembeni rezisztencia hátterében elsősorban a célpontot (lanoszterin-14 α -demetiláz) kódoló gén pontmutációja vagy annak túltermelése áll. Az első esetben az azol nem, vagy csak kisebb mértékben képes gátolni az enzim működését, míg a második esetben az emelt enzintermelés képes kompenzálni a sejten belül elérhető azol koncentrációjának gátló hatását (Brauer és mtsai. 2019). A fenil-pirrol és dikarboximid fungicidekkel szembeni rezisztencia oka a hisztidin-kinázt kódoló gén mutációja, aminek a következtében a szer nem képes az enzimhez kapcsolódni és annak működését gátolni (Hawkins és Fraaije, 2018).

A fungicidekkel szemben mutatott rezisztencia tárgyalásánál nem szabad szó nélkül elmenni a jelenség mellett, amikor is az azol-alapú fungicidek széleskörű és intenzív használata egy mezőgazdasági területen nagymértékben elősegíti klinikumban

alkalmazott triazolokra rezisztens humánpatogén *A. fumigatus* törzsek kialakulását (Langfeldt és mtsai. 2022).

6. Táblázat. A kémiai fungicidekkel szemben kialakított rezisztenciamechanizmusok és genetikai hátterük.

Szercsoport	Rezisztencia genetikai háttere	Példa
Anilin-pirimidin	Célpont gének mutációja.	<i>Botrytis. cinerea</i>
	Megváltozott efflux pumpa aktivitás.	<i>Oculimacula spp.</i>
	ABC transzporterek túlműködése.	<i>Venturia inaequalis</i>
Demetiláció gátló	Célpont (lanoszterin-14 α -demetiláz) mutációja vagy túltermelése.	<i>B. cinerea</i> <i>Brumeriela jaapii</i> <i>Cercospora beticola</i>
	Megváltozott efflux pumpa aktivitás.	<i>Monilia fruticola</i>
	Metabolizmus megváltozása.	<i>Penicillium digitatum</i>
	Metabolikus úton történő lebontás.	<i>V. inaequalis</i> <i>Zymoseptoria tritici</i>
Dikarboximid	Célpont (MAP/hisztidin-kináz) gének mutációja.	<i>B. cinerea</i>
Fenil-pirrol	Megváltozott efflux pumpa aktivitás.	
Kinon gátló		<i>Alternaria solani</i>
	Célpont (mitokondriális citokrómb gén) mutációja.	<i>Erysiphe necator</i>
	Megváltozott efflux pumpa aktivitás.	<i>Pseudoperonospora cubensis</i>
	Metabolizmus megváltozása.	<i>Pyrenophora teres</i>
	Metabolikus úton történő lebontás.	<i>Pythium aphanidermatum</i> <i>Pyrenophora tritici-repentis</i> <i>V. inaequalis</i>
Metil-benzimidazol-karbamát	Célpont (β -tubulin gén) mutációja vagy túltermelése.	<i>B. cinerea</i> <i>V. inaequalis</i>
Morfolin/amin	Ismeretlen	<i>Erysiphe spp.</i>
		<i>Microsphaera spp.</i>
		<i>Phyllactinia spp.</i>
		<i>Podosphaera spp.</i>
		<i>Sphaerotheca spp.</i>
		<i>Uncinula spp.</i>
Szukcinát-dehidrogenáz inhibitor		<i>Alternaria alternata</i>
	Célpont (szukcinát-dehidrogenáz gén) mutációja.	<i>B. cinerea</i>
	Megváltozott efflux pumpa aktivitás.	<i>Corynespora cassicola</i> <i>Didymella brioniae</i> <i>Podosphaera xanthii</i>

ABC: adenosin-trifoszfát-kötő kazetta (*ATP-binding cassette*), MAP: mitogén-aktivált protein. Hawkins és Fraaije (2018) és Brauer és mtsai. (2019) által szerkesztett táblázatok alapján összeállítva.

Káros hatás a környezetre és az emberi egészségre

A kémiai fungicidek környezetbe történő juttatása nem csak a rezisztens gombatörzsek kialakulását segítheti elő, hanem közvetlenül vagy közvetetten káros hatással lehet a környezetre és az emberi egészségre egyaránt. Ennek oka az, hogy számos fungicid

fizikokémiai tulajdonságai következtében képes a talajban, a felszíni és felszín alatti vizekben felhalmozódni, befolyásolni a vízminőséget és nagy mennyiségben káros hatást gyakorolni valamilyen módon az ott megtalálható élőlényekre. Ez lehet közvetlen toxikus hatás vagy ökotoxikológiai folyamaton keresztül lejátszódó közvetett (Zubrod és mtsai. 2019, Gikas és mtsai. 2022).

A kémiai fungicidek közvetlen toxikus hatása nagymértékben függ annak gombaspecifikus hatásmódjától. A nem teljesen gombaspecifikus célpontokat támadók más élőlényekre nézve is károsak lehetnek. Az inorganikus fungicidek (pl. réz- és kén-alapúak) jelentik a legkisebb toxikológiai kockázatot, habár képesek vízi élőlényekben (algák, halak, rákok, stb.) felhalmozódni és fogyasztásuk esetén az élelmiszer minőségét befolyásolni; továbbá képesek még a talaj mikrobiom összetételét megváltoztatni. (Gikas és mtsai. 2022). A kémiai fungicidek közül néhány példát kiragadva: A demetiláció gátlók elsősorban más, nem növénypatogén gombákra lehetnek károsak. Toxicitásuk viszont vízi növényekre, gerinctelen és gerinces állatokra nézve alacsony, viszont képesek befolyásolni a halak és kételtűek szex szteroid képzését, amivel a nemek arányának felborulását okozzák. A metil-benzimidazol-karbamátok kis mértékben károsak lehetnek vízi mikroorganizmusokra, növényekre és gerincesekre, továbbá közepes mértékben nem növénypatogén gombákra. A kinon gátló szerek a vízi gerinctelenekre és kételtűekre lehetnek károsak közepes vagy kis mértékben. A karbamátok alacsony vagy közepes szintű toxicitással rendelkeznek algákon, baktériumokon és rákokon (Zubrod és mtsai. 2019). Számos tanulmány már bizonyította, hogy az intenzív mezőgazdasági fungicid használat közvetlenül összefüggésbe hozható a mézelő méhek és más fontos beporzó rovarok számának csökkenésével. Néhány fungicid az emésztőrendszer mikrobiomjára hatva a méhek metabolizmusának a felborulását és az állatok elhullását okozhatja (Robertson és Wentworth 2020).

A kémiai fungicidek közvetett káros hatása elsősorban valamilyen ökotoxikológiai folyamaton keresztül nyilvánul meg. Az inorganikus fungicidek (pl. réz- és kén-alapúak) képesek a növény rendelkezésére álló tápanyagok mennyiségét és minőségét befolyásolni a talaj szerkezetének és mikrobiomjának módosításán keresztül, aminek a következtében a növény kórokozókkal szembeni védekezőképessége csökkenhet (Gikas és mtsai. 2022). A fungicidek nagy mennyiségű felhalmozódása elősegíthetik a patogén mikroorganizmusok biofilm képződését, ami megnövelt rezisztenciával és virulenciával ruházza fel azokat. Ezen kívül az egyes élőlényekre nézett nagy toxikus hatásuk következtében a fungicidek a zsákmány-ragadozó és a gazda-

patogén egyensúly felborulását okozhatják (Zubrod és mtsai. 2019). A méhek tömeges pusztulása a fungicidek intenzív alkalmazásának következtében nemcsak ökológiai katasztrófát okozhat, hanem kihathat a mezőgazdasági termelésből származó élelmiszer mennyiségre is (Robertson és Wentworth 2020).

Humán vonatkozásban a kémiai fungicidek intenzív alkalmazása valószínűleg összefüggésbe hozható bizonyos krónikus megbetegedésekkel (daganatos, szív, légzőszervi és idegrendszeri betegségek). Egy legutóbb, öt európai országban zajló széleskörű felmérés alapján a résztvevő személyek 84%-ának a szervezetében legalább két peszticid (köztük fungicid is) is kimutatható volt. A fungicidek emberi egészségre gyakorolt hatása még nem teljesen tisztázott, további kutatásokat igényel (European Environment Agency 2023).

A fent tárgyalt problémákra megoldást kínálhat a korábban már említett, a környezet kémiai peszticidektől történő tehermentesítését is megcélzó EU-s cselekvési terv, az „Út a szennyezőanyag-mentes levegő, víz és talaj felé” (Európai Bizottság 2021), ami az eddigiektől eltérő, alacsony környezeti terhelést okozó gombaellenes mezőgazdasági stratégiák kidolgozását szorgalmazza.

4.2.2. Új lehetőségek a gombakórokozók elleni növényvédelemben

Egy új típusú fungiciddal szemben hasonló elvárások fogalmazhatók meg azokhoz, mint amik tárgyalásra kerültek a humán gyógyászatban alkalmazott antifungális szerek esetében. Ezek közül a három legfontosabb a széles antifungális spektrum, a minimális esély a rezisztencia kialakulásra és a gombaszpecifikus hatásmód. Az első kettő a hosszútávú és hatékony alkalmazást, míg az utolsó a biztonságos, minimális környezeti terheléssel járó használatot biztosítaná (Thind 2021). Ilyen lehetőséget kínálhat új hatásmódú kémiai fungicidek kifejlesztése, biokontroll ágensek és a természetben előforduló biomolekulák alkalmazása, vagy új és az eddigieknél hatékonyabb kiszerelés és célzott kijuttatási mód kifejlesztése.

Új hatásmódú, gombaszpecifikus kémiai fungicidek

A jelenleg elérhető vagy fejlesztés alatt álló fungicid arzenál mintegy 52 különböző módon képes elpusztítani a növénypatogén gombát annak főbb fiziológiai folyamatainak keresztül, amik a nukleinsav metabolizmus, citoszkkeleton és motor fehérjék, sejtlégzés, aminosav és protein szintézis, szignál transzdukció, lipid bioszintézis, transzport

folyamatok, membránintegritás, melanin, sejtmembrán és sejtfal bioszintézis (Lamberth 2022). Ezeknek a folyamatoknak az egyes komponenseit lehetséges célpontokként figyelembe véve új hatásmódú, gombaszpecifikus kémiai fungicid molekulák azonosíthatók molekula könyvtárakból és adatbázisokból laboratóriumi vagy *in silico* nagyátereztőképességű szűrési technikák alkalmazásával. Ezek a molekulák később gombaszpecifitás szempontjából célzottan módosíthatók lehetnek (Brauer és mtsai. 2019). Ilyen technikákkal azonosított és módosított, az eddigieknél újszerűbb hatásmóddal rendelkező kémiai fungicidek a dihidro-orotsav-dehidrogenáz inhibitorok, az oxisztatol-kötő fehérje, a melanin bioszintézis és a Gwt1 fehérje gátlók (Ishii 2024).

A **dihidro-orotsav-dehidrogenáz inhibitorok** (pl. ipflufenokin, quinofumelin) az enzimhez kötődve megakadályozzák a pirimidin-alapú nukleotidok bioszintézisét. Hatékonyak bizonyultak szürkerothadást és liszttharmatot okozó gombákkal és *F. graminearum*-mal szemben. Keresztrezisztenciát nem figyeltek meg ellenük. Hasonló hatásmódú gombaellenes molekula a humán gyógyászati célra kifejlesztett olorofim (**4. Táblázat**), aminek hatékonyságát bizonyították *A. fumigatus*, *Phytophthora infestans* és *Phytophthora aphanidermatum*-mal szemben (Ishii 2024).

Az **oxisztatol-kötő fehérje gátlók** (pl. oxatiapirolin, fuoxapirolin) a lipid transzfert gátolják. Szűk spektrummal rendelkeznek és az Oomycetes osztály tagjai ellen hatásosak. Laboratóriumi kísérletek alapján a rezisztencia kialakulásának a kockázata közepes vagy magas és keresztrezisztencia is kialakulhat (Ishii 2024).

A **melanin bioszintézis gátlók**, mint pl. a triciklázol a hidroxinaftalin-reduktáz vagy a trihidroxidihidronaftalin-dehidratáz gátlásán keresztül akadályozzák a melanin bioszintézisét, ami elengedhetetlen az apresszóriumon keresztül történő fertőzéshez. Rezisztencia és keresztrezisztencia kialakulásának nagy a kockázata velük szemben. Egy másik vegyület a tolprocarb szintén a melanin bioszintézisét akadályozza, de a poliketidszintáz gátlásán keresztül. Rezisztencia kialakulásának a lehetősége fennáll vele szemben, de keresztrezisztenciát még nem figyeltek meg. Elsősorban a rizsrobbanást okozó *Pyricularia oryzae*-vel szemben hatásosak (Ishii 2024).

A humán gyógyászati célra kifejlesztett **Gwt1 fehérje gátlók** (pl. aminopirifén) a glükózilfoszfátidilinozitol-kapcsolt sejtfal transzfer protein 1 gátlásán keresztül a mannoproteinek sejtfalba történő beépülését akadályozzák (**4. Táblázat**). Hatékonyak tömlős- és bazídiumos gombakórokozókkal szemben egyaránt, pl. *B. cinerea*, *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*, *Podosphaera xanthii*, *Puccinia recondita*. Rezisztencia és keresztrezisztencia kialakulásának a lehetősége fennáll ellenük (Ishii 2024).

A fent említett nagyáteresztőképességű szűrési technikáknak köszönhetően, hatékony, de eddig ismeretlen hatásmóddal rendelkező fungicid-jelölt molekulákat is azonosítottak. Ilyen például a tebufoquin *Pestalotia longiseta* és *P. oryzae* ellen, a pikarbutrazox *Pythium* spp., *Fusarium* spp., *Rhizopus* spp. ellen, és a dipimetitron *Phytophthora*, *Botrytis* spp. és lisztharmat ellen (Ishii 2024).

Ezekén kívül az utóbbi években számos újszerű szetrol-demetiláz gátló (pl. mefentriflukonazol, pirisoxazol), szukcinát-dehidrogenáz gátló (pl. benzovindifupir, pirazifumid, pidifumetofén), kinon gátló (pl. UK-2A, ametoktradin,) és tubulin gátló (pl. karbendazim, tiabendazol, dietofenkarb, zoxamid, etaboxám) fungicid is kifejlesztésre került, amelyekből néhány már engedélyezett vagy engedélyeztetés alatt áll. Ezekkel szemben eltérő mértékű a rezisztencia kialakulásának kockázata, (Ishii 2024).

Biokontroll ágensek és biomolekulák

A gombaellenes hatással rendelkező biokontroll ágensek vagy egyes élőlényekből származó biomolekulák növényvédőszerként történő alkalmazása alacsonyabb környezeti terheléssel és ökológiai kockázattal járhat, mint a kémiai fungicideké (Palmieri és mtsai. 2022).

A biokontroll ágens legtöbbször a kórokozó gomba egyik antagonista szervezete, ami legtöbbször egy másik mikroorganizmus. Az utóbbi években számos ilyen azonosítottak, amik életműködésük következtében hatékonyan képesek a kórokozót a környezetükből kiszorítani (kompetíció) vagy elpusztítani (mikoparazitizmus vagy antibiózis) anélkül, hogy káros hatást gyakorolnának a gazdaszervezetre vagy a rizobiomra (Palmieri és mtsai. 2022). További előnyük lehet, hogy olyan molekulákat is képesek a környezetükbe bocsájtani, amik fokozzák a növény védekezőképességét. A talajban lévő növényi kórokozó gombák (pl. *Fusarium* spp., *Pythium* spp., *Phytophthora* spp., *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia* spp., *Sclerotium rolsii*, *Verticillium dahliae*) ellen elsősorban a *Trichoderma* fajok hatásosak (*Trichoderma atroviride*, *Trichoderma hamatum*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viride*), de számos baktérium (*Bacillus* spp., *Burkholderia* spp., *Pseudomonas* spp., *Streptomyces* spp.) is felveszi ellenük a harcot. Levegőben terjedő növénypatogén gombák ellen felszíni szerként alkalmazva hatásosnak bizonyult pl. egy *Chaetomium* faj az *Athelia bombacina* és *Venturia inaequalis* ellen; a *Rhodotorula kratochvilovae* *Monilinia* spp. ellen, és a *Tuberculina maxima* *Cronartium ribicola* ellen. De nem csak a gombákat érdemes megemlíteni, hanem azt is, hogy *Bacillus* fajok hatékonyan képesek gátolni az *Alternaria alternata*-t,

míg a *Pseudomonas protegens* a *B. cinerea*-t, *A. alternata*-t, *Aspergillus niger*-t, *Penicillium expansum*-ot, *Neofusicoccum parvum*-ot, *Phaeomoniella chlamydospora*-t és a *Phaeoacremonium aleophilum*-ot. Raktári körülmények között hatékonynak bizonyult például a *Pseudomonas syringae* a *B. cinerea* és *P. expansum*, míg az *Aureobasidium pullulans* a *B. cinerea*, *Rhizopus stolonifer*, a *R. kratochvilovae* pedig a *P. expansum* által okozott kártételek visszaszorításában. Ezeken kívül még számos példát találhatunk a szakirodalomban, de engedéllyel mindeddig *Bacillus* spp.-, *Pseudomonas chlororaphis*-, *Streptomyces* spp.-, *Ampelomyces quisqualis*-, *A. pullulans*-, *Candida oleophila*-, *Clonostachys rosea*-, *Coniothyrium minitans*-, *Pythium oligandrum*-, *Saccharomyces cerevisiae*-, *Trichoderma* spp.-, *Verticillium albo-atrum*-alapú készítmények rendelkeznek (Palmieri és mtsai. 2022).

A növényből vagy egy másik élőlényből származó biomolekula is hatékonyan felhasználható a gombákkal szembeni növényvédelemben. Egy ilyen molekulának az előnye nemcsak abban rejlik, hogy elpusztítja a kórokozó gombát, hanem abban is, hogy serkentheti a gazdanövény védekezőképességét, növekedését, és biotikus stressztűrő képességét (Schmaltz és mtsai. 2023). Ilyen molekulák lehetnek például növényi probiotikumok (Schmaltz és mtsai. 2023), különböző fitokemikáliák (Deresa és Diriba 2023) és rövid kettősszálú RNS molekulák és peptidek (Rosa és mtsai. 2022). A növényi probiotikumok elsődleges hatása összetett és abban rejlik, hogy elősegíthetik a növény fejlődését (pl. auxin, etilén, giberellin, citokin termelés serkentése), tápanyagokat hozzáférhetővé tehetnek (pl. bakteriális sziderofórok) és a különböző stresszhatásokkal (köztük biotikus) szemben ellenállóbbá (pl. antifungális anyagok, patogén inhibitorok) tehetik a növényt (Schmaltz és mtsai 2023). Fitokemikáliák alatt érthetjük egyes növények nyers kivonatát vagy azokból származó másodlagos anyagcseretermékeket. Szinte megszámlálhatatlan növény kivonatról már bebizonyosodott, hogy hatékonyan képesek visszaszorítani vagy mérsékelni a gombák által okozott fertőzéseket és kártételeket, minimális az esély a velük szembeni rezisztencia kialakulására és környezetbarát növényvédelmi stratégiát képviselhetnek gombára való szelektivitásuk következtében. Alkalmazhatóságuk legnagyobb hátránya az, hogy a nagy mennyiségben történő gazdaságos előállításuk és szántóföldön is hatékony kiszerezésük még nem teljesen megoldott. Jelenleg hét különböző növényből (többek között *Reynoutria sachalinensis*, *Swinglea glutinosa*, *Melaleuca alternifolia*, *Thymus vulgaris*) származó fitokemikália készítmény van kereskedelmi forgalomban elsősorban *Botrytis*, *Fusarium* és lisztharmat fertőzések ellen (Deresa és Diriba 2023). Rövid kettősszálú RNS

molekulákon és peptideken alapuló növényvédelmi stratégiák lehetősége eltérő technológiai fejlettségi szinteken már adott. A kettősszálú RNS molekulák elsősorban az RNS interferencia (sejtfelépítésben vagy metabolizmusban fontos géneket célozva) jelenségén keresztül fejtik ki antifungális hatásukat, míg a rövid peptidek/fehérjék (pl. növényi defenzinek) eltérő hatásmóddal (pl. sejtmembránroncsolás, apoptózis indukció) képesek a gombák növekedését visszaszorítani vagy azokat elpusztítani. Gyakorlati alkalmazásukat határaltatja az, hogy gazdaságos előállításuk, környezeti stabilitásuk, hatékony kiszerezésük és kijuttatási technológiájuk még nem megoldott (Rosa és mtsai. 2022).

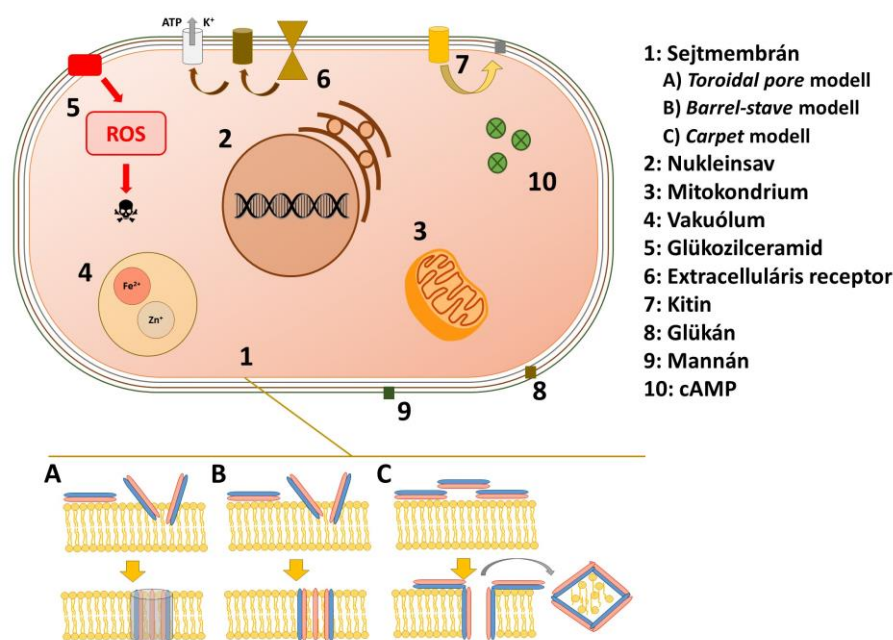
Kiszerezés, kijuttatás, nanotechnológia

A régebb óta alkalmazott kémiai-alapú fungicidek és az újonnan bevezetésre kerülőkkel szemben felmerülő problémák (úm. biztonságos és hatékony alkalmazhatóság, rezisztencia kialakulás) megoldására újfajta kiszerezési mód és kijuttatási technika is megoldást jelenthet. Egy új kiszerezési módnak a következő kihívásoknak kell megfelelnie: környezet védelme, ellenállóképesség szélsőséges környezeti hatásokkal szemben (pl. UV-sugárzás, pH, hőmérséklet, párolgás, oxidáció, stb.), célba juttatás szempontjából előnyös fizikokémiai tulajdonságok, kontrollálható célzott kijuttatás, alacsony koncentrációban történő hatékonyság. Ezekre a kihívásokra jó megoldást jelenleg a nanotechnológia alkalmazása nyújthat, amikor is a már rendelkezésre álló kémiai fungicideket, biomolekulákat (dsRNS, peptidek, növényi metabolitok) nanorészecskébe csomagolják vagy nanorészecskékhez kötik (Tleuova és mtsai 2020, Li és mtsai. 2021a), vagy bizonyos nanorészecskéket alkalmaznak növényvédőszerként (Brauer és mtsai. 2019). Az eddigi kísérleti eredmények azt mutatják, hogy a nanorészecske alkalmazása csökkenti a környezeti terhelést és a rezisztencia kialakulásának a lehetőségét, ellenállóvá teszi a fungicidet szélsőséges környezeti hatásokkal szemben, gyorsabb és hatékonyabb célba juttatást tesz lehetővé, továbbá az eddig megszokottól alacsonyabb dózisú hatékony alkalmazás is elérhetővé válik. Hátrányukat a körülményes gyártási technológia, a magas költség és az eddig még nem tisztázott emberi egészségre gyakorolt hatás jelenti (Tleuova és mtsai. 2020, Li és mtsai. 2021a). Fungicidek nano csomagolóanyagaként és hordozójaként szén-alapú nanoanyagok (pl. grafén, grafén-oxid), szintetikus anionos anyagok (pl. dupla hidroxid rétegek), szilika nanorészecskék, különböző polimerek, fém nanorészecskék egyaránt alkalmazhatóak (Li és mtsai. 2021a). Önálló nanofungicidként szóba jöhet a vas(II)-oxid,

réz-oxid, titán-dioxid (Brauer és mtsai. 2019). Számos nano-alapú fungicid fejlesztés alatt áll, de jelenlegi információk alapján még egyik mezőgazdasági alkalmazása sem került elfogadásra az EU-ban elsősorban az állati és emberi egészségre gyakorolt hosszútávú hatás tisztázatlansága következtében (EFSA 2018).

4.3. Antifungális hatású peptidek

Számos természetes eredetű, azok (szemi)szintetikus származékain alapuló, vagy *de novo* szintetizált antifungális hatással rendelkező peptid/protein (AFP) képes akár gyógyszer-rezisztens humán- vagy növénypatogén gombák növekedését gátolni. Ezek új típusú antifungális szerekként alkalmazhatóak lehetnek a gyógyászatban (Buda De Cesare és mtsai. 2020, de Ullivarri és mtsai. 2020), vagy fungicidként és terménytartósítószerként a növény- és terményvédelemben (Martínez-Culebras 2021, Zhang és mtsai 2023). Az AFP-knek számos előnyös tulajdonságuk van a hagyományosan alkalmazott antifungális szerekekkel szemben. Ezek a következők: 1) Természetes eredetűek, ami potenciális biofarmakológiai termékekké teszi őket. 2) Széles spektrummal rendelkeznek, ami miatt sokféle gombafertőzéssel szemben bevethetők lehetnek. 3) A gombára nézve szelektív hatásmóddal rendelkeznek, ami csökkenti a mellékhatások kialakulásának és a környezeti toxicitás kockázatát. 4) Minimális a rezisztencia kialakulásának az esélye velük szemben mivel gyakran gyorsan és fungicid módon hatnak és egyszerre több gombaszpecifikus célpontot is támadhatnak eltérő mechanizmussal (Buda De Cesare és mtsai. 2020, de Ullivarri és mtsai. 2020, Li és mtsai. 2021b). A hatásmechanizmus általában függ az alkalmazott peptid koncentrációtól. Relatív nagy koncentrációban alkalmazva közvetlenül a sejtmembránt roncsolják, ami gyorsan a sejt halálához vezet. Alacsonyabb koncentrációban alkalmazva közvetlen vagy közvetett formában gátolhatják a sejtfal kiépülését, a nukleinsavakhoz kötődve azok roncsolódását okozhatják, a transzkripciót gátolhatják, sejtorganellumok (pl. mitokondrium és vakuólumok) működésének zavarát okozhatják, reaktív oxigén származékok felhalmozódását idézhetik elő, programozott sejthalált és autofágiát indukálhatnak, felboríthatják a kation homeosztázist, megváltoztathatják a gomba metabolizmusát, szignáltranszdukciós utakat aktiválhatnak, a sejtciklust zavarhatják meg (Martínez-Culebras és mtsai. 2021a, Struyfs és mtsai. 2021). Néhány AFP célpontját és hatásmódját a **3. Ábra** mutatja be.



3. Ábra. Az antifungális peptidek/fehérjék főbb célpontjai és hatásmódjai gombasejteken. **1: Sejtmembrán** (pl. defenzin, tionin) - pórusképzés háromféle módon (A – C). **2: DNS** (pl. aktinomycin, magainin) - roncsolás. **3: Mitokondrium** (pl. hisztatin) - funkciógátlás. **4: Vakuólum** (pl. VL2397, psoriasin) - funkciógátlás. **5: Glükoszilceramid** (pl. defenzin) - ROS és sejthalál indukció. **6: Extracelluláris receptor** (pl. hisztatin) - K⁺-csatorna transzporteren keresztül K⁺ és ATP (adenozin-trifoszfát) efflux. **7: Kitin** - közvetlen kötésen (pl. defenzin), vagy dipeptid permeázon (pl. nikkomycin) keresztül kitin-bioszintézis gátlás. **8: Glükán** (pl. echinokandin) - glükán-szintáz gátlás. **9: Mannán** (pl. pradimicin, benanomycin) - sejtfal kiépülés gátlás. **10: cAMP** (pl. α -MSH) – intracelluláris cAMP szintcsökkenés. ROS: reaktív oxigén származékok (*reactive oxygen species*).

Az AFP-k esetében a sok előnyös tulajdonság mellett néhány hátrányos tulajdonsággal is számolni kell, amik nagymértékben befolyásolhatják gyakorlati alkalmazhatóságukat. Ezek a nagymértékű instabilitás a gazdaszervezetben elsősorban enzimatis degradációnak köszönhetően, a gazdasejt lízise nagy koncentrációban történő alkalmazás esetén, a rossz farmakokinetikai és -dinámiai tulajdonságok, a nem megoldott gyógyszerbevitel és célba juttatás, továbbá az alacsony kihozatalú, költséges előállíthatóság (Struyfs és mtsai. 2021, Pimienta és mtsai. 2022, Konakbayeva és Karlsson 2023). Az előbbieken a szerkezet-hatásmód kapcsolat megismerése után a peptidek célzott és tudatos tervezése és kémiai módosítása segíthet (de Ullivarri és mtsai. 2020). Az utóbbi kihívásra pedig megoldást nyújthat megfelelő expressziós rendszerek kidolgozása (Deo és mtsai. 2022), továbbá az egyre gazdaságosabbá és hatékonyabbá váló szilárd fázisú peptidszintézis módszerek (Hisashi és Fuse 2022).

Az utóbbi években egyre több és több antimikrobiális peptidet (köztük számos antifungális hatással rendelkezőt) azonosítottak különböző élőlényekből és ezek száma intenzíven növekszik. Az *Antimicrobial Peptide Database*-ben (<https://aps.unmc.edu/>) 2022 decemberében 1233 gombaellenes hatással rendelkező peptidet regisztráltak (Wang és Wang 2016, Vanreppelen és mtsai. 2023). Ez a szám jelen fejezet írásakor (2024. május) már 14%-kal több, 1433. Ez a hat hónapon belül bekövetkezett jelentős számbeli növekedés tisztán mutatja a tudományos közösség nagymértékű érdeklődését irántuk.

Eltérő szerkezetű és hatásmódú AFP-ket szinte minden élőlényből lehet izolálni. AFP-ket termelhetnek **mikroorganizmusok**, úgymint baktériumok (pl. *P. syringae* - syringomicin, *Bacillus subtilis* - iturin A, *Streptomyces* spp. - pepsztatin A, nikkomycin) és a gombák (pl. *Aspergillus aculeatus* - aculeacin A). A **növények** is kiváló forrásai gombaellenes hatással rendelkező peptideknek (pl. *Raphanus sativus* - defenzin, *Capsicum annuum* - thionin, *Nicotiana tabacum* és *Zeay mays* - thaumatin-szerű fehérje). **Állatokból** is számos AFP-t leírtak és jellemeztek már. Ezek elsősorban puhatestűekből (pl. *Halocynthia aurantium* - halocidin, *Philomycus bilineatus* - phibilin), rovarokból (pl. *Stomoxys calcitrans* és *Apis mellifera* - cerkopin, *Drosophila melanogaster* és *Tenebrio molitor* - defenzin), kételtűekből (pl. *Xenopus laevis* - magainin 2, *Rana temporaria* - temporin A), madarakból (pl. *Gallus gallus* - gallinacin, defenzin, cathelicidin, *Meleagris gallopavo* - defenzin), emlősökből (pl. *Rabbit bocaparvovirus* - defenzin, *Bos taurus* - cathelicidin és laktoferrin-származék) származnak (Bondaryk és mtsai. 2017, Rodríguez-Castaño és mtsai. 2023). Az **emberi** szervezet is számos AFP-t képes termelni, amik a veleszületett immunrendszer fontos tagjai és jelentős szerepet töltenek be a kórokozó gombákkal szembeni védelemben (Mercer és O'Neil 2020). Ezek lehetnek defenzinek, cathelicidinek, hisztatinok és laktoferrin-származékok (Bondaryk és mtsai. 2017).

Számos tanulmány már rámutatott arra, hogy az egyes élőlények által termelt AFP-k a gombaellenes hatáson kívül más funkcióval is rendelkezhetnek az élő szervezetben. Így például a növényi defenzinek gátolhatják a gyökérnövekedést, befolyásolhatják a pollen élet- és csírázókéességét, továbbá fokozhatják a stresszhatásokkal szembeni tűrőképességet. Az emlősökben megtalálhatók fokozzák bizonyos sejttípusok (elsősorban immunsejtek), érést, elősegítik ezek migrációját a fertőzés helyére. Ezeken kívül még számtalan más példa is megtalálható a szakirodalomban, amit felsorolni is nehéz (Hegedüs és Marx 2013).

A fentebb említett peptidek már önmagukban vagy tudatos módosításuk után kiváló alapul szolgálhatnak új és az eddigieknél hatékonyabb antifungális stratégiák

kidolgozására a gyógyászat és növényvédelem számára (Konakbayeva és Karlsson 2023). Bizonyos algoritmusokon alapuló webszerverek már rendelkezésre állnak antifungális hatással rendelkező peptidek szűrésére és célzott módosításuk tervezésére a kedvezőbb hatás elérése érdekében (Agrawal és mtsai. 2018). Általánosságban elmondható, hogy az antifungális hatás növelhető a hidrofóbicitás és a pozitív össztöltés emelésével, oligomerizációval, N- vagy C-terminális vég csonkolásával. A sók és a vészsérum AFP-kre gyakorolt gombaellenes aktivitást csökkentő hatása kiküszöbölhető hordozóhoz történő konjugációval, diszulfid-hidakon keresztüli ciklizációval, N-terminális acilációval és C-terminális amidációval, enantiomerizációval és nem természetes molekulák beépítésével. A hemolitikus hatás pedig csökkenthető az amfipatikus tulajdonság csökkentésével (Thery és mtsai. 2019).

4.3.1. Antifungális hatású peptidek alkalmazási lehetőségei a gyógyászatban

Az AFP-k gyógyászati célú alkalmazása jelenleg topikális szerként, vagyis felszíni mikózisok kezelésére képzelhető el a nem előnyös farmakokinetikai és -dinámiai tulajdonságaik miatt, elsősorban különböző candidiázisok kezelésére önmagukban vagy hagyományos antifungális szerrel együtt kombinálva. Az ilyen peptidek közül már számos elérte a klinikai tesztfázisok valamelyik állomását, de terápiás szerként még csak kevés került kereskedelmi forgalomba. A P113 nevű peptid elsősorban orális, vaginális és szemet érintő candidiázis ellen bizonyult hatásosnak, míg az NP213 körömgombásodás ellen, de ez utóbbi megbukott a placebo teszteken (de Ullivarri és mtsai. 2020).

Szisztémás alkalmazást tekintve invazív mikózisok kezelésre a hLF(1-11) és a CZEN-002 bizonyul ígéretes jelöltnek, az előbbi a kórokozó közvetlen elpusztítása, míg az utóbbi a gazda immunrendszer védekezőképességének a fokozás miatt. Ígéretes klinikai tesztfázisokat követően mind a mai napig egyik sem került kereskedelmi forgalomba (de Ullivarri és mtsai. 2020). Különböző eredetű és típusú gombás fertőzések kezelésére széleskörűen hatékonynak bizonyult a korábban már említett és ígéretes fejlesztési stádiumban lévő nikkomycin Z, aureobazidin A és VL-2397. (Buda De Cesare és mtsai. 2020). *Candida* okozta fertőzések kezelésére további ígéretes jelöltek a cathelicidinek (pl. LL-5, LL-37, omiganan, iseganan), hisztatinok és mucinok (pl. PAC113, hisztatin 5) és egyéb peptidek (pl. laktoferrin, WLBU2, XF-73), amelyek már elérték a klinikai tesztfázisok valamelyik állomását (Rodríguez-Castaño és mtsai. 2023, Vanreppelen és

mtsai. 2023). Két laktoferrin-eredetű peptid ígéretes adjuvánsként jön szóba, ugyanis azokkal vagy amfotericin B-vel szinergista kölcsönhatásba lépnek *Candida* fajokkal szemben (de Ullivarri és mtsai. 2020). Mindezek mellett meg kell említeni azt, hogy számos AFP képes megakadályozni a gombák biofilm képzését és/vagy hatékonyan elpusztítani a már kialakult biofilmet elsősorban a felszíni adhézió gátlásának és olyan gének negatív regulációjának révén, amelyek részt vesznek ebben az összetett folyamatban (pl. planktonikus sejt - pszeudohifa - hifa átalakulást szabályozó gének). Ilyen peptid néhány defenzin, cathelicidin, hisztatin és *de novo* tervezett peptidek (Oshiro és mtsai. 2019).

4.3.2. Antifungális hatású peptidek alkalmazási lehetőségei a gombakórokozók elleni növényvédelemben

Számos, eltérő élőlényekből származó vagy *de novo* szintetizált, antifungális hatással rendelkező peptidről mára bebizonyosodott, hogy hatékonyan képesek gátolni szántóföldi növénypatogén és raktári kártevő gombák növekedését (Thery és mtsai. 2019, Martínez-Culebras és mtsai. 2021a, Tang és mtsai. 2023). A mezőgazdaság egyes területein történő alkalmazhatóságuk szempontjából előnyös tulajdonságaik azok, hogy viszonylagosan alacsony koncentrációban már képesek elpusztítani a gombát, kicsi a rezisztencia kialakulásának az esélye ellenük, egyes kémiai fungicidekkel és a növény kórokozókkal szembeni védekezőrendszerével szinergisztikus kölcsönhatásba léphetnek, továbbá szimbióták befolyásolásán keresztül serkenthetik a növény növekedését. Alkalmazásuk szempontjából hátrányos tulajdonságuk a viszonylagosan magas előállítási költség (Thery és mtsai. 2019, Tang és mtsai. 2023). Az AFP-k növény és terményvédelemben történő integrálása kétféleképpen valósulhat meg: 1) cisz- vagy transzgenikus növények előállítása, amelyek saját vagy idegen-eredetű antifungális hatású peptideket expresszálnak nagy mennyiségben, amik a gombakórokozóval szemben fokozott ellenállóképességgel ruházzák fel őket, 2) antifungális hatású peptidek biofungicidként történő alkalmazása permetszer formájában. Az elsőt nagymértékben hátráltatja a genetikailag módosított növényekkel kapcsolatos jelenlegi szabályozások (Tagliabue 2017), továbbá a genetikailag módosított élőlényekből származó élelmiszerekkel szemben mutatott vásárlói visszatetszés (Lucht 2015). AFP-ket túltermelő cisz- és transzgenikus növények létrehozására kiválóan alkalmasak a thaumatin(-szerű) fehérjék, thioninok, defenzinek, hevein-szerű proteinek, knottin-szerű proteinek, lipid transzfer

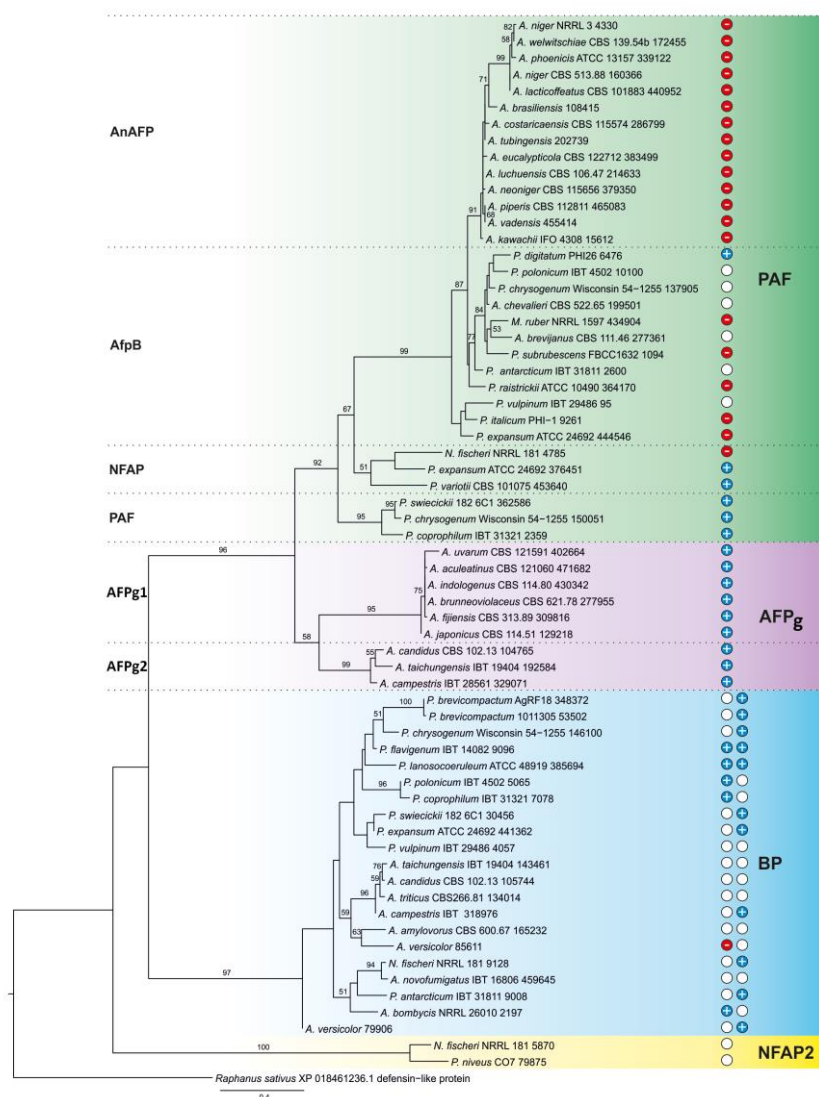
proteinek, és a snakin. Egy kiváló gyakorlati példa az alfalfa antifungális hatású peptidet túltermelő burgonyanövény, ami szántóföldi körülmények között is megnövelt ellenállóképességgel rendelkezett *Phytophthora cactorum* és *F. solani* fertőzésekkel szemben. A felületi permetszerként történő felhasználási lehetőséget gátolhatja a korábban már említett magas előállítási költség, a gyenge oldhatóság, a környezeti körülmények közötti instabilitás és a nem teljes mértékben megoldott kiszerezési és kijuttatási technika (Thery és mtsai. 2019, Tang és mtsai. 2023). Mindezek miatt nem véletlen, hogy csak kevés AFP-n alapuló permetszer jutott túl a laboratóriumi vagy üvegházi előkísérleteken. Szántóföldi körülmények között hatékony védelmet biztosított például a *Nicotiana megalosiphon*-ból származó NmDef02 *Peronospora hyoscyami*-mal, a *Trichoderma*-eredetű trichogin *Plasmopara viticola*-val szemben, továbbá a szintetikus *body protection compound* peptidek *A. niger*, *Fusarium oxysporum*, *P. expansum*, *R. stolonifer*, *Stemphylium vesicarium* ellen; és a ϵ -PL *B. cinerea* ellen (Tang és mtsai. 2023). Különböző eredetű antifungális hatású peptidről már bebizonyosodott, hogy permetszerként a terményre juttatva raktári körülmények között gátolják a mikotoxinogén gombák (elsősorban *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Penicillium* spp.) elszaporodását vagy csökkentik mikotoxin termelő képességüket. Ez a folyamat általában oxidatív stressz indukcióval és bioszintézis utak specifikus enzimkomponenseinek a gátlásán keresztül valósul meg (Martínez-Culebras és mtsai. 2021a).

4.4. Eurotiomycetes-eredetű antifungális proteinek

4.4.1. Csoportosítás és szerkezet

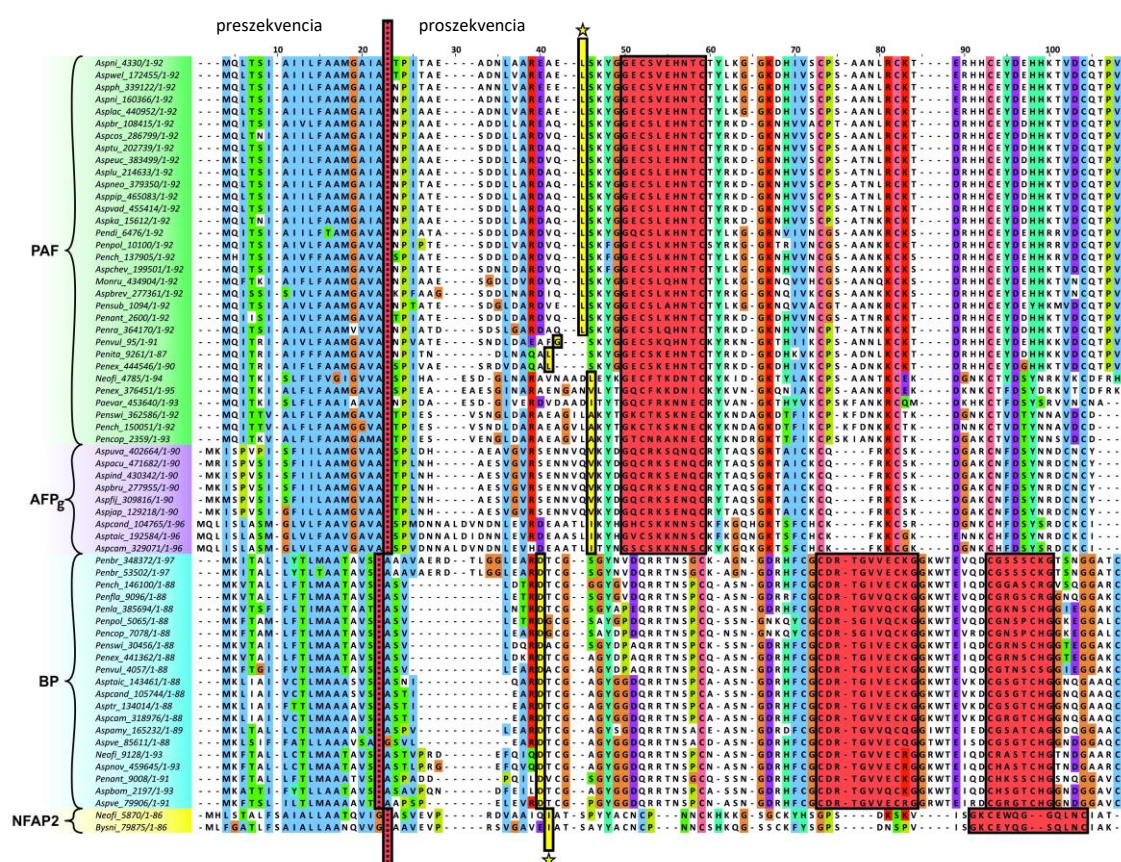
Az 1990-es évek második és a 2000-es évek elején bebizonyosodott, hogy a fonalas tömlősgombák Eurotiomycetes osztályának tagjai (elsősorban az *Aspergillus* és a *Penicillium* fajok) képesek kis molekulatömegű, kationos AFP-ket termelni és azokat a környezetükbe szekretálni, amik hatékonyan gátolják más, elsősorban fonalgombák növekedését (Marx 2004). Azóta, a genomi adatbázisok bővülésével az Eurotiomycetes osztály számos fajából kimutattak ilyen fehérjéket, amiket leszármazástanilag négy nagy csoportra lehet osztani az elsőként leírt képviselőhöz való hasonlóság alapján (**4. Ábra**): **1) *Penicillium chrysogenum* antifungális protein PAF-, 2) *Aspergillus giganteus***

antifungális protein AFPg-, **3)** *Penicillium brevicompactum* „bubble” protein BP-, és a jelen dolgozat tárgyát is képző **4)** *Neosartorya (Aspergillus) fischeri* antifungális protein 2 NFAP2-szerű fehérjék. Érdekes az, hogy egy gomba izolátum több antifungális protein csoport/alcsoport egy, vagy akár több tagjának a termelésére is egyaránt képes. Ilyen például a *P. chrysogenum*, ami a PAF-ot, PAFB-t (PAF-szerű fehérjék), továbbá a PAFC-t (BP-szerű fehérje) is termel (**4. Ábra**) (Sonderegger és mtsai. 2018).



4. Ábra. Az Eurotiomycetes osztály által termelt antifungális proteinek filogenetikai fája (*Maximum-likelihood*). A fajnevek után az izolátum és a fehérje azonosítója (lsd. Sonderegger és mtsai. 2018) látható. A korongok a fehérje elsődleges szerkezetében fellelhető γ -core motívumok számát és fizikokémiai tulajdonságait jelölik: fehér és üres - közel semleges össztöltés ($-0,2 - +0,3$), piros és negatív - negatív össztöltés ($\leq -0,9$), kék és pozitív - pozitív ($\geq +0,8$) össztöltés. AFPg: *Aspergillus giganteus* antifungális protein, AnAFP: *Aspergillus niger* antifungális protein, AfpB: *Penicillium digitatum* antifungális protein, BP: *Penicillium brevicompactum* „bubble” protein, NFAP és NFAP2: *Neosartorya fischeri* antifungális protein (1) és 2, PAF: *Penicillium chrysogenum* antifungális protein. Sonderegger és mtsai. (2018) alapján.

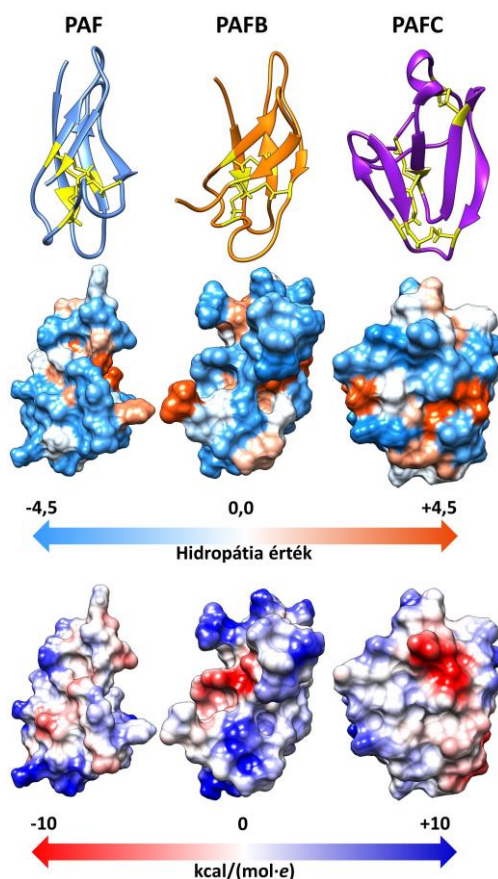
Annak ellenére, hogy az egyes csoportokat alkotó fehérjék aminosav sorrendje nagymértékben különbözik egymástól, mégis minden fehérje elsődleges szerkezetében megfigyelhető egy vagy két evolúciósan konzervált, ún. γ -core motívum (GXC-X₃₋₉-C aminosavak alkotják, ahol az X bármilyen aminosav lehet), ami fontos szerepet játszhat a gombaellenes hatás kifejtésében (5. Ábra) (Sonderegger és mtsai. 2018). A γ -core motívum a növényi- és állati-eredetű antimikrobiális hatással rendelkező fehérjékben és peptidekben szintén megtalálható és azokban funkcionális vagy szerkezet kialakító szerepe lehet (Yount és Yeaman 2006).



5. Ábra. Az Eurotiomycetes osztály által termelt antifungális proteinek aminosavsorrendjének illesztése (ClustalW). A fajnevek után a fehérje azonosítója (ld. Sonderegger és mtsai. 2018) és az aminosavak száma látható. A piros szaggatott vonal a preszekvencia, míg a sárga vonal és a csillag a proszekvencia lehasadási helyét és az érett fehérje első N-terminális aminosavát jelzi. Vörös háttérrel keretben a γ -core motívum került kiemelésre. Az aminosavak héttérszíne ClustlX színséma alapján látható. AFPg: *Aspergillus giganteus* antifungális protein, BP: *Penicillium brevicompactum* „bubble” protein, NFAP2: *Neosartorya fischeri* antifungális protein 2, PAF: *Penicillium chrysogenum* antifungális protein. Sonderegger és mtsai. (2018) alapján.

Az Eurotiomycetes AFP-k további közös tulajdonsága az, hogy preproteinként expresszálódnak és a szignálszekvenciaként funkcionáló pre- és az antifungálisan aktív szerkezet kialakulását megakadályozó proszekvencia a fehérje sejtől történő kijutása és érése során lehasad (**5. Ábra**). Ez után nyeri el a fehérje a jellegzetes harmadlagos térszerkezetét, amit a 6 vagy 8 cisztein között létrejövő, 3 vagy 4 diszulfid-híd stabilizál megfelelő mintázatban (Sonderegger és mtsai. 2018).

Az Eurotiomycetes osztály tagjai által szekretált AFP-k harmadlagos szerkezete nagyon hasonló az élővilágban általánosan előforduló β -defenzinekéhez, ami magmágneses rezonancia spektroszkópiás (NMR, *nuclear magnetic resonance*) mérések alapján egy β -hordó-szerű struktúra, vagyis antiparallel állású β -redők hurokrégiókkal összekapcsolva (példák: **6. Ábra**).



6. Ábra. A *Penicillium chrysogenum* által termelt három különböző antifungális protein, a PAF (Batta és mtsai. 2009, *Protein Data Bank* azonosító: 2KCN), PAFB (Huber és mtsai. 2018, *Protein Data Bank* azonosító: 2NC2) és PAFC (Czajlik és mtsai. 2021., *Protein Data Bank* azonosító: 6TRM) magmágneses rezonanciaspektroszkópiával meghatározott oldatbeli harmadlagos szerkezete (felül), hidrofóbicitás (középen) és töltöttség (alul) felszíne. A felső ábrán sárgával a ciszteinek és a közöttük kialakuló diszulfid-hidak kerültek kiemelésre. A fehérjeszerkezetek UCSF Chimera szoftverrel megjelenítve (Pettersen és mtsai 2004). Galgóczy és mtsai. (2019) alapján.

Az Eurotiomycetes-eredetű AFP-k felszínén hidrofil és hidrofób területek váltakozva helyezkednek el (**6. Ábra**), ami jó oldhatóságot biztosít számukra különféle oldószerekben. Ehhez hasonlóan pozitív, semleges és negatív töltöttségű területek váltakozó elhelyezkedése is megfigyelhető a felszínükön (**6. Ábra**) (Batta és mtsai. 2009, Fizil és mtsai. 2015, Huber és mtsai. 2018, Czajlik és mtsai 2021). A kompakt és diszulfid-hidak által stabilizált szerkezetnek köszönhetően igencsak ellenállók szélsőséges környezeti körülményekkel (magas vagy alacsony pH, extrém magas hőmérséklet) és proteolitikus enzimek hatásaival szemben, és gombaellenes aktivitásukat az ezeknek történő kitettség után is megőrzik (Galgóczy és mtsai. 2010).

Az AFP-k utóbbi 10 évben intenzívebben tanulmányozott képviselőinek elsődleges szerkezetét és fizikokémiai tulajdonságait a **7. Táblázat** foglalja össze.

4.4.2. Antifungális hatás, hatásmechanizmus és biológiai szerep

Az Eurotiomycetes-eredetű AFP-k elsősorban más, az élőhelyükön kompetítorként szóba jöhető azonos osztályba tartozó fonalagomba fajjal szemben aktívak, de a PAF, BP- és az NFAP2- csoport tagjainak élesztőgomba ellenes hatását is leírták (Marx 2004, Galgóczy és mtsai. 2010,2019, Holzknecht és mtsai. 2020). Antifungális spektrumuk kismértékű átfedéssel eltér egymástól. Annak ellenére, hogy gombaellenes hatásukat eltérő módon fejthetik ki, azok fenotipikus megnyilvánulásai nagyon hasonlóak, amelyek a gátolt vagy késleltetett spóracsírázás; a többszörösen elágazó, duzzadt végű hifák létrejötte; továbbá a hifa, csírázó spóra vagy sejt szétesése. Ez az antifungális hatás nagymértékben függ a tesztek során alkalmazott tápközeg ionerősségétől, ui. az egy- vagy kétértékű kationra disszociáló sók (pl. NaCl, KCl, Mg₂SO₄) nagy koncentrációjú jelenléte csökkenti a fehérje hatékonyságát (Marx 2004, Galgóczy és mtsai. 2010,2019). Pontos gombaellenes hatásmechanizmusuk molekuláris szinten nem intenzíven tanulmányozott, az eddig ismerteket a **8. Táblázat** foglalja össze.

A **8. Táblázat**ból és egy további tanulmányból is kitűnik (Huber és mtsai. 2020), hogy elsősorban nem közvetlenül a membránroncsolás (és ezen keresztül nekrozis) az Eurotiomycetes-eredetű AFP-k elsődleges hatásmódja, hanem valamilyen sejten belüli célponthoz kötődve fejtik ki a hatásukat az idegen gombasejten. Ui. mindegyikük esetében megfigyelhető az, hogy a sejt külső rétegeihez kötődnek és ott, vagy onnan vaku-

7. Táblázat. Az utóbbi 10 évben intenzíven tanulmányozott Eurotiomycetes-eredetű antifungális proteinek elsődleges szerkezet és fizikokémiai tulajdonságaik.

Protein	Termelő gomba	Aminosavak száma	Molekulatömeg (Da)**	Ciszteinek száma**	K/R/H arány**	Becsült pI**	Töltés (pH 7)**	GRAVY*	UniProt azonosító	Referencia
PAF-csoport										
AKYTGKCTKSKNECKYKNDAGKDTFIKCPKFDNKKCTKDNNKCTVDTYNNAVDCD										
PAF	<i>Penicillium chrysogenum</i> Q170	55	6250,05	6	13/0/0	8,93	+4,7	-1,375	Q01701	Marx és mtsai. (1995)
LSKFGGECSLKHNTCTYLKGGKNHVVNCGSAANKKCKSDRRHCEYDEHHKRVDCQTPV										
PAFB	<i>P. chrysogenum</i> Q170	58	6500,32	6	8/2/6	8,83	+5,2	-1,031	D0EXD3	Huber és mtsai. (2018)
LSKYGGQCSLKHNTCTYLKGGNRVIVNCGSAANKRCKSDRRHCEYDEHHRRVDCQTPV										
AfpB	<i>Penicillium digitatum</i> CECT 20796	58	6575,39	6	5/5/5	9,06	+5,9	-1,000	K9FGI7	Garrigues és mtsai. (2017)
VLYTGQCFFKKNICKYKVNGKQNIACPSAANKRCEKDKNKCTFDSYDRKVTCDFRK										
PeAfpA	<i>Penicillium expansum</i> CECT 20906	57	6644,70	6	12/3/0	9,48	+8,7	-1,081	A0A0A2K8K6	Garrigues és mtsai. (2018)
LSKYGGECSEKHNCTYRKDGKDHIVKPSADNKKCKTDRHHCEYDDHHKTVDCQTPV										
PeAfpB	<i>P. expansum</i> CECT 20906	58	6691,41	6	9/2/6	7,80	+2+	-1,471	A0A0A2K0J0	Garrigues és mtsai. (2018)
AFPg-csoport										
ATYNGKCYKKDNICKYKAQSGKTAICKCYVKKCPRDGAKCEFDSEYKGCYC										
AFP	<i>Aspergillus giganteus</i> MDH 18894	51	5805,81	8	12/1/0	9,27	+8,7	-0,914	P17737	Wnendt és mtsai. (1994)
BP-csoport										
DTCGGGYGVDQRRNTNSPCQASNGDRHFCGCDRTGIVECKGGKWTEIQDCGGASCRGVSQGGARC										
PAFC	<i>P. chrysogenum</i> Q170	64	6630,24	8	2/6/1	7,71	+0,9	-0,767	B6HMF2	Holzkecht és mtsai. (2020)
DTCGAGYDPAQRRNTNSPCQASNGDRHFCGCDRTGIVECKGGKWTEIQDCGRNSCHGGTEGGAKC										
PeAfpC	<i>P. expansum</i> CECT 20906	64	6724,31	8	3/5/2	6,87	+0,2	-0,977	A0A0A2JEC9	Garrigues és mtsai. (2018)

GRAVY: átlagos hidrofóbicitás érték (*grand average of hydropathy value*); UniProt: *Universal Protein Resource* adatbázis. *: *ExPASy ProtParam Tool*-al számolva (Gasteiger és mtsai. 2005).

***: Protein Calculator v3.4 server*-rel számolva (The Scripps Research Institute; <http://protecalc.sourceforge.net/>). Törzsgyűjtemények: CECT: *Spanish Type Culture Collection*, Valencia, Spanyolország; MDH: *Michigan Department of Health*, Michigan, USA.

8. Táblázat. Az Eurotiomycetes-eredetű antifungális fehérjék eddig feltárt hatásmechanizmusa.

Protein	Hatásmechanizmus	Referencia
PAF-csoport		
PAF	<i>Aspergillus nidulans</i> , <i>Neurospora crassa</i> : Plazmamembrán hiperpolarizáció, K ⁺ kiáramlás és Ca ²⁺ beáramlás, az intracelluláris Ca ²⁺ -homeosztázis megzavarása, cAMP/PKA szignalizáción keresztül intracelluláris ROS képződés és apoptózis indukció.	Kaiserer és mtsai. (2003) Leiter és mtsai. (2005) Binder és mtsai. (2010)
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> : MAPK szignalizáció és sejtfalintegritás útvonal megzavarása.	Giner-Llorca és mtsai. (2023a)
AFP-csoport		
AFPg AFPg_{NN5353}	<i>A. nidulans</i> , <i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> : Plazmamembrán permeabilizáció és a sejtfal kiépülés akadályozása a kitin-szintáz gátlásán keresztül. Ca ²⁺ -beáramlás indukciója, az intracelluláris Ca ²⁺ -homeosztázis megzavarása, MAPK szignalizáció és sejtfal integritás útvonal megzavarása. Specifikus kötődés DNS-hez és DNS roncsolódás vagy a transzkripció gátlás.	Meyer (2008) Binder és mtsai. (2011)

cAMP: ciklikus adenosin-monofoszfát, MAPK: mitogén-aktivált protein-kináz, PKA: protein-kináz A, ROS: reaktív oxigén származékok (*reactive oxygen species*).

-oláris transzportmechanizmussal a sejt beleséjébe jutva valamilyen molekuláris célpontra keresztül fejtik ki hatásukat (Theis és mtsai 2003,2005, Bugada és mtsai. 2020, Holzkecht és mtsai. 2020, Huber és mtsai. 2020, Giner-Llorca és mtsai. 2023a). Ezeknek a molekuláris célpontoknak a közvetlen azonosítása (pl. fehérje-fehérje kölcsönhatási vizsgálatokkal) a mai napig nem történt meg. Jelenlétükre közvetett módon következtettek a feltételezett jelátviteli út gátlásán, jelátviteli vagy bioszintézis út mutáns gombatorzsek, továbbá transzkriptomikai adatsorok vizsgálatán keresztül (**8. Táblázat**).

Néhány eddigi vizsgálat azt sugallja, hogy az Eurotiomycetes-eredetű AFP-k elsődleges biológiai szerepe nem a másik kompetitor gomba elpusztítása, hanem a termelő gomba életciklusának a szabályozása. A PAF-nak szerepe van a konídiogenezis beindításában és ezzel párhuzamosan az apoptózis és az autofágia indukciójában bizonyos *P. chrysogenum* biomassza tömeg elérése után, éhezési körülmények között (Hegedüs és mtsai. 2011). Ezt jól alátámasztja az a tény, hogy a PAF csak öregedő *P. chrysogenum* tenyészetben tápanyagfogyás (késő logaritmusos vagy stacionárius fázis) esetében termelődik, továbbá az, hogy a fehérjét kódoló gén promóter régiójában elsősorban éhezésre és stressz körülményekre termelődő transzkripciós faktorok kötőhelyei találhatóak (Marx 2004, Kovács és mtsai. 2014). Transzkriptomikai adatok és a PAF-éhoz hasonló megfigyelések alapján az AnAFP és az AFPg sporulációban, tápanyag újrahasznosításban és az autofágia indukciójában betöltött szerepét feltételezik az *A. niger*-ben, illetve az *A. giganteus*-ban éhezési körülmények között (Page és mtsai. 2016, Meyer és Jung 2018). A *P. digitatum* által termelt AfpB szabályozott sejthalált indukál a termelő szervezetben és úgy tűnik a populáció denzitásának a szabályozásában

van szerepe egy mitogén-aktivált protein-kináz útvonalakon keresztül (Gandía és mtsai. 2019, Bugada és mtsai. 2020). Transzkriptomikai adatok elemzése alapján ez a folyamat valószínűsíthetően a sejt homeosztázisának a felborulásán és apoptózis indukción keresztül játszódik le. Mindemellett az AfpB gátolja az acetoin bioszintézis utat és a gomba toxintermelését (Ropero-Pérez és mtsai. 2023). Ezzel szemben szintén transzkriptomikai adatok alapján feltételezik, hogy a *P. expansum* által szekretált PeAfpA nem okoz sejthalált a natív termelő szervezetben és nem befolyásolja a konídiogenezist, viszont a gomba növekedése során szerepet játszhat a sejtfal kiépülés szabályozásában, a szénhidrátok mobilizációjának az elősegítésében, továbbá a plazmamembrán transzporterek működésének a szabályozásában (Ropero-Pérez és mtsai. 2024).

4.4.3. Gyakorlati alkalmazhatóság

Néhány korábbi tanulmány már felvetette az Eurotiomycetes-eredetű AFP-k gyakorlati alkalmazhatóságát mind a humánpatogén gombák okozta fertőzések kezelésében, mind a növénypatogén gombák okozta kártételek csökkentésében.

Gyógyászat

Annak ellenére, hogy az Eurotiomycetes-eredetű AFP-k számos humánpatogén gomba növekedését gátolják, kevés közvetlen orvosi alkalmazási lehetőségre találunk példát a szakirodalomban. Ennek elsődleges oka az lehet, hogy viszonylag nagy affinitással kötődnek a humán szérumalbuminhoz, ami az invazív gombafertőzések kezelésében történő alkalmazásukat akadályozhatja. Emiatt elősorban elszarusodó bőr vagy nyálkahártya felületen történő alkalmazhatóságuk merült fel (Galgóczy és mtsai. 2019).

A *P. chrysogenum* által termelt PAF biztonságos gyógyászati alkalmazhatóságát *in vitro* sejt kultúrákon végzett toxicitás tesztek mellett (Szappanos és mtsai. 2005, 2006), egy Palicz és mtsai. (2016) által egereken elvégzett *in vivo* tanulmány is bizonyította. Ennek során az intranazálisan alkalmazott PAF nem bizonyult toxikusnak az egerekre nézve, nem váltott ki patológiás és gyulladásos folyamatokat, továbbá a PAF-fal kezelt tüdőszövetek extraktuma gombaellenes hatással rendelkezett *Aspergillus nidulans*-szal szemben *in vitro*. Annak ellenére, hogy az intranazálisan alkalmazott PAF önmagában nem volt képes visszaszorítani az *A. fumigatus* által okozott invazív pulmonáris aspergillózist egérmodellben, a túlélési időt meghosszabbította. Intraperitoneális alkalmazás esetén ez mindössze egy nap volt. Ennek ellenére a PAF amfotericin B-vel

(amellyel szinergisztikus kölcsönhatásba lép *in vitro*) történő kombinált intraperitoneális alkalmazása ennél hatékonyabbnak bizonyult, ui. szignifikánsan növelte az állatok túlélési idejét a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva (Palicz és mtsai. 2016).

Szintén a *P. chrysogenum*-ból származó PAFB, PAFC, és a PAF-nak egy élesztőgombaellenes hatás szempontjából tudatosan tervezett változata (PAF^{opt}) hatékonynak bizonyult *C. albicans* ellen háromdimenziós bőrmódelben *in vitro*. Mind a három protein nem volt toxikus, jó penetrációs tulajdonságokkal rendelkezett, nem sértette az epidermális permeabilitás gát működését, nem változtatta meg bizonyos citokinek (interleukin, IL-6 és IL-8) szekrécióját (kivéve a PAFB, ami az IL-8-ét csökkentette) és nem utolsó sorban szignifikánsan visszaszorította a *C. albicans* sejtszámot a fertőzött szövetmódelben (Holzknecht és mtsai. 2022).

Gombakórokozók elleni növény- és terményvédelem

Az Eurotiomycetes-eredetű AFP-k számos, szántóföldi vagy raktári kártevőként számon tartott gomba növekedését képesek *in vitro* körülmények között gátolni, ami felveti növény- és terményvédelemben történő közvetlen alkalmazhatóságukat (Galgóczy és mtsai. 2013a, Leiter és mtsai 2017). Ennek az alkalmazásnak szintén két lehetősége lehet, ami már a 4.3.2 fejezetben tárgyalásra került, vagyis AFP-t termelő transzgenikus növények létrehozása, vagy felületi permetszerként történő alkalmazás.

Eurotiomycetes-eredetű AFP-t termelő transzgenikus növénykerek jó példa az *A. giganteus* által termelt AFPg-t szekretáló rizs (Coca és mtsai. 2004, Moreno és mtsai. 2005), búza (Oldach és mtsai. 2001) és indiai köles (Girgi és mtsai. 2006), amik megnövelt ellenállóképességgel rendelkeztek *Magnaporthe grisea*, illetve *Erysiphe graminis*, *P. recondita*, illetve *Puccinia substriata* és *Sclerospora graminicola*-val szemben.

Szántóföldi és raktári körülmények között felületi permetszerként történő alkalmazhatóságukat egyaránt bizonyították laboratóriumi kísérletek során. Az AFPg vizes oldata megvédte a muskátli leveleket *B. cinerea* és *M. grisea* fertőzéssel szemben még kettő, illetve hat héttel az alkalmazás után is (Vila és mtsai. 2001, Moreno és mtsai. 2006). Ugyanez a fehérje megakadályozta a paradicsomnövény gyökerének *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* fertőzését (Theis és mtsai. 2005). A PAF csökkentette a *B. graminis* f. sp. *hordei* és a *P. recondita* f.sp. *tritici* által okozott tüneteket árpa és búzanövényeken (Barna és mtsai. 2008). Raktári körülmények között az AFPg visszaszorította különböző *Fusarium* fajok növekedését az árpaszemeken és ezzel együtt

csökkentette azok mikotoxin szennyeződést (Barakat és mtsai. 2010). Ugyanez a fehérje megvédte a paradicsom, mangó (Barakat és mtsai 2012), továbbá a banán termést *A. alternata* által okozott kártétellel szemben (Barakat és mtsai. 2014). A PAFB hatékonyan visszaszorította a *P. digitatum* és a *P. chrysogenum* által okozott kártételt narancson, továbbá a *P. expansum* által okozottat almán (Gandía és mtsai. 2021).

5. Célkitűzések

Napjainkra aggasztó méreteket öltött az antifungális szerekkel és fungicidekkel szemben rezisztenciát mutató gombák által okozott fertőzések és kártételek esetszáma a klinikumban és az agráriumban. Az Irodalmi áttekintés c. fejezetet olvasva tisztán látszik az, hogy a jelenleg alkalmazásban lévő gyógyszereken és növényvédőszeren alapuló kezelési és megelőzési módszerek folyamatosan veszítenek a hatékonyságukból és/vagy már nem felelnek meg a jelen kor kihívásaink. Ezért olyan, ezektől alapvetően eltérő molekulákra alapozott új antifungális stratégiák kidolgozása szükséges, amelyek hatékonyan és biztonságosan alkalmazhatóak, továbbá minimális eséllyel alakul ki rezisztencia velük szemben. Egy ilyen új stratégia alapját jelenthetik a természetben előforduló, gombaellenes hatással rendelkező Eurotiomycetes-eredetű antifungális proteinek (AFP-k) gyógyszerként vagy fungicidként történő alkalmazása. Kutatómunkánk során ennek a lehetőségét vizsgáltuk meg a *Neosartorya (Aspergillus) fischeri* NRRL 181 által szekretált két AFP-nek a *N. fischeri* antifungális proteinnek (NFAP) és a *N. fischeri* antifungális protein 2-nek (NFAP2) a 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.

Az első célkitűzés teljesítésével olyan mennyiségben állt rendelkezésre NFAP és NFAP2, amely már elegendőnek bizonyult a másodikban megfogalmazott antifungális spektrumok széleskörű feltérképezéséhez, az eltérő sejttypusokkal (planktonikus és szesszilis biofilm sejtek) szemben és különböző környezeti körülmények között mutatott hatékonyságok, továbbá a hatásmódok felderítéséhez. Az alkalmazott és kidolgozott GRAS státuszú *Pichia pastoris*- (újabb nevén *Komagataella phaffii*), illetve *Penicillium chrysogenum*-alapú expressziós rendszerek alkalmasak ipari körülmények között történő NFAP és NFAP2 előállításra is. A hatásmód megismerése elengedhetetlen volt a negyedik célkitűzés teljesítéséhez, vagyis olyan, a gombaellenes aktivitásért felelős fehérjeszerkezeti elemek feltárásához, amik alapján modulálni lehet a hatékonyságot és a spektrumot, továbbá (gyakorlati alkalmazás szempontjából előnyösebb, kisebb molekulatömegű) antifungálisan aktív peptid-származékok (fehérje fragmentumok) tervezhetők. Ez először megkívánta az NFAP és NFAP2 másod- és harmadlagos szerkezetének a meghatározását (elektronikus cirkuláris dikroizmus és magmágneses rezonancia spektroszkópiákkal), továbbá szerkezeti mutáns fehérjeváltozatok tanulmányozásán keresztül annak a megismerését, hogy az egyes szerkezeti elemek hogyan befolyásolják a hatékonyságot és a stabilitást. Ezek alapján megállapíthatók voltak a fehérje „szabadon” szerkeszthető elemei, amelyek elsősorban a rendezetlen hurokrégiókra korlátozódtak, mint pl. az antimikrobiális hatású peptidekben megtalálható, gyakran az antifungális hatásért felelős, ún. γ -core régió. A γ -core régiót lefedő szintetikus peptid-származékok megfelelő módosításaival, antifungálisan hatékony, stabil szerkezetű peptidek voltak tervezhetők az ötödik célkitűzés során. Az NFAP, NFAP2 és γ -core peptid-származékok biztonságos gyakorlati alkalmazhatóságának a bizonyítása toxicitás vizsgálatokat követelt meg. Ezért a hatodik célkitűzésben vizsgáltuk a lehetséges károsító hatásukat, fejlődő növényen (*Medicago truncatula*), fejlett intakt növényen és levágott levelén (*Solanum lycopersicum*), vörösvértesteken, különböző humán sejt vonalakon (keratinociták, dermális fibroblaszt sejtek, bélhám sejtek, monociták), háromdimenziós bőrmodellel és nagy viaszmolylel (*Galleria mellonella*) lárván. Gombára nézve specifikus alkalmazhatóságuk bizonyítása után a hetedik célkitűzésben egy paradicsomnövény/termés - fitopatogén gomba (*Botrytis cinerea* és *Cladosporium herbarum*) modellrendszerben feltártuk az NFAP és

γ -core peptid-származékai lehetséges alkalmazását a növény- és terményvédelemben. Míg a nyolcadikban egy háromdimenziós bőrmódel - *Candida albicans* fertőzési kísérletben és egy egér vulvovaginális candidiázis (*C. albicans*) módelben az NFAP2 lehetséges alkalmazását felületi a felületi gombás fertőzések kezelésében.

Célkitűzéseink teljesítése jelentős mértékben hozzájárult nemcsak a *N. fischeri* által termelt két antifungális protein (NFAP és NFAP2) és az ezeken alapuló peptid-származékok, hanem egyéb, hozzájuk hasonló Eurotiomycetes-eredetű AFP-knek a gombák okozta fertőzések és kártételek visszaszorításában történő gyakorlati alkalmazhatóságához.

6. Anyagok és módszerek

A dolgozatban bemutatott eredmények alapjául szolgáló kísérletek során használt mikroorganizmusok, anyagok és eszközök, továbbá az alkalmazott számos módszer részletekbe menő leírása a doktori értekezéshez kapcsolódó közleményekben található meg. Jelen fejezet csupán arra vállalkozik, hogy ezekről egy általános és átfogó képet nyújtson az olvasó számára és csak a dolgozat megértése szempontjából lényeges dolgok kerüljenek megemlítésre.

6.1. *Neosartorya fischeri* antifungális proteinek termelése és izolálása

A natív termelő, vagyis a *Neosartorya (Aspergillus) fischeri* NRRL 181 izolátum által szekretált NFAP egy általunk kidolgozott és antifungális proteint indukáló tápközegnek elnevezett (Kovács és mtsai. 2011), míg az NFAP2 egy *Penicillium chrysogenum* minimál tápoldat felülúszójából volt izolálható a tenyésztési körülmények optimalizációját követően (Tóth és mtsai. 2016).

A rekombináns NFAP nagy mennyiségű extracelluláris termelése egy gyógyszer- és élelmiszeripari szempontból alapvetően biztonságosnak ítélt (GRAS, *generally recognized as safe*) *Pichia pastoris* (újabb nevén *Komagataella phaffii*) KM71H- (Virágh és mtsai. 2014, Galgóczy és mtsai. 2017), továbbá egy szintén GRAS *P. chrysogenum* Q176-alapú expressziós rendszerben egyaránt megvalósult (Sonderegger és mtsai. 2016), míg az NFAP2 termelése csak a *P. chrysogenum* Q176-alapúban (Tóth és mtsai. 2018). A rekombináns NFAP *P. pastoris*-ban történő termeléséhez a genomba integrálódó pPICZαA expressziós vektort (Virágh és mtsai. 2014, Galgóczy és mtsai. 2017), míg az NFAP és NFAP2 *P. chrysogenum*-ban történő termeléséhez egy általunk szerkesztett, szintén a genomba integrálódó pSK275 expressziós vektort alkalmaztunk (Tóth és mtsai. 2018). Az NFAP antifungális hatásmechanizmusának tanulmányozása céljából termelése az *Aspergillus nidulans* CS2902 törzsben is megvalósult egy általunk szerkesztett pAMA-alapú, a genomba nem integrálódó expressziós vektor alkalmazásával (Galgóczy és mtsai. 2013b).

A natív és rekombináns NFAP és NFAP2 izolálása méretkizárásos vagy kationcserés oszlopkromatográfiás módszerrel történt a tenyészetek felülúszójából annak ammónium-szulfáttal történő frakcionált kisézését és desztillált vízzel szemben történő

dializálását, vagy ultraszűrését (30 kDa pórusátmérő) követően gravitációs technika vagy gyors protein kromatográfiás készülék alkalmazásával, amit a fehérjét tartalmazó frakciók dialízise, majd liofilizálása követett (Kovács és mtsai. 2011, Virágh és mtsai. 2014, Tóth és mtsai. 2018). Egyes esetekben ezek után még egy utólagos fordított fázisú nagy teljesítményű folyadékkromatográfiás (RP-HPLC, *reversed-phase high-performance liquid chromatography*) tisztítást is alkalmaztunk (Kovács és mtsai. 2019).

A termelt NFAP és NFAP2 azonosítása N-terminális szekvenálással vagy tömegspektrometriás analízissel történt (Kovács és mtsai. 2011, Tóth és mtsai. 2016). A fehérjén belüli diszulfid-hidak kialakulásáról a pontos tömegmérés adott információt.

6.2. *Neosartorya fischeri* antifungális proteinek spektruma és hatásmódja

Az NFAP és NFAP2 alacsony ionerősségű (sókoncentrációjú) (LCM, *low cationic medium*) vagy 10-szeresére hígított burgonyakivonat-glükóz (0,1×PDB, *potato-dextrose broth*) tápközegben mutatott gombaellenes hatékonyságának a felderítéséhez és spektrumának a megállapításához a vizsgálat szempontjából optimalizált *in vitro* agardiffúziós vagy mikrodilúciós érzékenységi tesztek alkalmaztunk. Az NFAP és NFAP2 humánpatogén gombákkal szembeni hatékonyságát klinikai standardizált érzékenységi tesztekkel (CLSI [*Clinical and Laboratory Standards Institute*] M27-A3 módszer az élesztőgombákra (Clinical and Laboratory Standards Institute 2008a), vagy M38-A2 módszer a fonalgombákra) *Roswell Park Memorial Institute*-1640 tápközegben is vizsgáltuk (Clinical and Laboratory Standards Institute 2008b). Az NFAP és NFAP2 növénypatogén gombákkal szembeni hatékonyságát és spektrumát 0,1×PDB-ben határoztuk meg mikrodilúciós érzékenységi tesztekben (Tóth és mtsai. 2020a). Minimális gátló koncentráció (MIC, *minimum inhibitory concentration*) értéknek azokat az antifungális fehérje és szer koncentrációkat tekintettük, amelyek 5 vagy 10%-ra csökkentették a gombák növekedését a kezletlen kontrollhoz viszonyítva (100%-os növekedés) fényelnyelés mérések (OD₆₂₀) alapján.

Az NFAP2 biofilmekkel szembeni hatékonyságát *Candida albicans*-szal és eltérő kládokba tartozó *Candida auris* izolátumokkal szemben vizsgáltuk [2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-szulfopenil)-2H-tetrazólium-5-karboxanilid] redukcióján alapuló metabolikus aktivitás (életképesség) méréssel. Ebben az esetben MIC értéknek általában a $\geq 50\%$

metabolikus aktivitás gátlást tekintettük a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva (100%-os metabolikus aktivitás) OD₄₉₂ mérések alapján (Kovács és mtsai. 2021).

Az NFAP2 antifungális szerekkel és NFAP-val történő kombinált alkalmazása esetén a két szer között föllépő kölcsönhatás típusát (szinergista, additív, indifferens) *Checkerboard*-titrálás módszerrel és frakcionális gátló koncentráció index (FICI, (*fractional inhibitory concentration index*) számolásával állapítottuk meg és jellemeztük (Pillai és mtsai. 2005).

Az egy- vagy kétértékű kationokra disszociáló sók, a pH változás, az eltérő hőmérsékleteken történő kezelés és a proteolitikus enzimek hatását az NFAP (és részben az NFAP2) gombaellenes hatékonyságára, eltérő sók eltérő koncentrációival kiegészített és eltérő kémhatásra pufferelt tápközegekben, illetve eltérő hőmérsékleten vagy protein K eltérő koncentrációival kezelt fehérjeoldat növekedésgátló képességének a vizsgálatával jellemeztük *Aspergillus niger* SZMC 601 (Kovács és mtsai. 2011), rekombináns NFAP-t termelő *A. nidulans* és *A. nidulans* FGSC A4 (NFAP) (Galgóczy és mtsai. 2013b,2017), vagy *Saccharomyces cerevisiae* SZMC 0644 (NFAP2) gombatörzseken agardiffúziós vagy mikrodilúciós érzékenységi tesztekben (Tóth és mtsai. 2016).

Az NFAP hatásmódját ez előbb említett három *Aspergillus* törzsen, további vad típusú *A. nidulans* törzseken, ezek jelátviteli út mutáns törzsein és egy zöld fluoreszcens fehérjével jelölt aktint termelő törzsen tanulmányoztuk (Virágh és mtsai. 2015). Az NFAP2 hatásmechanizmusát *C. albicans* ATCC 10231, CBS 5982 és 27700 törzseken vizsgáltuk (Tóth és mtsai. 2016,2018, Kovács és mtsai. 2019). A hatásmódok felderítéséhez mikrodilúciós érzékenységi tesztek, fénymikroszkópia, fluoreszcens mikroszkópia, konfokális mikroszkópia és pásztázó elektronmikroszkópia (SEM, *scanning electron microscopy*) technikákat használtunk. A fluoreszcens mikroszkópiát *Annexin V-FITC - Apoptosis Detection Kit* (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA), calcofluor fehér, FUN-1 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), diklorodihidrofluoreszcein-diacetát, propídium-jodid (PI, *propidium iodide*), továbbá indirekt immunfluoreszcens festési technikákkal kombináltuk. Ezek a módszerek rendre az apoptotikus : nekrotikus sejtek arányának, a kitin elrendeződés, a sejtek életképességének, a reaktív oxigén származékok jelenlétének, és a membránkárosodás vizsgálatára szolgáltak. A hatásmódok felderítéséhez áramlási citometriával elvégzett fluoreszcencia-aktivált sejtválogatás analízist (FACS, *fluorescence activated cell sorting*) is alkalmaztunk.

6.3. *Neosartorya fischeri* antifungális proteinek szerkezete és funkcionális szerkezeti elemei

Az NFAP és NFAP2 oldatbeli szerkezetét magmágneses rezonanciaspektroszkópiával vizsgáltuk (Hajdu és mtsai. 2019, Váradi és mtsai. 2023a). Ehhez ^{15}N és/vagy $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -jelölt fehérjéket termeltünk a 6.1. fejezetben említett *P. chrysogenum*-alapú expressziós rendszerben. A diszulfid-híd mintázatokat proteolitikus emésztéssel kapcsolt tömegspektroszkópiával állapítottuk meg az NFAP esetében (Hajdu és mtsai. 2019). Mivel ez a módszer az NFAP2 esetében nem volt kivitelezhető, ezért szilárd fázisú peptidszintézissel előállított NFAP2 fragmentumok natív kémiai ligációval történő összeépítésével és cisztein védőcsoportok alkalmazásával eltérő diszulfid-híd mintázatú NFAP2 változatokat állítottunk elő. Ezek szerkezeti integritását és másodlagos szerkezeti elemeit hasonlítottuk össze a rekombináns natív NFAP2 által mutatottakkal. A szerkezeti integritás vizsgálatára RP-HPLC-t alkalmaztunk (Váradi és mtsai. 2023a). A fehérjék rendezett másodlagos szerkezetét, másodlagos szerkezeti elemeit, és a diszulfid-hidak jelenlétét elektronikus cirkuláris dikroizmus (ECD) spektroszkópiával vizsgáltuk (Tóth és mtsai. 2016, Galgóczy és mtsai. 2017).

Az NFAP szerkezet-hatás összefüggésében fontos fehérjeszerkezeti elemek vizsgálatához cisztein-serin cserélt, központi hidrofób mag deléciós és az első öt N-terminális aminosavban mutáns változatokat állítottunk elő a 6.1. fejezetben említett *P. pastoris*-alapú expressziós rendszerrel (Galgóczy és mtsai. 2017). Az előállított mutáns változatok antifungális hatékonyságát, környezeti hatásokkal (hőmérséklet, pH, só) szembeni stabilitását, hatásmódját *A. nidulans* FGSC A4 törzzsel szemben vizsgáltuk a 6.1. és 6.2. fejezetekben ismertetett kezelési és mikrodilúciós érzékenységi teszt módszerekkel (Galgóczy és mtsai. 2017). Az NFAP2 gombaellenes hatásáért felelős szerkezeti elemeinek a felderítésére az ún. funkcionális térképezés módszert alkalmaztuk, amely során a fehérjét összességében teljesen lefedő peptid-fragmentumokat szintetizáltunk szilárd fázisú peptidszintézissel és vizsgáltuk ezek gombaellenes hatékonyságát mikrodilúciós érzékenységi tesztekben, továbbá sejtmembránroncsoló aktivitásukat PI-festéssel kapcsolt fluoreszcens mikroszkópiával a 6.1. és 6.2. fejezetek módszereivel (Tóth és mtsai. 2018). A γ -core régió gombaellenes hatás kiváltásában betöltött szerepének a vizsgálatára az NFAP2 γ -core mutáns változatát szintetizáltuk meg az előző bekezdésben említett fehérjeszintézis módszerrel. A γ -core mutáns változat antifungális hatékonyságát mikrodilúciós érzékenységi tesztben és PI-festéssel kapcsolt

áramlási citometriával elvégzett FACS analízissel vizsgáltuk a 6.2. fejezetben leírt módszerekkel (Váradí és mtsai. 2023a).

6.4. *Neosartorya fischeri* antifungális proteinek peptid-származékai

A *N. fischeri* antifungális proteinek γ -core régiói alapján tervezett peptid-származékokat és azok módosított változatait szilárd fázisú peptidszintézissel (6.3. fejezetben alkalmazott módszerek) állítottuk elő esetenként *S-terc*-butil védőcsoporttal a ciszteineken (Tóth és mtsai. 2020a, Váradí és mtsai. 2024). A szintetikus peptidek antifungális aktivitását, spektrumát és idő-ölés görbét a 6.2. fejezetben leírt mikrodilúciós érzékenységi tesztekben vizsgáltuk 0,1×PDB vagy LCM tápközegekben (Tóth és mtsai. 2020a, Váradí és mtsai. 2024). A peptid-származékok szerkezeti integritását RP-HPLC-vel és ECD spektroszkópiával tanulmányoztuk (Váradí és mtsai. 2024). A hatásmódjuk felderítéséhez fénymikroszkópiát használtunk (Tóth és mtsai. 2020a).

6.5. Toxicitásvizsgálatok növényeken és emlős sejteken, szövetmodellen, állatokon

Az NFAP és γ -core régiói alapján tervezett peptid-származékok fejlődő növényre gyakorolt lehetséges károsító hatását *Medicago truncatula* A-17 három napos csíranövényeken vizsgáltuk; a főgyökér csúcsát kezeltük a fehérje/peptid vizes oldatával (Tóth és mtsai. 2020a). Az NFAP, NFAP2 és γ -core régiói alapján tervezett peptid-származékaik növényi szövetkárosító hatását intakt paradicsomnövény levelének abaxiális epidermiszén teszteltük a fehérje/peptid vizes oldatának főerek közé cseppentésével (Tóth és mtsai. 2020a, 2022).

Emlős sejtvonalakra gyakorolt toxikus hatásukat humán keratinociták (HaCaT), bélhámsejtek (HT-29) és monociták (THP-1) a fehérje/peptid jelenlétében mutatott metabolikus aktivitásának a nyomon követésével (*CCK8 Cell Proliferation and Cytotoxicity Assay Kit*, Dojindo Molecular Technologies Inc., Rockville, MD, USA) vizsgáltuk (Tóth és mtsai. 2020a). Állati szervezetet károsító hatásukat *Galleria mellonella* toxicitás modellben teszteltük (Váradí és mtsai. 2024). Hemolízist okozó

képességüket szűrőpapír-alapú korong tesztel Columbia juhvéres agarlemezen tanulmányoztuk (Tóth és mtsai. 2020a, Váradi és mtsai. 2024).

Az NFAP2 humán bőrszöveti sejtekkel szemben mutatott toxicitását keratinocita és dermális fibroblaszt sejtvonalokon vizsgáltuk kombinált Hoechst-PI festési eljárással, fluoreszcens mikroszkópiával (Kovács és mtsai. 2019). A fehérje vizes oldatának bőrkárosító hatását egy háromdimenziós bőrmódel rendszerben (Phenion; Henkel AG, Düsseldorf, Németország) eltérő hisztológiai festési eljárásokkal: Az epidermális permeabilitás gát működésérevaló hatását lucifer sárga CH (LS) - 4',6-diamidin-2-fenilindol (DAPI) kombinált festéssel és fluoreszcencia intenzitás meghatározással; a szöveti morfológiát károsító képességét pedig hematoxin-eozin (H-E)-festéssel vizsgáltuk. A bőrmódelre gyakorolt lehetséges apoptotikus hatást „*terminal deoxynucleotidyl transferase biotin-dUTP nick end labeling*” festéssel mutattuk ki. A háromdimenziós bőrmódel interleukin-6 és -8 termelőképességét egy ELISA módszerrel határoztuk meg és kvantifikáltuk (Holzknecht és mtsai. 2022).

6.6. Az NFAP és γ -core peptid-származékok növény- és termésyvédelmi alkalmazhatósága

Az NFAP és γ -core peptid-származékok 0,1×PDB-ben elkészített oldatának és ezek FICI alapján (*Checkerboard*-titrálás, 6.2. fejezet) meghatározott szinergista kombinációjának felületi, kontakt-szerként történő növényyvédelmi alkalmazhatóságát paradicsomnövény - *Botrytis cinerea* fertőzési módelben a növény levágott levelének abaxiális epidermiszén vizsgáltuk a protein/peptid oldatban (0,1×PDB) elkészített konídium szuszpenzió főerek közé cseppentésével. A gomba levélszövet károsító hatását Evan's kék festéssel tettük láthatóvá, a levélen mutatott kolonizáló képességét pedig SEM-mel (Tóth és mtsai. 2022). Az NFAP és γ -core peptid-származékok termésyvédelmi alkalmazhatóságát *Botrytis cinerea* és *Cladosporium herbarum* ellen teszteltük paradicsomtermés szűrt pontjainak a protein/peptid oldatban (0,1×PDB) elkészített konídium szuszpenziókkal történő fertőzéssel (Tóth és mtsai. 2020a, 2022).

6.7. Az NFAP2 alkalmazhatósága felületi humán gombás fertőzések kezelésében

Az NFAP2 vizes oldatának topikális szerként történő alkalmazhatóságát felületi, kután gombás fertőzések kezelésére a toxicitásvizsgálatok során említett háromdimenziós bőrmoddellen (6.5. fejezet) vizsgáltuk *C. albicans* CBS 5982 izolátummal szemben. Perjódsvav-Schiff-festést használtunk a gomba szöveti modellben történő láthatóvá tételére, míg az epidermális permeabilitás gát vizsgálatára a 6.5. fejezetben említett LS - DAPI festést és fluoreszcencia intenzitás meghatározást (Holzknecht és mtsai. 2022).

Az NFAP2 vizes oldatának felületi szerként mutatott hatékonyságát a nyálkahártya gombás fertőzésének a visszaszorításában egy egér vulvovaginális candidiázis modellben (VVC) vizsgáltuk flukonazol-rezisztens, humán VVC-ből származó *C. albicans* 27700 izolátummal szemben. A vulvális és vaginális szövetek extraktumából kinyerhető gombák kolóniaképző egység meghatározásával állapítottuk meg a *C. albicans* élősejtszámot és ez alapján következettünk az NFAP2 hatékonyságára. Grocott, Gömöri-féle ezüstmetamin- és H-E festési eljárásokkal a *C. albicans* szöveti kolonizáló képességét, illetve a gyulladás folyamatra utaló neutrofil granulociták jelenlétét vizsgáltuk (Kovács és mtsai. 2019).

6.8. Bioinformatikai módszerek

A fehérjék és peptidek aminosav-sorrendjeinek az elemzésére a *National Center for Biotechnology Information* (Sayers és mtsai. 2022), az *Universal Protein Resource* (UniProt Consortium 2023) és a *Joint Genome Institute* (Nordberg és mtsai. 2014) adatbázisokban elérhető szekvenciákat használtuk fel, az illesztésükhöz és azok grafikus megjelenítéséhez pedig a *BioEdit* (v7.0.5.2., Hall 1994) és a *JalView* (v2.11.3.3., Waterhouse és mtsai. 2009) programokat. A fehérjék és peptidek fizikokémiai tulajdonságait az az *Expert Protein Analysis System* (ExPASy) szerver *ProtParam Tool* alkalmazásával (Gasteiger és mtsai. 2005), és a *Protein Calculator* (v3.4, <https://protecalc.sourceforge.net/>) szerverrel állapítottuk meg. A fehérjék másodlagos szerkezeti elemeinek a becslésére a *PSIPRED* (v3.3) *Protein Analysis Workbench*-t alkalmaztuk (Buchan és mtsai. 2013). A fehérjeszerkezetek homológia modellezésére a *MODELLER* v9.934 programot használtuk (Sali és mtsai. 1995), a modelleket a *ModRefiner*-rel (Xu és Zhang 2011) finomítottuk és az az *UCSF Chimera* (v1.6)

szoftverrel energia minimalizáltuk (Pettersen és mtsai 2004), minőségüket pedig a *RAMPAGE* szerverrel ellenőriztük (Lovell és mtsai. 2003). A fehérjék harmadlagos szerkezetét és szerkezeti elemeit az *UCSF Chimera* (v1.6) szoftverrel elemeztük és tettük láthatóvá (Pettersen és mtsai 2004).

6.9. Statisztikai módszerek

A statisztikai analíziseket és az eredmények ábrázolását a *Microsoft Excel* (Microsoft, Edmond, WA, USA) és a *GraphPad Prism* (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) szoftverek eltérő verzióival, továbbá a *Statistics Kingdom* (<https://www.statskingdom.com/index.html>) szerverrel végeztük el. Az egyes eredmények adatainak elemzésénél alkalmazott statisztikai módszerek az „Eredmények és értékelésük” című fejezet megfelelő ábraalírásaiban kerülnek feltüntetésre.

7. Eredmények és megvitatásuk

7.1. *Neosartorya fischeri* antifungális proteinek termelése és izolálása

Munkánk kezdetéig mindössze csak négy Eurotiomycetes-eredetű antifungális protein (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.

7.1.1. Az NFAP termelése és izolálása

Genomi adatbázisok szűrésével igazoltuk, hogy a *N. fischeri* NRRL 181 izolátum képes lehet a már jól jellemzett, PAF-hoz hasonló fehérjét termelni (7. Ábra), ami a *National Center for Biotechnology Information* adatbázisában XP_001262586.1 azonosító alatt található meg (Sayers és mtsai. 2022). Ezt a fehérjét *Neosartorya fischeri* antifungális proteinnek (NFAP) neveztünk el (Kovács és mtsai. 2011). Az NFAP az *Universal Protein Resource* (UniProt) adatbázisban az A0A2I2KHN8 azonosítóval szerepel (UniProt Consortium 2023).



7. Ábra. Az *Aspergillus giganteus* antifungális protein (AFPg), a *Penicillium chrysogenum* antifungális protein (PAF), a *Neosartorya fischeri* antifungális protein (NFAP), az *Aspergillus niger* antifungális peptid (AnAFP), a *Penicillium brevicompactum* „bubble protein” (BP) és a *Neosartorya fischeri* antifungális protein 2 (NFAP2) aminosavsorrendjének illesztése *BioEdit* szoftverrel (ClustalW) (Hall 1999). A fehérjenév után annak *Universal Protein Resource* adatbázisban szereplő azonosítója és az aminosavak száma látható. A sárga nyíl a preszekvencia, míg a sárga csillag és a vonal a proszekvencia lehasadási helyét és az érett fehérje első N-terminális aminosavát jelzi. Az illesztés *Jalview*-val szoftvercsomaggal került megjelenítésre (Waterhouse és mtsai. 2009), az aminosavak héttérszíne ClustalX alapszínséma szerint.

Aminosav-szekvencia hasonlóságok alapján feltételeztük, hogy az NFAP a PAF-hoz hasonlóan szintén preproteinként expresszálódik és a gomba folyadéktenyészetének a felülúszójából kimutatható (Marx 2004). Többféle tápoldat és tenyésztési körülmény tesztelése után az NFAP-t a *N. fischeri* NRRL 181, egy speciális összetételű és általunk antifungális proteint indukáló tápközegnek elnevezett tápoldatba leoltott tenyészetének a felülúszójából sikerült méretkizárásos kromatográfia segítségével kis mennyiségben izolálnunk ($1,25 \pm 0,12$ mg/l). Ez a mennyiség azonban elegendőnek bizonyult az érett NFAP N-terminális szekvenálással történő azonosításához, továbbá a gombaellenes sajátságok előzetes jellemzéséhez (ld. 7.3.1. és 7.3.5. fejezetek) (Kovács és mtsai. 2011). Mivel ez utóbbiak alapján az NFAP ígéretes antifungális molekulának bizonyult, a további részletesebb jellemzésekhez és egyéb kísérletekhez meg kellett oldanunk nagy mennyiségű előállítását egy fehérje expressziós rendszerben.

Az NFAP nem mutatott élesztőgombaellenes hatást, ezért kidolgoztunk egy *Pichia pastoris* (újabb nevén *Komagataella phaffii*) KM71H-alapú expressziós rendszert a nagy mennyiségben történő előállítására. Ebben a rendszerben a nem kodon optimalizált, érett fehérjét kódoló *nfap* cDNS az α -faktor szignálszekvenciához fuzionáltatott volt és az expressziója egy alkohol-oxidázt kódoló gén promóterének a szabályozása alatt állt, ami lehetővé tette a fehérje expressziójának metanollal történő indukcióját. Öt napon át történő indukciót követően a tenyészet felülúszójából a natív termelőéhez képest mintegy hatszoros, $5,96 \pm 0,24$ mg/l hozammal sikerült megfelelő módon érett rekombináns NFAP-t izolálnunk kationcserés oszlopkromatográfiás módszerrel (Virágh és mtsai. 2014). A kodon optimalizációját követően ugyanezzel a tisztítási módszerrel ennek majd a kétszeresét, $11,27 \pm 4,65$ mg/l rekombináns NFAP hozamot sikerült elérnünk (Galgóczy és mtsai. 2017).

A későbbiekben a rekombináns NFAP hatásmódjának a felderítéséhez (ld. 7.4.1. fejezet) és a szerkezet-hatásmód összefüggés megállapításához (ld. 7.5.1. fejezet) szerettük volna az oldatbeli szerkezetét magmágnesen rezonancia (NMR, *nuclear magnetic resonance*) spektroszkópiával meghatározni. Az ilyen 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 *P. chrysogenum* Q176-alapú expressziós rendszert, amelyben az érett NFAP-t kódoló kodon optimalizált cDNS a PAF szignálszekvenciájával fuzionáltatott, és a *paf* gén promóterének és terminációs szignáljának a szabályozása alatt áll. A *paf* gén promótere

számos környezeti stresszhatásra és éhezésre termelődő transzkripció faktor kötőhelyét tartalmazza (Marx 2004), aminek a következtében cukormotívumot nem tartalmazó NFAP viszonylag nagy mennyiségben ($3,68 \pm 0,19$ mg/l) termeltethető és a leoltást követő 96. órában tisztítható volt kationcserés oszlopkromatográfiával a tenyésztésre alkalmazott *P. chrysogenum* minimál tápoldatból (PcMM) (Sonderegger és mtsai. 2016).

Érdemes megemlíteni, hogy a rekombináns NFAP termelésre alkalmazott *P. pastoris*- és *P. chrysogenum*-alapú expressziós rendszerek gyógyszer- és élelmiszeripari szempontból alapvetően biztonságosnak ítélték (GRAS, *generally recognized as safe*), ezért közvetlenül az iparban is felhasználhatók (Bourdichon és mtsai 2012, Ahmad és mtsai. 2014). A *P. pastoris*-szal elért rekombináns NFAP hozam összehasonlítható más, ugyanebben a rendszerben a rokon fehérjékkel elértékével, ami a PAF esetében 5-15 mg/l (Batta és mtsai. 2009), míg az AFPg esetében 2,5 mg/l volt (López-García és mtsai. 2010). Az alkalmazott *P. chrysogenum*-alapú expressziós rendszerrel a PAF hozama 80 mg/l-nek (Sonderegger és mtsai. 2016.), míg a *P. chrysogenum* antifungális protein B és C (PAFB és PAFC) hozama pedig 61 ± 11 mg/l-nek (Huber és mtsai. 2018), illetve 105 ± 15 mg/l-nek adódott (Holzknecht és mtsai. 2020). Garrigues és mtsai. (2018) ugyanezzel az expressziós rendszerrel egy közeli rokon *Penicillium* faj (*Penicillium expansum*) két AFP-jét a PeAfpB-t és a PeAfpC-t, 32 mg/l és 62 mg/l hozammal termeltették meg. Ugyanez a kutatócsoport a későbbiekben egy *Penicillium digitatum*-ból származó AFP-nek a PdAfpB-nek a rekombináns termelését is sikeresen megvalósította ebben az expressziós rendszerben (Gandía és mtsai. 2022). Ez utóbbi hatalmas kihozataloknak az egyik oka az lehet, hogy ezekben az esetekben a *P. chrysogenum*-alapú rendszerben homológ, vagy közel rokon fajból származó idegen-eredetű rekombináns fehérje került megtermelésre, amiknek szinte mindig nagyobb hozamát lehet elérni, mint egy távoli fajból származó idegen eredetűnek (Liu és mtsai. 2023).

Az NFAP hatásmódjának a tanulmányozása céljából megtermelésre került még egy *Aspergillus nidulans* CS2902 törzsben is, amiben a nem kodon optimalizált és saját szignálszekvenciával rendelkező NFAP-t kódoló cDNS a glicerinaldehid-3-foszfát-dehidrogenáz gén konstitutív promóterének és a triptofán bioszintézisében szerepet játszó fehérjét kódoló *trpC* gén terminátor régiójának a szabályozása alatt állt egy genomba nem integrálódó pAMA-alapú expressziós vektorban. Ezzel a rendszerrel $1,68 \pm 0,22$ mg/l rekombináns NFAP-t sikerült előállítani (Galgóczy és mtsai. 2013b). Mivel ez a transzformáns törzs könnyen elvesztette az NFAP-termelő képességét a nem integrálódó

vektor miatt, az NFAP termelésére a későbbiekben csak a *P. pastoris*- és a *P. chrysogenum*-alapú expressziós rendszereket használtuk.

7.1.2. Az NFAP2 termelése és izolálása

A *N. fischeri* NRRL 181 izolátum PcMM-be oltott folyadéktenyészetének a felülúszójából egy 5,6 kDa tömegű, élesztőgombákkal szemben nagymértékű antifungális hatást mutató fehérje volt izolálható kationcserés oszlopkromatográfia alkalmazásával igen alacsony, $0,37 \pm 0,02$ mg/l hozammal. Ebben az esetben az NFAP nem volt kimutatható mennyiségben jelen a fermentáléban. Az enzimatikusan emésztett protein tömegspektrometriás módszerrel végzett analízise egyezést mutatott egy, az UniProt adatbázisban megtalálható feltételezett fehérjével (azonosító: A1DBL3), ami *Neosartorya fischeri* antifungális protein 2 (NFAP2) néven, A0A1D0CRT2 azonosítóval került regisztrálásra ugyanebben az adatbázisban. Az NFAP2 nagyon kismértékű aminosav-szekvenciaegyezést mutatott az addigra már izolált és jellemzett antifungális fehérjecsoportok egy-egy tagjával (7. Ábra). Ez alapján megállapítottuk, hogy az NFAP2 az Eurotiomycetes-eredetű AFP-k egy addig le nem írt csoportját képviseli és csak az *Aspergillus fumigatus*-ban, továbbá a *Paecilomyces niveus*-ban található meg hozzá nagymértékben hasonló. Ezzel szemben számos, más tömlősgomba osztályokba tartozó nemzetségek tagjai, mint pl. az *Acremonium*, *Alternaria*, *Bysothecium*, *Claviceps*, *Coniochaeta*, *Daldinia*, *Eutypa*, *Hypoxylon*, *Karstenula*, *Massarina*, *Melanomma*, *Myriangium*, *Niesslia*, *Paraconiothyrium*, *Pseudogymnoascus*, *Pyrenophora*, *Sordaria*, *Thozetella* termelhetnek az NFAP2-höz hasonló fehérjét (Tóth és mtsai. 2016).

Mivel a natív termelővel elért alacsony hozam megnehezítette a nagymértékű élesztőgombaellenes hatással (ld. 7.3.2. és 7.3.2. fejezetek) rendelkező NFAP2 további vizsgálatát, az NFAP-hez hasonlóan ebben az esetben is szükséges volt egy NFAP2-t jól termelő expressziós rendszer létrehozására. A választásunk az NFAP esetében korábban már bevált *P. chrysogenum*-alapú expressziós rendszerre esett (Sonderegger és mtsai. 2016), amivel $15 \pm 1,2$ mg/l hozamot sikerült elérni kationcserés oszlopkromatográfiával történő tisztítási módszerrel. Ez a mennyiség mintegy negyvenszerese volt a natív termelőének (Tóth és mtsai. 2018), és mintegy ötszöröse az ugyanebben a rendszerben termeltetett NFAP-nek (Sonderegger és mtsai 2016). A későbbiekben a *P. chrysogenum* által termelt rekombináns NFAP2-t használtuk a vizsgálatokhoz.

A termelt NFAP és NFAP2 hozamokról a 9. Táblázat nyújt áttekintést.

9. Táblázat. A natív termelővel (*Neosartorya fischeri*) és a különböző gomba-alapú expressziós rendszerekkel (*Aspergillus nidulans*, *Penicillium chrysogenum* és *Pichia pastoris*) elért NFAP és NFAP2 átlagos hozamok eltérő tápközegek és protein izolálási módszerek alkalmazásával.

	Hozam (mg/ml)		Tápközeg / protein izolálás	Referencia
	NFAP	NFAP2		
<i>Neosartorya fischeri</i> NRRL 181	1,25±0,12	0,37±0,02	NFAP: AFPIM / méretkizárásos kromatográfia NFAP2: PcMM / kationcserés kromatográfia	NFAP: Kovács és mtsai. (2011) NFAP2: Tóth és mtsai. (2016)
<i>Aspergillus nidulans</i> CS2902	1,68±0,22	n.v.	CM / méretkizárásos kromatográfia	Galgóczy és mtsai. (2013b)
<i>Penicillium chrysogenum</i> Q176	3,68±0,19	15±1,2	PcMM / kationcserés kromatográfia	NFAP: Sonderegger és mtsai. (2016) NFAP2: Tóth és mtsai. (2019)
<i>Pichia pastoris</i> KM71H	5,96±0,24 11,27±4,65	n.v.	BMM / kationcserés kromatográfia	Virágh és mtsai. (2014) Galgóczy és mtsai. (2017)

AFPIM: antifungális proteint indukáló tápközeg (*anifungal protein induction medium*), BMM: pufferelt metanolos minimál tápoldat (*buffered minimal methanol medium*), CM: komplett tápközeg (*complete medium*), n.v.: nem vizsgált, PcMM: *Penicillium chrysogenum* minimál tápközeg (*P. chrysogenum minimal medium*). Törzsgyűjtemények: NRRL: Northern Regional Research Laboratory Agricultural Research Service Culture Collection, Peoria, USA

7.2. A *Neosartorya fischeri* antifungális proteinek általános jellemzése

Az NFAP és NFAP2 *in silico* előre jelzett fizikokémiai tulajdonságait a **10. Táblázat** foglalja össze. A táblázatból kitűnik, hogy mind a két fehérje kis molekulatömegű, ciszteinben gazdag, a viszonylag magas lizin/arginin/hisztidin aránynak köszönhetően pozitív töltésű és bázikus, hidrophil molekula. Ezek a tulajdonságok nem meglepők, hiszen a *Penicillium brevicompactum* „bubble protein” (BP)-csoport tagjainak kivételével általánosan jellemzőek az Eurotiomycetes-eredetű AFP-kre (Marx 2004). A BP-csoport tagjai szintén ciszteinben gazdagok és hidrophilek, de nagyobb molekulatömegűek, bázikusok és neutrálisak (Holzknecht és mtsai. 2020). Érdemes megjegyezni, hogy genom adatbázisok alapján a *N. fischeri* NRRL 181 izolátum is képes lehet egy BP-szerű protein termelésére is (UniProt azonosító: A1DKX1), de ezt mind a mai napig nem sikerült a gomba folyadéktenyésztésének a felülúszójából, vagy szilárd fázisú tenyésztésének felszíni exudátumából izolálnunk (Tóth és mtsai. 2016).

10. 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*
LEYKGEFTKDNNTCKYKIDGKTYLAKPSAANTKCEKDGKCTYDSYNRKVKCDFRH							
NFAP	57	6625,52	6	11/2/1	8,93	+5,0	-1,214
IATSPYYACNCPNNCKHKKGSGCKYHSGPSDKSKVISGKCEWQGGQLNCIAT							
NFAP2	52	5564,32	6	7/0/2	9,02	+5,2	-0,731
DTCGAGYGGDQRRNTNSPCNASNGDRHFCGCDRTGVVECRGGRWTEIQDCRASTCHGTNDGAARC							
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-lal számolva (Gasteiger és mtsai. 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.

7.3. A *Neosartorya fischeri* antifungális proteinek spektruma, kölcsönhatása antifungális szerekkel 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 flukonazzal (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.

7.3.1. A *Neosartorya fischeri* antifungális proteinek spektruma planktonikus gombasejtekkkel és spórákkal szemben

Az NFAP és az NFAP2 *in vitro* mikrodilúciós érzékenységi tesztekben meghatározott minimális gátló koncentráció értékeit (MIC) változatos gomba izolátumokkal szemben a **11. Táblázat** foglalja össze. Egy gombaellenes molekula ilyen jellegű tesztben mutatott hatékonysága nagymértékben függ (többek között) az alkalmazott tápközegtől (Buchta és Otčenášek 1996), ezért ezeket érdemesnek találtuk a táblázatban feltüntetni. A **11. Táblázat** MIC értékei alapján megállapítható volt, hogy az NFAP és az NFAP2 antifungális spektruma nagymértékben eltér egymástól; az előbbi elsősorban a fonalgomba, míg az az utóbbi az élesztőgomba izolátumok növekedését gátolta. Az is

11. Táblázat. A *Neosartorya fischeri* antifungális protein (NFAP) és 2 (NFAP2) minimális gátló koncentráció értékei (MIC, *minimum inhibitory concentration*) gomba izolátumokkal szemben *in vitro* mikrodilúciós érzékenységi tesztben (2×10^4 spóra vagy sejt, 25°C, 72 óra - fonalasgomba, 30°C, 48 óra – élesztőgomba, ráztatás nélküli inkubáció után).

Izolátum	MIC (µg/ml)		Tápközeg	Izolálás és egyéb adatok	Referencia
	NFAP	NFAP2			
Fonalasgombák					
<i>Aspergillus creber</i> SZMC 28230	6,25	6,25	LCM	templom belső fala, Kézdiváralja, Románia	Dán és mtsai. 2024 [183]
<i>Aspergillus creber</i> SZMC 28229	>50	50			
<i>Aspergillus flavus</i> SZMC 3014	100	>200	0,1×PDB	<i>Triticum aestivum</i> , Magyarország	Tóth és mtsai. 2020a,2022 [184,185]
<i>Aspergillus flavus</i> SZMC 12618	100	>200			
<i>Aspergillus flavus</i> SZMC 20745	12,5	>200		<i>Zea mays</i> , Magyarország	Tóth és mtsai. 2022 [185]
<i>Aspergillus flavus</i> SZMC 20755	25	>200			
<i>Aspergillus niger</i> SZMC 0145	50	>200		gyümölcs, Magyarország	Tóth és mtsai. 2020a,2022 [184,185]
<i>Aspergillus niger</i> SZMC 2759	50	>200	mazsola, Magyarország		
<i>Aspergillus niger</i> SZMC 601	50	>25	LCM	n.a.	Tóth és mtsai. 2016 [180]
<i>Aspergillus nidulans</i> FGSC A4	200*	>25*		n.a.	
<i>Aspergillus welwitschiae</i> SZMC 21821	25	>200	0,1×PDB	<i>Allium cepa</i> , Magyarország	Tóth és mtsai. 2020a,2022 [184,185]
<i>Aspergillus welwitschiae</i> SZMC 21832	12,5	>200			
<i>Aureobasidium pullulans</i> SZMC 28233	>50	50	LCM	templom belső fala, Kézdiváralja, Románia	Dán és mtsai. 2024 [183]
<i>Botrytis cinerea</i> SZMC 21472	6,25	50	0,1×PDB	<i>Rubus idaeus</i> , Magyarország	Tóth és mtsai. 2022 [185]
<i>Botrytis cinerea</i> SZMC 21474	50	25		<i>Fragaria</i> × <i>ananassa</i> , Magyarország	
<i>Botrytis cinerea</i> NCAIM F.00751	50	12,5		Magyarország	Tóth és mtsai. 2020a,2022 [184,185]
<i>Botrytis pseudocinerea</i> SZMC 21470	100	12,5		<i>Brassica napus</i> , Magyarország	
<i>Botrytis pseudocinerea</i> SZMC 21471	100	12,5			
<i>Cladosporium herbarum</i> FSU 1148	100	12,5		n.a.	
<i>Cladosporium herbarum</i> FSU 969	100	12,5		n.a.	
<i>Cladosporium</i> sp. SZMC 28228	>50	50	LCM	templom belső fala, Kézdiváralja, Románia	Dán és mtsai. 2024 [183]
<i>Fusarium boothi</i> CBS 110250	25	>200	0,1×PDB	<i>Zea mays</i> , Dél-Afrika	Tóth és mtsai. 2020a,2022 [184,185]
<i>Fusarium graminearum</i> SZMC 6236J	25	>200			
<i>Fusarium oxysporum</i> SZMC 6237J	25	50		zöldség, Magyarország	
<i>Fusarium solani</i> CBS 115659	50	>200		<i>Solanum tuberosum</i> , Németország	
<i>Fusarium solani</i> CBS 119996	100	>200		<i>Daucus carota</i> , Hollandia	
<i>Penicillium chrysogenum</i> SZMC 28235	12,5	>50	LCM	templom belső fala, Kézdiváralja, Románia	Dán és mtsai. 2024 [183]
<i>Penicillium digitatum</i> CECT 20796	n.a.	11,1*	0,1×PDB	narancs, Valencia, Spanyolország	Gandía és mtsai. 2021* [162]

<i>Penicillium italicum</i> CECT 20909	n.a.	5,5*	0,1×PDB	mandarin, Valencia, Spanyolország	Gandía és mtsai. 2021* [162]
<i>Pseudopithomyces chartarum</i> SZMC 28232	6,25	>50	LCM	templom belső fala, Kézdiálbis (Románia)	Dán és mtsai. 2024 [183]
<i>Rhizomucor mieheii</i> CBS 360.92	>200**	>25	LCM	humán mikózis	Tóth és mtsai. 2016** [180]
<i>Sarocladium kiliense</i> SZMC 28236	>50	12,5	LCM	templom belső fala, Kézdiálbis (Románia)	Dán és mtsai. 2024 [183]
Élesztőgombák					
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	>200**	0,78**, 6,25	LCM	humán tüdőmikózis	Tóth és mtsai. 2016**, 218 [180,181]
	n.a.	200	RPMI-1640		
<i>Candida albicans</i> 27700	n.a.	800	RPMI-1640	humán vulvovaginalis candidiázis, flukonazol rezisztens	Kovács és mtsai 2019 [186]
<i>Candida albicans</i> CBS 5982	n.a.	2,2	0,1×PDB	humán fertőzés	Holzknicht és mtsai. 2022 [149]
<i>Candida glabrata</i> CBS 138	>200**	0,39**, 1,56	LCM	humán széklet	
	n.a.	12,5	RPMI-1640		
<i>Candida guilliermondii</i> CBS 566	>200**	0,39**, 156	LCM	humán köpet	
	n.a.	3,125	RPMI-1640		
<i>Candida krusei</i> CBS 573	>200**	1,56**, 12,56	LCM	humán hörghurut	
	n.a.	400	RPMI-1640		Tóth és mtsai. 2016**, 2018 [180,181]
<i>Candida lusitanae</i> CBS 6936	>200**	0,78**, 3,13	LCM	n.a.	
	-	>100	RPMI-1640		
<i>Candida parapsilosis</i> CBS 604	>200**	0,39**, 1,56	LCM	humán széklet	
	n.a.	100	RPMI-1640		
<i>Candida tropicalis</i> CBS 94	>200**	0,39**, 1,56	LCM	humán hörghurut	
	n.a.	>100	RPMI-1640		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> SZMC 0644	>200**	0,20**, 3,13	LCM	n.a.	
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> SZMC 0142	>200*	0,39**, 1,56	LCM	n.a.	

*: MIC 1×10^3 spórával szemben meghatározva. **: MIC: 24 óra után meghatározva. 10×PDB: 10-szeresre hígított burgonyakivonat-glükóz tápoldat (*potato dextrose broth*), LCM: alacsony ionerősségű (sókoncentrációjú) tápközeg (*low cationic medium*), n.a.: nincs adat, RPMI-1640: *Roswell Park Memorial Institute 1640 tápközeg*. Törzsgyűjtemények: ATCC: *American Type Culture Collection*, Manassas, VA, USA; CBS: *Centraalbureau voor Schimmelcultures*, Utrecht, Hollandia; CECT: *Spanish Type Culture Collection*, Valencia, Spanyolország; FGSC: *Fungal Genetics Stock Center*, Kansas, MO, USA; FSU: *Fungal Reference Centre University of Jena*, Jéna, Németország; NCAIM: *National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms*, Budapest, Magyarország; NRRL: *Northern Regional Research Laboratory Agricultural Research Service Culture Collection*, Peoria, USA; SZMC: *Szeged Microbiology Collection*, Szeged, Magyarország. n.a.: nincs adat. A táblázat kettő vagy három független kísérletből (kísérletenként n=2 vagy 3) származó eredmények értékét tünteti fel.

megfigyelhető volt, hogy az NFAP egyáltalán nem mutatott növekedésgátló hatást a vizsgálatokba bevont élesztőgombákkal szemben, míg az NFAP2 igen; továbbá az, hogy amennyiben az NFAP és NFAP2 egyaránt képes volt ugyanazon fonalgomba izolátum növekedését gátolni, akkor az NFAP2-nek nagyobb koncentrációjára volt ehhez szükség (**11. Táblázat**). A magas tápanyagtartalmú és sókoncentrációjú, klinikai mikrodilúciós érzékenységi tesztekben alkalmazott *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI)-1640 tápközegben ugyanazon izolátummal szemben jelentősen megemelkedett az NFAP2 MIC értéke az alacsony ionerősségű (sókoncentrációjú) tápközegben (LCM, *low cationic medium*) mutatotthoz képest (**11. Táblázat**). Hasonló jelenség volt megfigyelhető az NFAP esetében. Az NFAP legnagyobb alkalmazott koncentrációja (200 µg/ml) esetében sem sikerült teljes növekedésgátlást megfigyelnünk humán keratomikózisból izolált fonalgombákkal szemben RPMI-1640-ben, azonban az izolátumok növekedése szignifikánsan csökkent (22 - 69% növekedésgátlás) a kezeletlen kontrolléhoz képest (100% növekedés) (**12. Táblázat**) (Virágh és mtsai. 2014). Ezek az eredmények összevethetők a szakirodalomban leírtakkal, amelyek alapján más, az NFAP-tól vagy NFAP2-től különböző *Eurotiomycetes*-eredetű AFP-k nem vagy csak nagyon nagy koncentrációban voltak képesek a gombák növekedését RPMI-1640-ben gátolni. Ennek az okát a humán szérumalbuminhoz történő nagymértékű kötődésükben vagy a magas kationkoncentrációjú tápközeg antifungális hatást csökkentő képességében kell keresnünk (Marx 2004, Galgóczy és mtsai. 2010,2019).

12. Táblázat. A *Neosartorya fischeri* antifungális proteinre (NFAP) érzékenynek bizonyult, humán keratomikózisból származó fonalgomba izolátumok növekedési százaléakai *in vitro* mikrodilúciós érzékenységi tesztben, 48 óra, 37°C-on, rázatás nélkül történt inkubáció után.

Izolátum	Növekedési százalék (átlag ± szórás)
<i>Aspergillus welwitschiae</i> SZMC 2390	53±9,9%*
<i>Aspergillus fumigatus</i> SZMC 2394	58±2,9%***
<i>Aspergillus niger</i> SZMC 2402	50±8,0%***
<i>Aspergillus nomius</i> SZMC 2441	46±2,6%***
<i>Aspergillus tamarii</i> SZMC 2482	53±2,8%***
<i>Aspergillus tubingensis</i> SZMC 2503	31±4,6%***
<i>Fusarium incarnatum</i> SZMC 11403	74±2,2%**
<i>Fusarium solani fajkomplexum</i> SZMC 11412	78±4,3%*

A kezeletlen kontroll törzs növekedését tekintettük 100%-nak és az egyes cellákban a kontrollhoz viszonyított növekedési százalékokat tüntettük fel. *,**,***: $p < 0,05$, $p < 0,005$, $p < 0,0001$ - szignifikáns növekedéscsökkenés (egyszempontos varianciaanalízis, Bonferroni-féle többszörös összehasonlítás) a kezeletlen kontrollhoz (100% növekedés) viszonyítva. Törzsgyűjtemények: SZMC: *Szeged Microbiology Collection*, Szeged, Magyarország. A táblázat három független kísérletből (kísérletenként $n=1$) származó eredmények átlagértékét tünteti fel szórással együtt. Virágh és mtsai. (2014) alapján.

7.3.2. Az NFAP2 spektruma szesszilis, biofilm alkotó gombasejtekkel szemben

Egy gomba biofilm formában történő növekedése során a szesszilis (felületre kitapadt) sejtek és hifák kevésbé érzékeny az antifungális szerek hatásával szemben, mint planktonikus állapotban (Fox és mtsai. 2015), ezért klinikai szempontból nézve egy gomba biofilm formában növekedve akár rezisztenssé is válhat egy vagy több antifungális szerrel szemben (Fuentefria és mtsai. 2018). Erre kiváló példa a planktonikus állapotban amúgy is gyakran multidrog-rezisztenciát mutató *Candida auris*, ami a biofilm állapotban szinte elpusztíthatatlanná válik (Romera és mtsai 2019).

Az NFAP2 *in vitro* biofilm ellenes hatékonyságát *Candida albicans* 27700 és eltérő *C. auris* izolátumokkal szemben vizsgáltuk RPMI-1640 tápközegben. Érdekes módon a planktonikus, flukonazol-rezisztens *C. albicans* 27700 sejtekkel szemben mutatott 800 µg/ml NFAP2 koncentráció a biofilmet alkotó szesszilis sejteket is teljes mértékben elpusztította (Kovács és mtsai. 2019). Az NFAP2 128-512 µg/ml koncentrációtartományban képes volt eltérő humán fertőzésekből származó *C. auris* izolátumok által képzett biofilmek metabolikus aktivitását 50%-kal csökkenteni, míg a planktonikus sejtek esetében a MIC értékek a 32-512 µg/ml-nek adódtak ugyanezekkel az izolátumokkal szemben (Kovács és mtsai. 2021). Néhány természetes eredetű antifungális peptidről (pl. defenzinek, cathelicidinek, hisztatinok) már bebizonyosodott, hogy képesek eltérő *Candida* fajok által képzett biofilmek kialakulását kisebb vagy nagyobb mértékben megakadályozni, vagy azokat megszüntetni a szesszilis sejtek növekedésének a gátlásával (Oshiro és mtsai. 2019). Ilyen jellegű molekulák szintetikus peptid-származékai *C. auris* biofilmekkel szemben is hatékonyak bizonyultak RPMI-1640-ben *in vitro* (Kubiczek és mtsai. 2020; Torres és mtsai. 2023).

7.3.3. Az NFAP2 kölcsönhatása klinikumban alkalmazott antifungális szerekkel

A 4.1.2. fejezetben már említésre került, hogy két gombaellenes hatással rendelkező molekula kölcsönösen növelheti egymás hatékonyságát elsősorban akkor, amikor eltérő célpontokat támadnak a gombasejt(b)en. Egy ilyen ún. 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).

Munkánk során kíváncsiak voltunk arra, hogy az NFAP2 képesek-e *in vitro* szinergisztikus kölcsönhatásba lépni a klinikumban alkalmazott gombaellenes szercsoportok néhány képviselőjével RPMI-1640 tápközegben és hogy ez alapján alkalmazható lehet-e adjuváns szerként egy kombinált terápiában. Ezt *Candida* izolátumokkal szemben vizsgáltuk. Eredményeink alapján az NFAP2 minden esetben szinergisztikus kölcsönhatásba lépett hagyományos antifungális szerekkel (amfotericin B, anidulafungin, kaszopofungin, flukonazol, mikafungin) azokra rezisztenciát is mutató, különböző *C. auris* izolátumok által képzett biofilmek ellen (Kovács és mtsai. 2021). A *C. albicans*, *Candida krusei* és *Candida és parapsilosis* izolátumok planktonikus sejtjeivel szemben az NFAP2-flukonazol kombinált alkalmazása szinergisztikus vagy indifferens kölcsönhatást mutatott (13. Táblázat).

7.3.4. Az NFAP és NFAP2 kölcsönhatása

Arra is kíváncsiak voltunk, hogy az NFAP és NFAP2 kombinált alkalmazás során képes-e *in vitro* szinergisztikus kölcsönhatásba lépni egymással. Ezt növénypatogén gomba izolátumokkal szemben vizsgáltuk tízszeresére hígított burgonyakivonat-glükóz tápközegben (10×PDB, *potato dextrose broth*). A két fehérje indifferens kölcsönhatásba lépett *Botrytis cinerea* SZMC 21472 és *Cladosporium herbarum* FSU 1148 izolátumokkal szemben, míg *Aspergillus flavus* SZMC 20745 és *Fusarium oxysporum* SZMC 6237J izolátumoknál az ún. paradox hatást tapasztaltuk (13. Táblázat). Ebben az esetben az *in vitro* egyedülként mutatott MIC érték felett néhány hígítási lépéssel a gomba újra képes volt növekedni. Ennek a jelenségnek az oka lehet a nagy koncentrációban jelenlévő antifungális fehérjékre adott stresszválasz reakció, ami olyan szignáltranszdukciós útvonalakat indukálhat, amik alternatív módon segítik a gomba túlélését pl. sejtfalstressz hatására. A paradox hatás nagyon gyakori jelenség az echinokandinok esetében *Aspergillus* és *Candida* izolátumoknál (Wagener és Loiko, 2017). Ennek ellenére eddigi vizsgálatok azt mutatták, hogy egy *in vitro* tapasztalt paradox hatás nem befolyásolja a klinikai terápia sikerességét valószínűleg annak köszönhetően, hogy a stresszválasz kiváltáshoz szükséges szerkoncentráció nem érhető el a szervezetben (Rueda és mtsai. 2017). Egy másik munkánkban, narancstermés védelme során két eltérő *Penicillium* fajból származó antifungális protein a PeAfpA és PAFB is indifferens kölcsönhatásba lépett egymással *P. digitatum*-mal szemben (Gandía és mtsai. 2021).

13. Táblázat. A *Neosartorya fischeri* antifungális protein 2 (NFAP2) és klinikumban alkalmazott antifungális szerek, továbbá a *N. fischeri* antifungális protein (NFAP) és NFAP2 kombinált alkalmazása során megfigyelt minimális gátló koncentráció értékek (MIC, *minimum inhibitory concentration*; medián), továbbá az általuk mutatott kölcsönhatás típusa frakcionális gátló koncentráció index (FICI, *fractional inhibitory concentration index*; medián) alapján *Candida auris* (24 óra, 37°C) és növénypatogén (72 óra, 25°C) gomba izolátumokkal szemben.

Protein, antifungális szer/ Izolátum	MIC* (µg/ml)		FICI	Kölcsönhatás típusa		Izolálás és egyéb adatok	Referencia
Humánpatogén gombák (RPMI-1640 tápközeg)							
	AMB (e)	NFAP2 (e)	AMB (k)	NFAP2 (k)			
<i>Candida auris</i> NCPF 8971	1	512	0,25	128	0,5	sebtapasz	
<i>Candida auris</i> NCPF 8973	1	>512	0,03	64	0,312	n.a.	
<i>Candida auris</i> NCPF 8985	1	>512	0,03	16	0,155	szinergisztikus	
<i>Candida auris</i> NCPF 89891	1	512	0,25	64	0,375	humán pleurális folyadék	
<i>Candida auris</i> NCPF 13013	2	512	0,03	4	0,25	humán vizelet	
	ANI (e)	NFAP2 (e)	ANI (k)	NFAP2 (k)			
<i>Candida auris</i> NCPF 8971	16	>512	1	128	0,375	sebtapasz	
<i>Candida auris</i> NCPF 8973	>64	>512	1	32	0,375	n.a.	Kovács és mtsai. (2021)
<i>Candida auris</i> NCPF 8985	>64	>512	1	128	0,185	szinergisztikus	
<i>Candida auris</i> NCPF 89891	16	512	1	4	0,069	humán pleurális folyadék	
<i>Candida auris</i> NCPF 13013	>64	512	1	64	0,312	humán vizelet	
	KASZ (e)	NFAP2 (e)	KASZ (k)	NFAP2 (k)			
<i>Candida auris</i> NCPF 8971	>64	512	32	32	0,75	sebtapasz	
<i>Candida auris</i> NCPF 8973	>64	>512	1	64	0,067	n.a.	
<i>Candida auris</i> NCPF 8985	>64	512	1	32	0,075	szinergisztikus	
<i>Candida auris</i> NCPF 89891	>64	512	32	32	0,375	humán pleurális folyadék	
<i>Candida auris</i> NCPF 13013	>64	512	1	32	0,122	humán vizelet	
	FLK (e)	NFAP2 (e)	FLK (k)	NFAP2 (k)			
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	1	200*	0,25	6,25	0,28	humán tüdőmikózis	Tóth és mtsai. (2018)
<i>Candida auris</i> NCPF 8971	>512	>512	32	256	0,5	sebtapasz	
<i>Candida auris</i> NCPF 8973	>512	>512	16	256	0,312	szinergisztikus	
<i>Candida auris</i> NCPF 8985	>512	>512	32	256	0,312	n.a.	Kovács és mtsai. (2021)
<i>Candida auris</i> NCPF 89891	>512	>512	8	512	0375	sebtapasz	
						humán pleurális folyadék	

<i>Candida auris</i> NCPF 13013	>512	>512	32	512	0,375	szinergisztikus	humán vizelet	Kovács és mtsai. (2021)
<i>Candida krusei</i> CBS 573	64	400*	64	6,25	0,52	indifferens	humán hörghurut	Tóth és mtsai. (2018)
<i>Candida parapsilosis</i> CBS 604	8	100	1	6,25	0,19	szinergisztikus	humán széklet	
	MIKA (e)	NFAP2 (e)	MIKA (k)	NFAP2 (k)				
<i>Candida auris</i> NCPF 8971	>64	>512	2	256	0,375		sebtapas	
<i>Candida auris</i> NCPF 8973	>64	>512	1	4	0,064		n.a.	
<i>Candida auris</i> NCPF 8985	>64	>512	1	256	0,375	szinergisztikus	sebtapas	Kovács és mtsai. (2021)
<i>Candida auris</i> NCPF 89891	>64	>512	1	4	0,253		humán pleurális folyadék	
<i>Candida auris</i> NCPF 13013	>64	>512	1	32	0,132		humán vizelet	
Növénypatogén gombák (10×PDB tápközege)								
	NFAP (e)	NFAP2 (e)	NFAP (k)	NFAP2 (k)				
<i>Aspergillus flavus</i> SZMC 20745	12.5	>200	>25	>200	-	paradox hatás	<i>Zea mays</i> , Magyarország	
<i>Botrytis cinerea</i> SZMC 21472	6.25	50	6.25	12.5	1.25	indifferens	<i>Rubus idaeus</i> , Magyarország	Tóth és mtsai. (2022)
<i>Cladosporium herbarum</i> FSU 1148	100	12.5	100	3.125	1.25		n.a.	
<i>Fusarium oxysporum</i> SZMC 6237J	25	50		>50	-	paradox hatás	zöldség, Magyarország	

(e): MIC egyedüli alkalmazás esetében, (k): MIC kombinációban történő alkalmazás esetében, 0,1×PDB: 10-szeresre hígított burgonyakivonat-glükóz tápközege (*potato dextrose broth*), AMB: amfotericin B, ANI: anidulafungin, KASZ: kaszopfungin, FLK: flukonazol, MIKA: mikafungin, n.a.: nincs adat, RPMI-1640: *Roswell Park Memorial Institute*-1640 tápközege. Törzsgyűjtemények: ATCC: *American Type Culture Collection*, Manassas, VA, USA; CBS: *Centraalbureau voor Schimmelcultures*, Utrecht, Hollandia; FSU: *Fungal Reference Centre University of Jena*, Jéna, Németország; NCPF: *National Collection of Pathogenic Fungi*, Salisbury, Egyesült Királyság; *Szeged Microbiology Collection*, Szeged, Magyarország. *MIC: ≥50% metabolikus aktivitás gátlás OD₄₉₂ alapján *C. auris* izolátumok, ≥95% növekedésgátlás OD₆₂₀ alapján egyéb gomba izolátumok esetében a kezeletlen kontrollhoz (100%) viszonyítva. A táblázat kettő vagy három független kísérletből (kísérletenként n=1 vagy 2) származó eredmények értékét tünteti fel. Tóth és mtsai. (2018, 2022), Kovács és mtsai. (2021) alapján összeállítva.

Ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy az Eurotiomycetes-eredetű AFP-k, valószínűleg nem lépnek szinergisztikus kölcsönhatásba egymással, de képesek lehetnek kombinált alkalmazásuk esetén egy olyan stresszválasz reakciót beindítani a gombában, ami által az kompenzálni tudja a károsító hatásukat. Ez a feltételezés azonban részletes vizsgálatot igényel. Mindezekkel szemben, amikor az NFAP-t egy peptid-származékával kombináltuk szinergisztikus kölcsönhatást is sikerült megfigyelnünk (ld. 7.8.1. fejezet) (Tóth és mtsai. 2022).

7.3.5. Környezeti faktorok és proteolitikus enzimek hatása a *Neosartorya fischeri* antifungális proteinek hatékonyságára

Az ugyanazon gomba izolátummal szemben különböző összetételű tápközegekben mutatott eltérő *in vitro* MIC értékek (**11. és 12. Táblázat**) már előre vetítették azt, hogy az NFAP és NFAP2 gombanövekedést gátló képessége nagymértékben függhet a környezeti körülményektől. A különböző környezeti körülmények és proteolitikus enzimek hatását a gombaellenes hatékonyságra az NFAP esetében tanulmányoztuk részletesen. Vizsgáltuk az antifungális hatékonyság változását eltérő ionerősségű (sókoncentrációjú) és kémhatású tápközegekben, továbbá hőkezelés és proteolitikus enzimnek történő kitettség után.

Egy általunk létrehozott NFAP-t expresszáló, és arra érzékeny *A. nidulans* CS2902 törzs esetében megfigyeltük, hogy az 50 mM és a 100 mM koncentrációban jelenlévő KCl, Na₂SO₄ és MgSO₄ egyaránt szignifikáns mértékben csökkenti az NFAP növekedésgátló hatását a mért száraztömegek alapján (**14. Táblázat**). Azt is megfigyeltük, hogy a kétértékű kationra disszociálódó sók ilyen jellegű gátló hatása sokkal erősebb, mint az egyértékű kationokra disszociálódóké, továbbá, hogy a sókoncentráció emelése még inkább fokozza ezt (Galgóczy és mtsai. 2013b) (**14. Táblázat**). Hasonló eredményre jutottunk *A. nidulans* FGSC A4 törzs esetében is az NFAP jelenlétében mért növekedési százalékok alapján: A MgSO₄ már 50 mM koncentrációban is szignifikánsan csökkentette az antifungális hatékonyságot (85±3% növekedés a kezeletlen kontrollhoz (100%) viszonyítva; $p<0,0001$, $n=9$, egyszempontos varianciaanalízis, Bonferroni-féle többszörös összehasonlítás). A NaCl esetében ehhez viszont 100 mM kellett (94±3% növekedés a kezeletlen kontrollhoz (100%) viszonyítva; $p<0,005$, $n=9$, egyszempontos varianciaanalízis, Bonferroni-féle többszörös összehasonlítás) (Galgóczy és mtsai. 2017). Hasonló jelenséget más Eurotiomycetes-

eredetű AFP-k esetében is leírtak már. A jelenség hátterében valószínűleg az állhat, hogy a sókoncentráció emelésének a következtében a plazmamembrán negatívan töltött régióhoz kötődő pozitív töltésű antifungális proteinek leszorítódnak onnan vagy a kötődésük már eleve akadályozott a nagy mennyiségben jelen lévő kationok miatt (Marx 2004, Galgóczy és mtsai. 2010,2019, Huber és mtsai. 2020).

14. Táblázat. A *Neosartorya fischeri* antifungális proteint (NFAP) szekretáló *Aspergillus nidulans* törzs (CS2902-NFAP2) száraztömege 50 és 100 mM sókkal kiegészített komplett tápközegekben 7 nap, 37°C, 160 rpm inkubációt követően a szülői törzssel (CS2902) összehasonlításban.

Só / <i>Aspergillus nidulans</i> törzs	Száraztömeg (mg) eltérő tápközegekben			
	CM	CM+KCl	CM+Na ₂ SO ₄	CM+MgSO ₄
50 mM				
CS2902	133±6	129±7	134±4	139±9
CS2902-NFAP	93±5	103±5*	136±1***,••	117±2***,••
100 mM				
CS2902	129±14	121±7	124±4	133±11
CS2902-NFAP	92±5	118±4**	159±12***,••,••	139±2***,••

CM: komplett tápközegek. * és **: $p < 0,05$ és $p < 0,005$ - szignifikáns különbség a CM-hez viszonyítva, •• és •: $p < 0,05$ és $p < 0,001$ - szignifikáns különbség a CM+50 mM só és CM+100 mM só között, ••• és ••••: $p < 0,05$, $p < 0,005$ és $p < 0,0001$ - szignifikáns különbség a CM+KCl és a CM+Na₂SO₄ vagy CM+MgSO₄ között (egyszempontos varianciaanalízis, Bonferroni-féle többszörös összehasonlítás). A táblázat három független kísérletből (kísérletenként n=3) származó eredmények átlagértékét tünteti fel szórással együtt. Galgóczy és mtsai. (2013b) alapján.

Agardiffúziós érzékenységi tesztek során az NFAP a pH=8,4 - 9,0 tartományban mutatta a legnagyobb hatékonyságot *A. niger* SZMC 601 izolátummal szemben (gátlási zónák átmérő: 23,0±3,0 - 24,33±0,6 mm). Ezt a közeg kémhatásának pH=7,0 vagy 7,2-re történő állítása szignifikánsan csökkentette (gátlási zóna átmérő: 16,7±1,5 és 18,±3,0 mm; $p < 0,005$, n=3, egyszempontos varianciaanalízis, Dunnett-próba) (Kovács és mtsai. 2011). Hasonló eredmények voltak megfigyelhetők *A. nidulans* FGSC A4 törzsszel mikrodilúciós érzékenységi tesztek során. Az NFAP ekkor is sokkal hatékonyabban gátolta a gomba növekedését pH=8,0 kémhatáson (34±6% növekedés, $p < 0,05$, n=9, egyszempontos varianciaanalízis, Bonferroni-féle többszörös összehasonlítás) a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva (100% növekedés), mint pH=7,0 és 6,0 eseteiben (50±3%, illetve 60±8% növekedés; $p < 0,05$, n=9, egyszempontos varianciaanalízis, Bonferroni-féle többszörös összehasonlítás) (Galgóczy és mtsai. 2017). Korábbi tanulmányokban más Eurotiomycetes-eredetű AFP-k is hasonlóan, enyhén lúgos pH tartományban mutatták a legnagyobb gombaellenes hatékonyságot (Marx 2004, Galgóczy és mtsai. 2010).

Az NFAP (200 µg/ml) 30 percen át 70°C-on történő melegítés után is megőrizte *A. niger* SZMC 601 izolátummal szemben az antifungális hatását agardiffúziós érzékenységi tesztben az inkubációt követő 48. órában mért gátlási zónák átmérője alapján (30°C-on kezelt: 21,0±0,6 mm, 70°C-on kezelt: 21,7±0,6 mm). Azonban a gátlási zónák átmérője szignifikánsan csökkent 80, 90 és 100°C-on történt hőkezelést követően. A gátlási zónák ekkor rendre a következők voltak: 19,3±1,2 mm ($p<0,05$), 18,0±0,6 mm ($p<0,0001$) és 16,0±0,3 mm ($p<0,0001$) ($n=3$, egyszempontos varianciaanalízis, Bonferroni-féle többszörös összehasonlítás) (Kovács és mtsai. 2011). Hasonló jelenség volt megfigyelhető mikrodilúciós érzékenységi tesztben *A. nidulans* FGSC A4 izolátummal szemben, amikor a 30 percig, 25°C és 50°C-on kezelt 200 µg/ml NFAP jelenlétében ugyanakkora mértékű 55,5±6,7%, illetve 49,5±6,0% növekedés volt megfigyelhető az inkubációt követő 48. órában a kezeletlen kontrollhoz képest (100% növekedés). Ezzel szemben a 100°C-on történő hőkezelés ezt a növekedésgátló hatást szignifikáns mértékben csökkentette (100,0±3,5% növekedés; $p<0,005$, $n=9$, egyszempontos varianciaanalízis, Bonferroni-féle többszörös összehasonlítás) (Galgóczy és mtsai. 2017). Ennek a jelenségnek az oka az NFAP, három diszulfid-híd által rögzített, hőstabil harmadlagos szerkezetében keresendő (ld. 7.5.1. fejezet). Elektronikus cirkuláris dikroizmus (ECD) spektrométerrel történő szerkezetanalízis azt jelezte, hogy az NFAP legombolyodása még 95°C-on sem történik meg teljes mértékben és a szerkezete 60°C-ig teljesen intakt marad (becsült $T_m=80^\circ\text{C}$). Ez az ECD által bizonyított hőstabil szerkezet a PAF-ra és az NFAP2-re is egyaránt jellemző (Sonderegger és mtsai. 2016, Tóth és mtsai. 2016). Szintén ECD vizsgálatok alapján megállapítható volt, hogy az NFAP2 szerkezete 70°C-ig intakt marad és ez után kezdett csak legombolyodni (becsült $T_m=75^\circ\text{C}$). Az is megfigyelhető volt, hogy 95°C-ra történő melegítést követően az NFAP2 *Saccharomyces cerevisiae* SZMC 0644 izolátummal szemben mutatott MIC értéke 0,195 µg/ml-ről mindössze 0,391 µg/ml-re nőtt meg (Tóth és mtsai. 2016).

Agardiffúziós érzékenységi tesztek jelezték, hogy az NFAP *A. niger* SZMC 601 izolátummal szemben mutatott növekedésgátló hatása még 10 mg/ml széles spektrumú, szerin proteáz típusú, proteináz K-val 20°C-on, 16 órán át tartó kezelést (pH=8,4) követően is megmarad. Viszont a gátlási zóna átmérője szignifikánsan csökkent (14,5±0,5 mm; $p<0,001$, $n=3$, egyszempontos varianciaanalízis, Dunnett-próba) a kezeletlen kontrollhoz (20,7±0,6 mm) viszonyítva (Kovács és mtsai. 2011). Vizsgálataink alapján a PAF is nagymértékű ellenállóképességgel rendelkezik ezzel az enzimmel szemben hasonló körülmények között, míg egy endoproteáz, a tripszin 37°C-on szinte

teljes mennyiségében lebontotta erősen savas közegben (pH=2,0) 24 óra alatt (Tóth és mtsai. 2020). Ez az ellenállóképesség a diszulfid-hidak jelenlétének köszönhető, amik a harmadlagos szerkezetet stabilizálják és szinte minden peptidet és proteint proteolízissel szemben nagy ellenállóképességgel ruháznak fel, aminek az erőssége a diszulfid-hidak számával növelhető (Bulaj 2005).

7.4. A *Neosartorya fischeri* antifungális proteinek hatásmódja

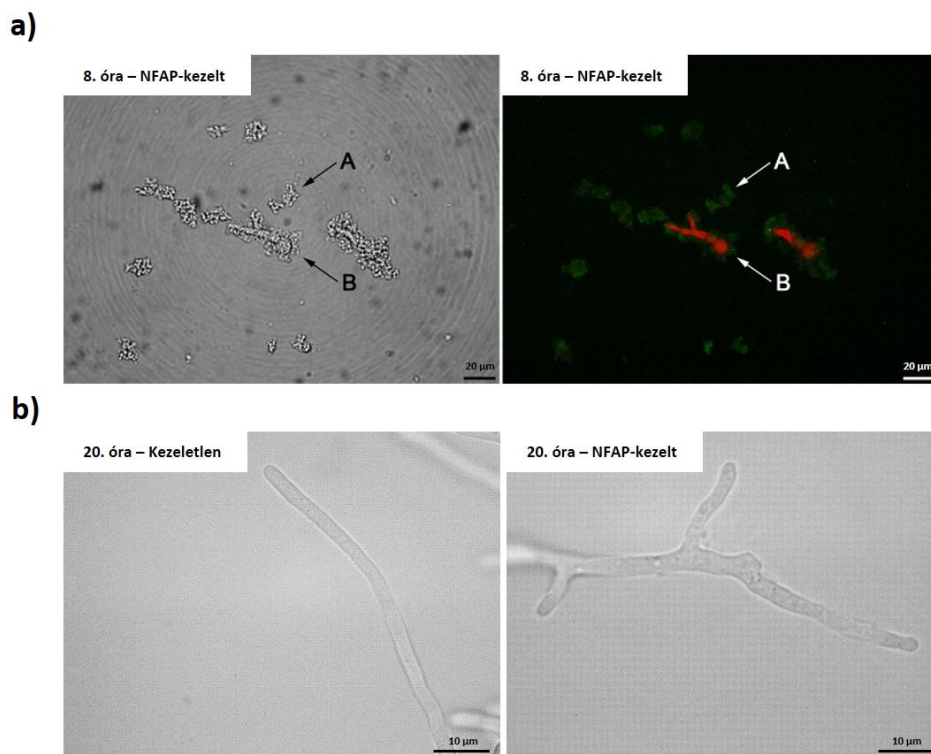
A *N. fischeri*-eredetű antifungális proteinek gyakorlati alkalmazásához elengedhetetlen azok antifungális hatásmódjának a felderítése. Mivel az NFAP elsősorban a fonalas-, míg az NFAP2 az élesztőgombákkal szemben mutatott nagymértékű gombaellenes aktivitást (**11. Táblázat**), ezért az NFAP hatásmódját *A. nidulans*-on, míg az NFAP2-ét *C. albicans*-on tanulmányoztuk.

7.4.1. Az NFAP hatásmódja *Aspergillus nidulans*-on

Az NFAP-t termelő *A. nidulans* CS2902 törzs spórái ugyan képesek voltak csíratömlőt képezni, viszont számos csírázó konídiumban az inkubációt követő 8. órában már reaktív oxigén származékok (ROS, *reactive oxygen species*) felhalmozódása volt megfigyelhető diklorodihidrofluoreszcein-diacetát-alapú festési eljárással. Ekkor a csírázó konídiumok már apoptotikus fenotípust mutattak és rövid időn belül szétestek (**8a. Ábra**) (Galgóczy és mtsai. 2013b). Ezzel szemben a szubletális koncentrációjú NFAP-vel kezelt *A. nidulans* FGSC A4 spórák képesek voltak hifafonalat fejleszteni, viszont azok rövidek, többszörösen elágazók voltak és duzzadt apikális régióval rendelkeztek a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva (Virágh és mtsai. 2015, Galgóczy és mtsai. 2017) (**8b. Ábra**).

Ez utóbbi megfigyelések arra utaltak, hogy az NFAP valamilyen módon megzavarja a sejtfal kiépülését. Ezért vizsgáltuk az NFAP hatását fejlődő *A. nidulans* hifák aktin- és kitinmintázatára. Zöld fluoreszcens fehérjével jelölt aktint termelő *A. nidulans* sejtekben már 30 percig tartó szubletális koncentrációjú (25 µg/ml) NFAP-kezelés hatására megszűnt az apikális régióra jellemző jellegzetes gyűrű-szerű aktin mintázat (Taheri-Talesh és mtsai. 2008), ami rendezetlenné vált (Virágh és mtsai. 2015) (**9a. Ábra**). Mivel az aktinnak fontos szerepe van a kitin sejtfalba történő beépülésében (Taheri-Talesh és mtsai. 2008), ezért calcofluor fehér festési eljárással vizsgáltuk az

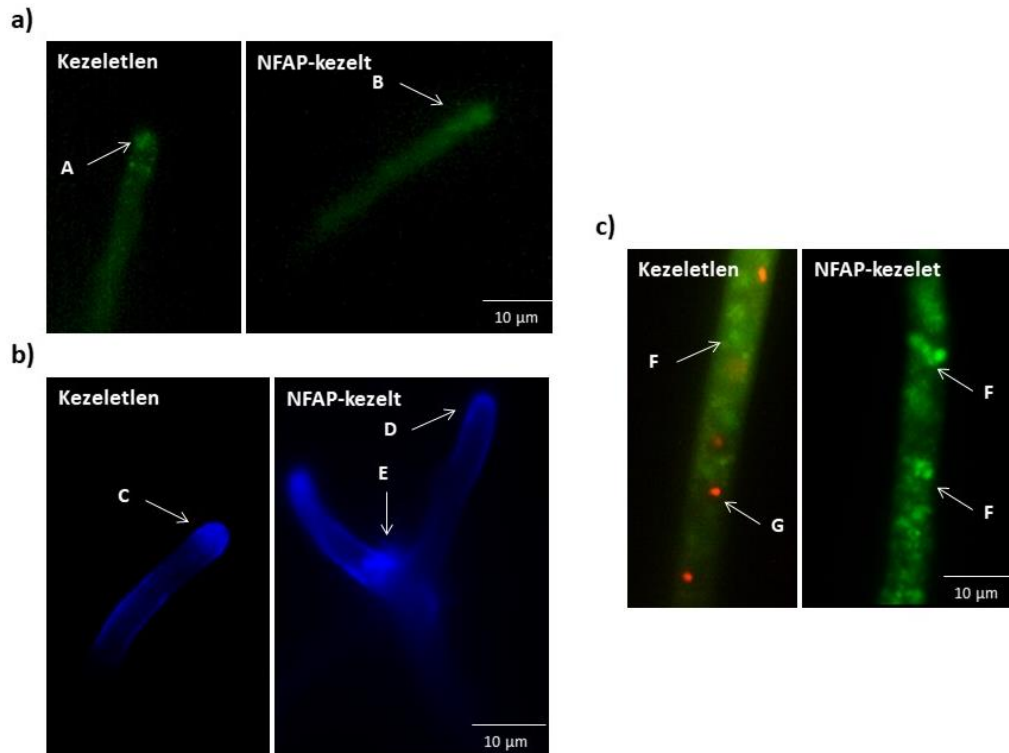
NFAP hatására bekövetkező változásokat a kitin mintázat elrendeződésében. Az NFAP hatására a kitinnek a hifák szubapikális régiójában való lokalizációját figyeltük meg a jellegzetes sapka-szerű mintázat helyett (Taheri-Talesh és mtsai. 2008) (**9b. Ábra**). Ez elsősorban ott valósult meg ahonnan új hifa elágazódás indult meg (**9b. Ábra**). Ezek alapján azt a következtetést vontuk le, hogy az NFAP már rövid időn belül megzavarja az *A. nidulans* hifáinak polarizált növekedését, ami magyarázatul szolgálhat a jelenlétében bekövetkező torzult, többszörösen elágazó hifákra és a növekedésgátlásra (**8b. Ábra**).



8. Ábra. a) Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA)-tel festett NFAP-termelő *Aspergillus nidulans* CS2902 törzsek csírázó konídiumai 8 óra, 37°C, 160 rpm inkubációt követően komplett tápközegben. A bal oldali kép fénymikroszkópos, a jobb oldali pedig fluoreszcens mikroszkópos felvétel. A csírázó konídiumok teljes szétesése vagy azok körül csíratömlőmaradványok (A) figyelhetők meg. Az életképességi festés alapján a pirosra festődő csíratömlők (B) nekrotikusak. **b)** *A. nidulans* FGSC A4 által képzett hifák 20 óra, 37°C, statikus inkubációt követően NFAP nélküli (bal) és szubletális koncentrációjú (25 µg/ml) NFAP-vel kiegészített (jobb) komplett tápközegben. A kezeletlen kontrollhoz viszonyítva az NFAP jelenlétében a rövid, többszörösen elágazó és duzzadt végű hifák jönnek létre. Galgóczy és mtsai. (2013b) és Virágh és mtsai. (2015) alapján.

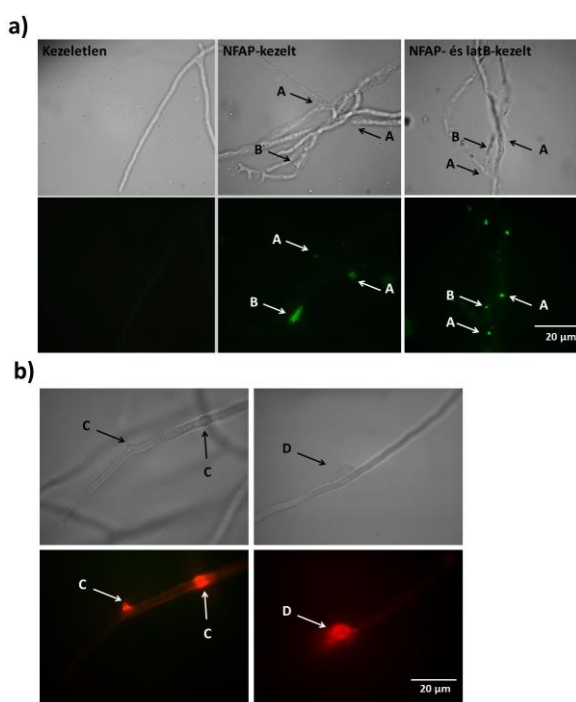
FUN-1 festési eljárással megállapítottuk, hogy már 30 perc szubletális koncentrációjú (25 µg/ml) NFAP-kezelés hatására csökken, vagy teljes mértékben

megszűnik az *A. nidulans* FGSC A4 hifák metabolikus aktivitása (9c. Ábra) (Virágh és mtsai. 2015, Galgóczy és mtsai. 2017). Az Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit-tel történő vizsgálat szignifikánsan több apoptotikus csíratömlőt jelezett ugyanebben az időpontban a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva (NFAP-kezelt: $26,1 \pm 7,5\%$, kezeletlen: $3,5 \pm 1,2\%$; $p < 0,0001$, $n=3$, egyszempontos varianciaanalízis, Bonferroni-féle többszörös összehasonlítás) (Virágh és mtsai. 2015).



9. Ábra. a) Zöld fluoreszcens fehérjével jelölt aktin-termelő *Aspergillus nidulans* hifacsúcsok 30 perc, 30°C-on történt statikus inkubációt követően NFAP nélküli (bal) és szubletális koncentrációjú NFAP-vel (25 μg/ml) kiegészített komplett tápközegben. A jellegzetes sapka- és gyűrű-szerűen elrendeződő aktin eloszlás (A) rendezetlenné válása (B) figyelhető meg NFAP-kezelés hatására. b) Calcofluor fehér-festett *A. nidulans* FGSC A4 hifacsúcsok 30 perc, 37°C-on történt statikus inkubációt követően NFAP nélküli (bal) és szubletális koncentrációjú NFAP-vel (25 μg/ml) kiegészített komplett tápközegben. A jellegzetes sapka-szerűen elrendeződő kitin eloszlás (C) NFAP-kezelés hatására eltűnik (D) és helyette az elágazódásoknál figyelhető meg a kitin felhalmozódása (E). c) FUN-1 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) életképességi festése *A. nidulans* FGSC A4 hifáknak 30 perc, 37°C-on történt statikus inkubációt követően NFAP nélküli (bal) és szubletális koncentrációjú NFAP-vel (25 μg/ml) kiegészített komplett tápközegben. Szinte kizárólag csak metabolikusan inaktív zöld vakuólumok (F) figyelhetők meg az NFAP-kezelt mintákban, míg a kezeletlenben metabolikusan aktív narancssárga vakuólumok (H) is megjelennek. Virágh és mtsai. (2015) alapján.

Propídium-jodid (PI) -ami csak a sérült sejtmembránon át képes bejutni a sejtbe - festési kísérletek alapján az NFAP-kezelést (szubletális 25 $\mu\text{g/ml}$) követő 30. percben a membránintegritás még megmarad és csak 16 óra után szűnik meg (nekrozis). Ezért azt feltételeztük, hogy a 16. órában megjelenő nekrotikus hifák az apoptózis kései szakaszában fellépő membránkárosodás következményei. Mindezekből arra következtetünk, hogy az NFAP rövidtávon apoptózist indukál az *A. nidulans* FGSC A4 hifákban, viszont a sejtmembránt közvetlenül nem károsítja. Egy indirekt immunfluoreszcens festési eljárás azt mutatta, hogy az NFAP 30 és 60 perc inkubációt követően sem jut be a hifákba (10a. Ábra). Jelenléte csak azoknál a buborék-szerű pontoknál volt megfigyelhető 90 perc után, ahol PI-festés alapján a membránintegritás kezdett megszűnni (10b. Ábra). Ekkor a hifa még nem volt nekrotikus. Latrunculin B (endocitotikus folyamatok gátlója) jelenlétében elvégzett hasonló kísérlet azt bizonyította, hogy Az NFAP bejutása a hifa sérült részeinél egy passzív diffúzió eredménye (Virágh és mtsai. 2015).



10. Ábra. a) *Aspergillus nidulans* FGSC A4 hifák indirekt immunfluoreszcens festése 16 óra, 37°C-on történt statikus inkubációt követően NFAP nélküli (bal), szubletális koncentrációjú NFAP-vel (25 $\mu\text{g/ml}$) (középső), és szubletális koncentrációjú NFAP-vel és latrunculin B (latB, 5 $\mu\text{g/ml}$)-vel (jobb) kiegészített komplett tápközegben. A hifák törési pontjainál (A) és a sejtfall kitüremkedéseinél (B) az NFAP felhalmozódása figyelhető meg. Ezek az NFAP-nek a sejtbe történő passzív bejutását jelzik, mivel a latB gátolja az endocitotikus folyamatokat. **b)** *A. nidulans* FGSC A4 hifák propídium-jodiddal (PI) történő festése 90 perc, 37°C-on komplett tápközegben történő szubletális koncentrációjú NFAP-kezelés (25 $\mu\text{g/ml}$) után. A PI felhalmozódása figyelhető meg a sejtfall kitüremkedéseknél (C) és a hifák törési pontjainál (D), amik a membrán károsodását jelzik. Virágh és mtsai. (2015) alapján.

Az *A. nidulans*-ban megfigyeltekkel ellentétben, *Neurospora crassa*-ban zöld fluorezcens BODIPY (boron-dipirrometén)-jelölt NFAP-vel elvégzett vizsgálatok azt mutatták, hogy az NFAP 30 perc inkubációt követően a csírázó konídiumok külső rétegeiben helyezkedik el, ahonnan az inkubációt követő második órában egy energiafüggő vakuoláris transzportfolyamattal jut be a sejtbe. A sejtben a vakuólumokból kiszabadulva (az inkubációt követő 8. órában) apoptózist vált ki, amit a plazmamembrán sérülése és a sejt szétesése követ PI-festés alapján (Hajdu és mtsai. 2019).

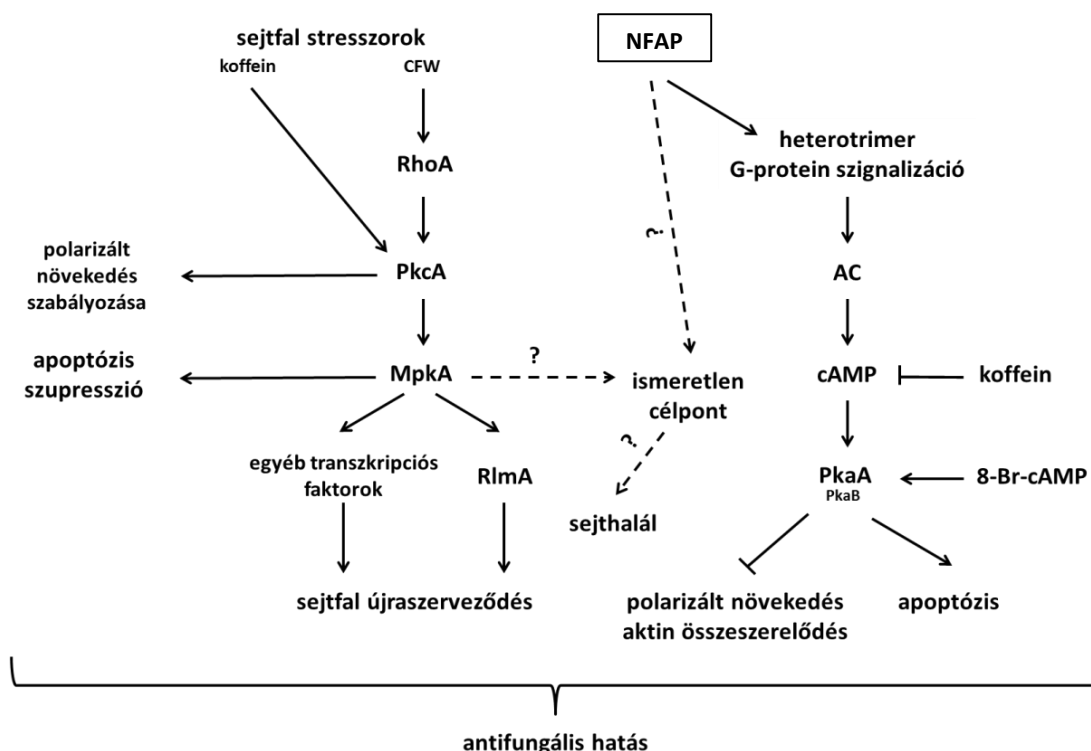
Az NFAP hatására az *A. nidulans* FGSC A4 törzsön bekövetkező rövidtávú fenotipikus változásokat a **15. Táblázat** foglalja össze.

15. Táblázat. Az NFAP hatására rövid (30 és 60 perc) és hosszú (16 óra) időn belül bekövetkező fenotipikus változások *Aspergillus nidulans*-on.

Festési módszer	Idő			Vizsgált változás
	30 perc	60 perc	16 óra	
Aktin-GFP	✓	✓	✓	Az aktin mintázat megváltozása a hifacsúcsokban.
Calcofluor fehér	✓	✓	✓	Csökkent kitintartalom és megváltozott kitin elrendeződés.
FUN-1	✓	✓	✓	Csökkent metabolikus aktivitás.
Propídium-jodid	✗	✗	✓	Membrán permeabilizáció.
Annexin V-FITC / Propídium-jodid	✓	✓	✗	Apoptotikus markerek megjelenése.
Annexin V-FITC / Propídium-jodid	✗	✗	✓	Nekrotikus markerek megjelenése.
Immunfluoreszcens festés	✗	✗	✓	NFAP felhalmozódása a sejtfallal kitüremkedéseinél és a hifák törési pontjainál.

GFP: zöld fluorezcens fehérje (*green fluorescent protein*), FITC: fluorezcen-izotiocianát. ✓: a vizsgált változás megfigyelhető, ✗: a vizsgált változás nem figyelhető meg. Virágh és mtsai. (2015) alapján.

Az *A. nidulans* FGSCA4 és különböző jelátviteli utakban sérült *A. nidulans* törzsek (**1. Melléklet**) eltérő inhibitorok jelenlétében *in vitro* mikrodilúciós tesztekben mutatott NFAP-érzékenységéből azt a következtetést vontunk le (**2-4. Mellékletek**), hogy az NFAP vélhetően egy heterotrimer G-protein-kapcsolt receptorhoz kötődve indukálja a ciklikus adenosin-monofoszfát/ protein-kináz A (cAMP/Pka) szignalizációs útvonalat, amin keresztül gátolja a polarizált hifanövekedést és apoptózist indukál. Továbbá azt, hogy az antifungális hatás a sejtfallintegritás (CWI, *cell wall integrity*)-útvonaltól függetlent, azonban az NFAP egy mitogén által aktivált protein-kináz (MpkA) által aktivált, eddig ismeretlen célponton keresztül apoptózist indukál (**11. Ábra**) (Virágh és mtsai. 2015).

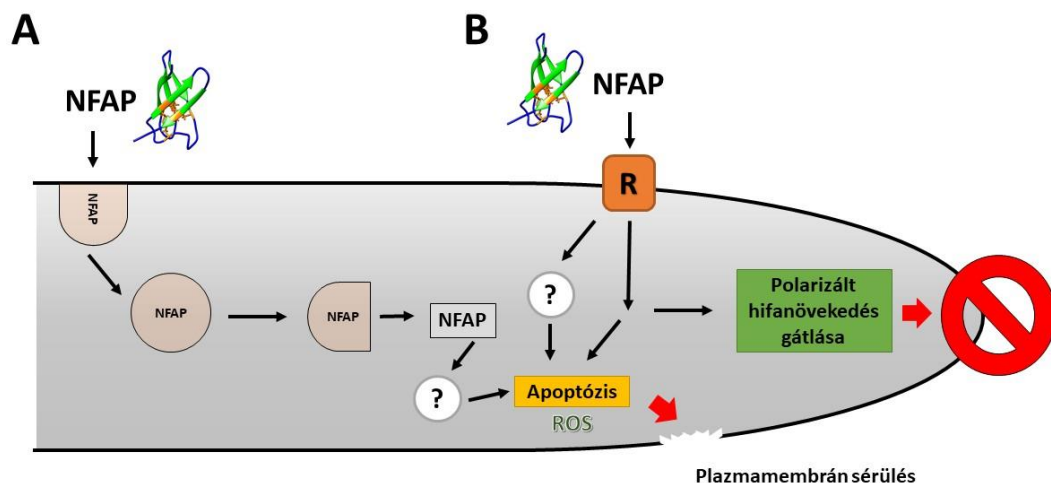


11. Ábra. Az NFAP által befolyásolt és az antifungális hatás kiváltásában szerepet játszó molekuláris útvonalak *Aspergillus nidulans*-ban a vad típusú és különböző jelátviteli utakban sérült törzsek eltérő inhibitorok jelenlétében mutatott NFAP-érzékenysége alapján (1-4. **Mellékletek**). Az NFAP egy heterotrimer G-protein-kapcsolt jelátviteli útvonalon keresztül aktiválja a cAMP/Pka szignáltranszdukciós útvonalat, amin keresztül gátolja a polarizált hifanövekedést és apoptózist indukál. Az NFAP antifungális hatása a sejtfalintegritás-útvonaltól független, azonban egy MpkA által aktivált, eddig ismeretlen célponton keresztül apoptózist indukál. 8-Br-cAMP: 8-bromoadenozin 3'5'-ciklikus monofoszfát. AC: adenilát-cikláz. cAMP: ciklikus adenozin-monofoszfát, CFW: calcofluor fehér (*calcofluor white*), Mpk: mitogén által aktivált protein-kináz, Pka: protein-kináz A A, Pkc: protein-kináz C A, RhoA: guanozin-trifoszfát (GTP)-kötő fehérje, RlmA: transzkripciósfaktor. Virágh és mtsai. (2015) alapján.

Az NFAP hatásmechanizmusának tanulmányozása során elért eredményeink megerősítik 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, de nagymértékben eltér az AFPg és az AFPg_{NN5353} által mutatottól (8. **Táblázat**). Az NFAP a PAF-hoz hasonlóan egy guanozin-trifoszfát (GTP)-kötő fehérjétől, az RhoA-tól független módon fejt ki hatását, de nem aktiválja a protein-kináz C (Pkc) szignalizációt (Binder és mtsai. 2010). Az RhoA és PkcA fehérjék a polarizált növekedés szabályozásában vesznek részt (Guest és mtsai. 2004; Katayama és mtsai. 2012). A PkcA az MpkA fehérjén keresztül még szerepet játszik az apoptózis szupressziójában is

(Katayama és mtsai. 2012). A PAF is egy heterotrimer G-protein által közvetített jelátviteli úton keresztül aktiválja a cAMP/Pka szignalizációs útvonalat, így szintén gátolja a polarizált növekedést és sejthalált indukál (Binder és mtsai. 2010), viszont az NFAP esetében még egy CWI-útvonaltól független, MpkA által aktivált eddig ismeretlen célpont is feltételezünk, aminek szintén szerepe lehet az apoptózis indukciójában (Virágh és mtsai. 2015). Ez az ismeretlen célpont valószínűsíthetően ugyanaz lehet, mint amit az *A. nidulans*-ban feltételeztek a farnezol által indukált apoptózis vizsgálata során (Colabardini és mtsai. 2010). Az NFAP-vel ellentétben a PAF nem aktiválja az MpkA fehérjét (Binder és mtsai. 2010). Az NFAP, a PAF esetében megfigyeltekhez hasonlóan szintén nem indukálja a CWI-útvonalat *A. nidulans*-ban (Virágh és mtsai. 2015). Ezzel ellentétben az AFPg és az AFPg_{NN5353} képesek a CWI-útvonal aktiválására *A. niger*-ben az MpkA/RlmA transzkripciós faktor által aktivált α -glükán szintáz kódoló *agsA* gén expressziós szintjének növelésével (Hagen és mtsai. 2007, Binder és mtsai. 2011). Az AFPg_{NN5353} antifungális hatásmódja is független az RhoA fehérjétől, és valószínűleg a GAP (egy RhoA-GTP-áz aktiváló protein) valamely célpontjával kölcsönhatásba lépve fejt ki hatását, amiben szerepet játszik még egy Pkc/Mpk útvonal is (Binder és mtsai. 2011). Eredményeink alapján az NFAP hatásmechanizmusa nagyon hasonló az élővilágban elterjedt más antifungális fehérjék által mutatottakéhoz (Van Dijck 2009, Hegedüs és Marx 2013), amelyek egy G-protein-kapcsolt receptorhoz kötődve indukálják a cAMP/Pka szignalizációs útvonalat, és ez által gátolják a polarizált növekedést (Bencina és mtsai. 2005), továbbá programozott sejthalált indukálnak (Semighini és mtsai. 2006).

Összefoglalásként felállíthatjuk az NFAP egyszerűsített antifungális hatásmechanizmusát *A. nidulans*-ban, ami két úton keresztül valósul meg: 1) Az NFAP vakuoláris transzportfolyamattal bejut a sejtbe, majd a vakuólumokból kiszabadulva egy ismeretlen célponton keresztül apoptózist vált ki, ami ROS felhalmozódással és a plazmamembrán sérülésével jár együtt. 2) Az NFAP egy gombaspecifikus receptorhoz kötődve egy olyan jelátviteli útvonalat kapcsol be, amin keresztül gátolja a polarizált hifanövekedést és apoptózist indukál, továbbá egy másik, egy ettől független jelátviteli útvonal aktiválásával egy eddig ismeretlen célponton keresztül szintén apoptózist indukál (12. Ábra).



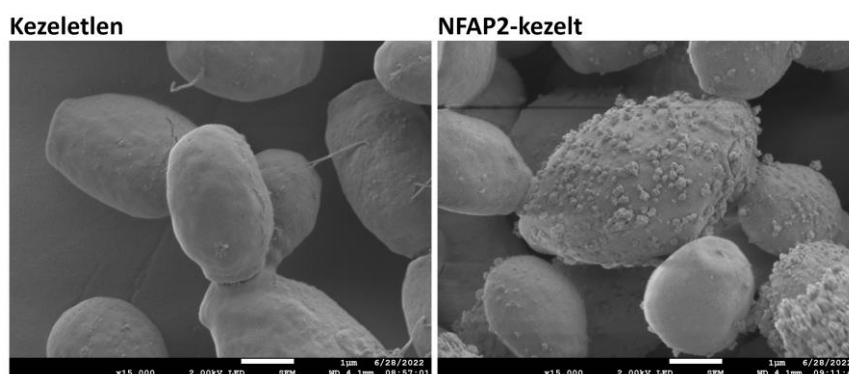
12. Ábra. Az NFAP feltételezett hatásmechanizmusa *Aspergillus nidulans*-ban. Az NFAP vakuoláris transzportfolyamattal bejut a sejtbe, majd a vakuólumokból kiszabadulva egy ismeretlen célponton (?) keresztül apoptózist vált ki, ami reaktív oxigén származékok (ROS, *reactive oxygen species*) felhalmozódását és a plazmamembrán sérülését vonja maga után (A). Az NFAP vélhetően egy gomba specifikus receptorhoz (R) is kötődve egy olyan jelátviteli útvonalat kapcsol be, amin keresztül gátolja a polarizált hifanövekedést és apoptózist is indukál (B). Mindezek mellett egy másik, egy ettől független jelátviteli útvonal aktiválásával egy eddig ismeretlen célponton (?) keresztül szintén apoptotikus folyamatokat indít be.

7.4.2. Az NFAP2 hatásmódja *Saccharomyces cerevisiae*-n és *Candida albicans*-on

Az NFAP2 elsősorban élesztőgombák ellen bizonyult hatásosnak (**11. Táblázat**) (Tóth és mtsai. 2016). Hatásmechanizmusáról kevesebbet tudunk, mint az NFAP esetében. Fluoreszcens festési eljárásokkal kapcsolt mikroszkópos technikák alapján a szubletális koncentrációban (0,089 $\mu\text{g/ml}$) alkalmazott NFAP2 nem gátolta a *Saccharomyces cerevisiae* SZMC 0644 sejtek metabolizmusát (FUN1-festés) és nem indukált apoptózist (*Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit* alapján) LCM-ben még 16 óra, 30°C-on történt kezelést követően sem. Viszont ekkor a PI által pirosra festett sejtek száma szignifikánsan több volt a NFAP2-vel kezelt mintákban ($18,0 \pm 4,3\%$; $p < 0,05$, $n=3$, páros t-próba), mint a kezeltelenben ($6,3 \pm 3,8\%$). Mindez a fehérje plazmamembránroncsoló aktivitására engedett következtetni. Ezt a feltételezést megerősítette az a megfigyelésünk, hogy amennyiben az NFAP2-t MIC értéken alkalmaztuk (0,195 $\mu\text{g/ml}$), akkor már 10 perc után szignifikánsan több PI-pozitív sejt ($44,3 \pm 15,9\%$; $p < 0,05$, $n=3$, Levene-teszt, páros t-próba) volt megfigyelhető a kezelt mintában a szubletális koncentrációjú NFAP2-vel kezelttel ($2,7 \pm 3,6\%$) és a kezeltelennel ($2,5 \pm 3,1\%$) összehasonlításban. A sejtmembránroncsoló hatás az idővel intenzívebbé vált. Ugyanis 16 óra hosszan tartó

inkubációt követően az NFAP2 MIC értékével kezelt összes *S. cerevisiae* SZMC 0644 sejt ($97,4 \pm 3,1\%$) PI-pozitív fenotípust mutatott, a korábban a szubletális NFAP2 koncentrációval ($18,0 \pm 4,3\%$; $p < 0,0001$, $n=3$, Levene-teszt, páros t-próba) kezelttel és a kezeltelessel ($6,3 \pm 3,8\%$; $p < 0,0001$, $n=3$, Levene-teszt, páros t-próba) összehasonlításban. Ez a megfigyelés a MIC értékű NFAP2 gyors plazmamembránroncsoló hatására enged következtetni (Tóth és mtsai. 2016).

Ugyanez a sejtmembránroncsoló hatás megfigyelhető volt *C. albicans* ATCC 10231 esetében is LCM-ben (Tóth és mtsai. 2018). Orvosi alkalmazhatóság szempontjából az NFAP2 előnyös tulajdonságának bizonyult az, hogy a *C. albicans*-on mutatott sejtmembránroncsoló hatását a klinikai tesztek során alkalmazott RPMI-1640 tápközegben (ami a humán belső folyadékok összetételét részben imitálja) is megtartotta. Áramlási citometriával elvégzett fluoreszcencia-aktivált sejtválogatás (FACS, *fluorescence activated cell sorting*) analízis az mutatta, hogy amennyiben nagyobb flukonazol-rezisztens *C. albicans* 27700 sejtszámot kezeltünk annál, mint amennyivel szemben az NFAP2 MIC értékét meghatároztuk ($512 \mu\text{g/ml}$ RPMI-1640-ben), akkor szignifikáns különbség mutatkozik a kezelt ($38,2 \pm 3,1\%$; $p < 0,0001$, $n=3$, Levene-teszt, páros t-próba) és kezeletlen ($3,3 \pm 1,7\%$) mintákban észlelhető PI-pozitív sejt százalékos arányában. Pásztázó elektronmikroszkópiával (SEM, *scanning electron microscopy*) elvégzett vizsgálatok a *C. albicans* 27700 és CBS 5982 sejtek membránintegritásának a megszűnését jelezték NFAP2 jelenlétében LCM és RPMI-1640 tápközegekben egyaránt. Ennek a sejtmembránroncsoló hatásnak a pontos mechanizmusa még nem ismert (13. **Ábra**) (Kovács és mtsai. 2019).



13. Ábra. Mid-log fázisú *Candida albicans* CBS 5982 sejtek (2×10^6 db sejt) morfológiája minimális gátló koncentrációjú NFAP2 ($3,125 \mu\text{g/ml}$) kezelést követően (jobb) alacsony ionerősségű (LCM, *low cationic medium*) tápközegben a kezeletlen kontrollal összehasonlításban (bal) 30°C -on, 30 percig, 160 rpm inkubáció után. Farkas Attila (HUN-REN SZBK, Növénybiológiai Intézet) felvétele.

Az Eurotiomycetes-eredetű AFP-k élesztőgombaellenes hatásáról kevés információ áll rendelkezésünkre és az is a *P. chrysogenum*-eredetű PAF-ra, PAFB-re és PAFC-re korlátozódik. Annyi elmondható, hogy ezek is fungicid módon hatnak, viszont az NFAP2-vel ellentétben egyik sem gátolja a *C. albicans* növekedését RPMI-1640 vagy más magas ionerősségű tápközegben (Galgóczy és mtsai. 2019, Holzknecht és mtsai. 2020). Mindhárom antifungális protein esetében kimutattuk, hogy azok először a *C. albicans* sejtek külső rétegében lokalizálódnak, majd valamilyen energiafüggő mechanizmussal a sejt belsejébe jutva fejtik ki plazmamembránroncsoló hatásukat (Huber és mtsai. 2018, Sonderegger és mtsai. 2018, Holzknecht és mtsai. 2020). A PAFC-kezelés hatására a *C. albicans* sejtek felszíne ráncossá válik, elvesztik ozmotikus stabilitásukat, összezsugorodnak, majd szétesnek, miközben a sejtartalmuk a külvilágba kerül (Holzknecht és mtsai. 2020). Mindezekből valószínűsíthető az, hogy az Eurotiomycetes-eredetű AFP-k, sok más gombaellenes peptidhez hasonlóan, relatíve magas koncentrációban alkalmazva képesek az élesztőgomba sejtek membránját fizikai módon roncsolni valamelyik általános mechanizmuson keresztül (Struyfs és mtsai. 2021).

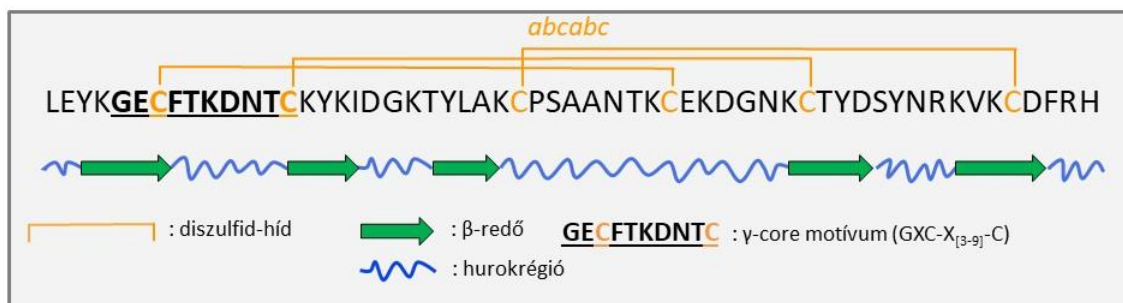
7.5. A *Neosartorya fischeri* antifungális proteinek szerkezete és hatásmódja közötti összefüggés

Az NFAP és NFAP2 szerkezetének a megismerése elengedhetetlenül szükséges volt ahhoz, hogy megértük a szerkezet - antifungális hatás - hatékonyság közötti összefüggést és hogy funkcionálisan aktív peptid-származékokat tudjunk tervezni az egyes szerkezeti motívumok alapján. A *P. chrysogenum*-alapú expressziós rendszerben termeltetett ¹⁵N- és ¹³C-jelölt rekombináns NFAP (*Protein Data Bank* azonosító: 5OQS; Hajdu és mtsai. 2019) és NFAP2 (*Protein Data Bank* azonosító: 8RP9) oldatbeli szerkezetét Prof. Dr. Batta Gyula, Dr. Czajlik András és Hajdu Dorottya (Debreceni Egyetem, TTK, Szerves Kémiai Tsz.) határozták meg magmágneses rezonancia (NMR, *nuclear magnetic resonance*) spektroszkópia módszerrel. Az oldatbeli szerkezetek ismertetése elengedhetetlen a későbbi fejezetek megértése szempontjából.

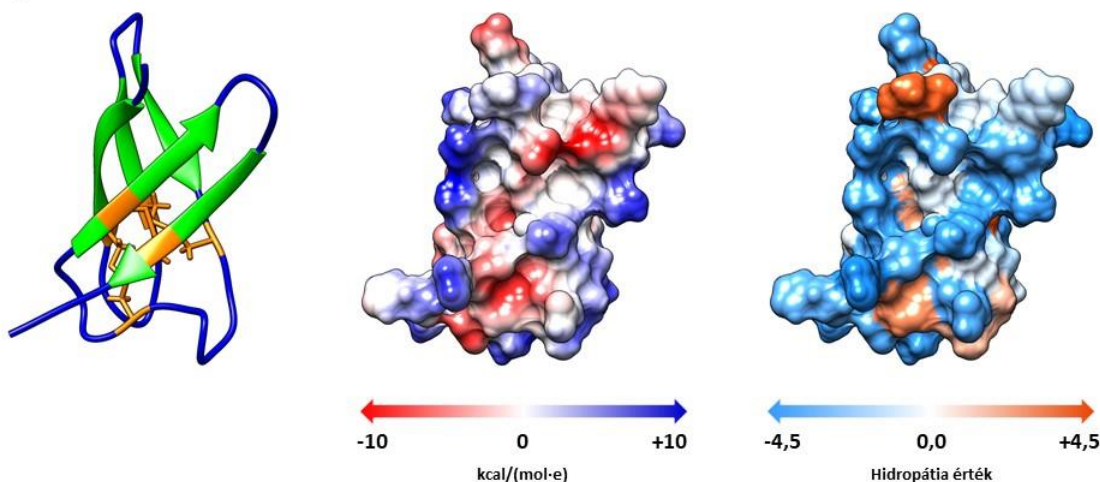
7.5.1. Az NFAP szerkezete és hatásmódja közötti összefüggés

Az NFAP szerkezetéről a **14. Ábra** nyújt összefoglaló információt.

a)



b)



14. Ábra. a) A *Neosartorya fischeri* antifungális protein (NFAP) elsődleges szerkezete és másodlagos szerkezeti elemei. 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* mintázatba rendeződnek. **b)** Az NFAP magmágneses rezonancia spektroszkópiával meghatározott harmadlagos szerkezete (*Protein Data Bank* azonosító: 5OQS, Hajdu és mtsai. 2019) (bal), hidrofóbicitás (középen) és töltöttségi (jobb) felszíne. Narancssárgával a ciszteinek és a közöttük kialakuló diszulfid-hidak, zölddel a β -redők, míg késsel a rendezetlen hurokrégiók kerültek kiemelésre. A fehérjeszerkezet az UCSF Chimera szoftverrel megjelenítve (Pettersen és mtsai. 2004).

Az NFAP 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 (**14b. Ábra**), amit hurokrégiókkal összekapcsolt öt antiparallel állású β -redő épít fel (**14a és b. Ábra**). A fehérje harmadlagos szerkezetét a 7-35., 14-42. és 27-53. pozíciókban megtalálható cisztein molekulák között létrejövő három diszulfid-híd stabilizálja *abcabc* mintázatban (**14a. 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 hidrofíl és hidrofób területek váltakozva helyezkednek el (**14b. 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 (**14b. Ábra**) (Hajdu és mtsai. 2019). Az NFAP N-terminális régiójában, a PAF- és az AFPg-csoportokra általánosan jellemző pozícióban (**5. Ábra**), vagyis az első két β -redő között elhelyezkedő hurokrégióban megtalálható az evolúciósan konzervált γ -core motívum a GECFTKDNTC aminosavak által alkotva (**14a. 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 a PAF-hoz hasonlóan az NFAP tartalmaz egy központi hidrofób magot a Y3, Y16, I18, Y23, Y44 aminosavak által alkotva (Batta és mtsai. 2009, Galgóczy és mtsai. 2017), amely a 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, Cheung és mtsai. 2002, Camilloni és mtsai. 2016). A megfelelő diszulfid-híd mintázat kialakulása elengedhetetlennek bizonyult a megfelelően hatékony harmadlagos szerkezet kialakulásához az AFPg és az NFAP2 esetében (Váradi és mtsai. 2023a,b). A központi hidrofób mag mutációja kihatással lehet egy fehérje stabilitására és feltekerésére (Carter és mtsai. 2001). 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 kialakítását (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).

Az előző bekezdésben említetteket figyelembe véve feltételeztük, hogy a diszulfid-hidak kialakulása, a központi hidrofób mag és az első öt N-terminális aminosav, meghatározó szerepet játszanak az NFAP antifungálisan hatékony szerkezetének a

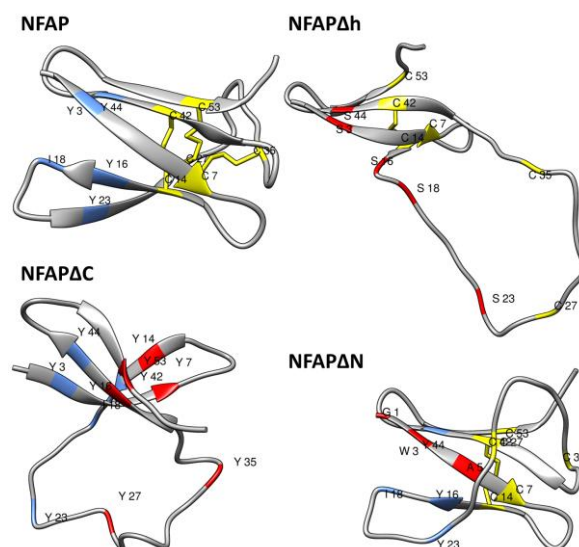
kialakításában és stabilizálásban. Ennek a vizsgálatára aminosavcserékkel olyan szerkezeti mutáns NFAP változatokat terveztünk, amelyekben nem alakulnak ki diszulfid-hidak (NFAP Δ C: C7Y, C14Y, C27Y, C35Y, C42Y, C53Y cserék), vagy nem tartalmaznak központi hidrofób magot (NFAP Δ h: Y3S, Y16S, Y23S, Y44S, I18S cserék), vagy az első öt N-terminális aminosavban eltérnek a vad típustól (NFAP Δ N: L1G, Y3W, G5A cserék) (**16. Táblázat**). Az alkalmazott aminosavcserék következtében az olyan alapvető fizikokémiai tulajdonságok, amelyek befolyásolhatják a gombaellenes hatékonyságot (úm. össztöltés, izoelektromos pont, hidrofóbicitás) nem változtak a vad típusúhoz képest (**16. Táblázat**).

16. Táblázat. A *Neosartorya fischeri* antifungális protein (NFAP) és szerkezeti mutáns változatainak *in silico* előre jelzett fizikokémiai tulajdonságai.

Protein	Molekulatömeg (Da)*	Ciszteinek száma*	Becsült pI*	Töltés (pH 7)**	GRAVY*	β -redők száma***	Diszulfid-hidak száma****
NFAP	6625,52	6	8,93	+5,0	-1,214	5	abcabc
NFAP Δ C	6985,74	0	9,35	+5,1	-1,614	4	-
NFAP Δ h	6295,05	6	8,99	+5,0	-1,272	4	bb
NFAP Δ N	6606,48	6	8,95	+5,0	-1,242	4	bb

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/>). ***: *In silico* homológia modellezés alapján (**15. Ábra**). ****: DISULFIND Cysteines Disulfide Bonding State and Connectivity Predictor server-rel meghatározva (Ceroni és mtsai. 2006). Az NFAP Δ h és NFAP Δ N esetében két diszulfid-híd nem tud kialakulni, mert a ciszteiniek között lévő távolság nagyobb, mint 2.3Å, ami a kialakulásukhoz szükséges maximum (Bhattacharyya és Chakrabarti 2004).

In silico homológia modellezés kimutatta, hogy a ciszteiniek tirozinra történő cseréje miatt nyilvánvalóan nem alakulnak ki diszulfid-hidak (**16. Táblázat**), továbbá a kompakt β -hordó-szerű szerkezet is sérül a harmadik β -redő eltűnése miatt (NFAP Δ C, **15. Ábra**). A központi hidrofób régió megszűnésének következménye, hogy sérül a vad típusú NFAP-re jellemző harmadlagos szerkezet, eltűnik a második és a harmadik β -redő, továbbá csak egy diszulfid-híd alakul ki a 14. és a 42. pozícióban megtalálható ciszteiniek között (NFAP Δ h, **15. Ábra**). Az első öt aminosavban végrehajtott cserék következtében a kompakt β -hordó szerkezet megmarad, de a harmadik β -redő eltűnik és csak egy diszulfid-híd alakul ki a 14. és a 42. pozícióban megtalálható ciszteiniek között (NFAP Δ N, **15. Ábra**) (Galgóczy és mtsai. 2017).



15. Ábra. Az NFAP, NFAP Δ C, NFAP Δ h és NFAP Δ N *Neosartorya fischeri* antifungális protein (NFAP) mutánsok *in silico* homológia modellezéssel előre jelzett harmadlagos szerkezete. Az aminosavcserék pirossal, a központi hidrofób magot alkotó aminosavak pedig kék színnel kiemelve. Citromsárga szín jelzi a ciszteineket és közöttük létrejövő diszulfid-hidakat. A fehérjék szerkezete a *MODELLER* v9.934 programmal került modellezésre (Sali és mtsai. 1995), majd *ModRefiner*-rel finomításra (Xu és Zhang 2011), és az *UCSF Chimera* szoftverrel energiaminimalizálásra (Pettersen és mtsai 2004). A modellek minősége *RAMPAGE* szerverrel ellenőrizve (Lovell és mtsai. 2003). A létrehozott Ramachandran-plotok alapján a modellek megbízhatónak bizonyultak, ugyanis az aminosavak döntő többsége az energetikailag preferált régióban helyezkedik el (NFAP: 94,5%, NFAP Δ C, NFAP Δ h és NFAP Δ N: 98,2%). A fehérjeszerkezetek az *UCSF Chimera* szoftverrel megjelenítve (Pettersen és mtsai 2004). NFAP: vad-típusú NFAP, NFAP Δ C: diszulfid-híd deléciós NFAP mutáns, NFAP Δ h: központi hidrofób mag deléciós NFAP mutáns, NFAP Δ N: első öt N-terminális aminosavban mutáns NFAP. A végrehajtott aminosavcserék következtében (NFAP Δ C, NFAP Δ h és NFAP Δ N) sérült a vad típusú NFAP-re jellemző, diszulfid-hidak által stabilizált, β -hordó-szerű szerkezet. Galgóczy és mtsai. (2017) alapján.

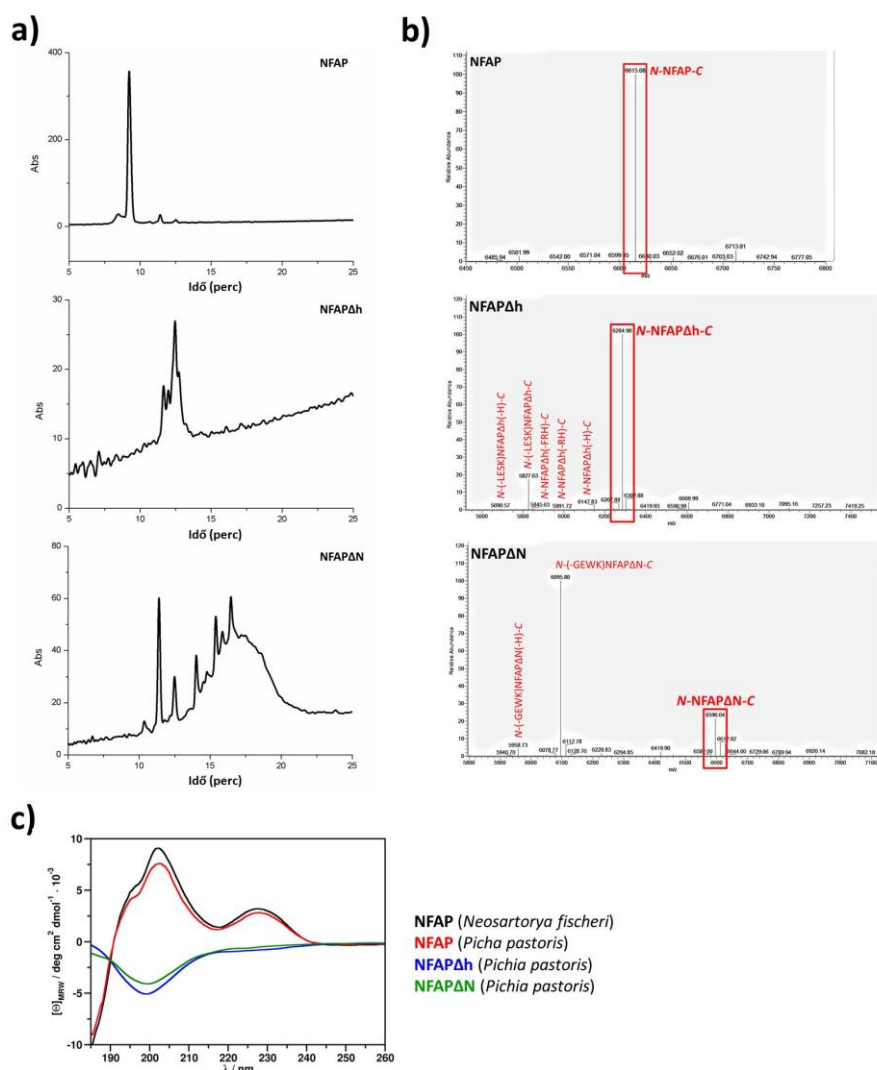
A mutáns NFAP változatokat rekombináns módon, a korábban már alkalmazott *P. pastoris* KM71H-alapú expressziós rendszerben állítottuk elő a vad típus mellett abból a célból, hogy ECD spektroszkópia, tömegspektrometria, fordított fázisú nagy teljesítményű folyadékkromatográfia (RP-HPLC, *reversed-phase high-performance liquid chromatography*) módszerekkel vizsgálni tudjuk a szerkezetüket, továbbá antimikrobiális érzékenységi tesztekkel a hatékonyságukat *A. nidulans* FGSC A4 izolátummal szemben. A *P. pastoris*-alapú expressziós rendszer alkalmasnak bizonyult az NFAP, NFAP Δ h és NFAP Δ N fehérjék termelésre 11,3 $\pm$ 4,7 mg/l (n=3), 29,1 $\pm$ 0,8 mg/l (n=3) és 7,7 $\pm$ 0,1 mg/l (n=2) hozamokkal. Az NFAP Δ C változatot nem sikerült az expressziós rendszer felülcszójából izolálnunk, viszont tömegspektrometriás módszerrel ennek olyan peptid-fragmentumai kimutathatók voltak, amelyek lefedték az érett fehérje

szekvenciájának a 74%-át. Ezen eredmény alapján megállapítottuk, hogy az NFAP Δ C termelődik, de a diszulfid-hidak hiányának következtében lebomlik. Mindez -nem meglepő módon- azt bizonyította, hogy a diszulfid-hidak jelenléte szükséges a stabil, környezeti hatásoknak és proteolízisnek ellenálló szerkezet kialakulásához (Galgóczy és mtsai. 2017).

Az RP-HPLC vizsgálatok során észlelt retenciós idők alapján az NFAP egy-, míg az NFAP Δ h és NFAP Δ N változatok több szerkezeti állapotban voltak jelen a tenyészetek felülúszójában (**16a. Ábra**). Tömegspektrometriai analízis bizonyította, hogy az NFAP megfelelően érett formában, a várt elsődleges szerkezettel termelődött meg és kialakult a három diszulfid-híd a hat cisztein között. Ezzel szemben az NFAP Δ h-nak és NFAP Δ N-nek az N- és/vagy a C-terminálisán egy vagy akár hét aminosavval rövidebb változatai is megfigyelhetők voltak. A három diszulfid-híd ezek mindegyikben kialakult valószínűsíthetően eltérő mintázattal (**16b. Ábra**). ECD spektrumok alapján a *P. pastoris* által termelt vad-típusú NFAP ugyanazzal a diszulfid-hidak által stabilizált, β -redőzött fehérjékre jellemző rendezett szerkezettel és másodlagos szerkezeti elemekkel rendelkezett, mint a natív termelőből izolált NFAP. Ezzel szemben az NFAP Δ h és NFAP Δ N ECD spektruma azt mutatta, hogy ezek elvesztették a rendezett másodlagos szerkezetüket és többféle diszulfid-híd mintázatú változataik is kialakultak (**16c. Ábra**) (Galgóczy és mtsai. 2017). Mindez arra utalt, hogy a központi hidrofób mag és az első öt N-terminális aminosav elengedhetetlenül szükséges az NFAP megfelelő feltekeredéséhez és natív diszulfid-híd mintázat kialakulásához.

Mikrodilúciós érzékenységi tesztek azt mutatták, hogy a központi hidrofób mag hiányában megszűnik az NFAP gombaellenes hatékonysága, ugyanis még 400 μ g/ml NFAP Δ h sem gátolta az *A. nidulans* FGSC A4 növekedését ($110,0 \pm 6,6\%$). Ezzel szemben az NFAP és NFAP Δ h képes volt azt $31,3 \pm 0,2\%$ ($p < 0,05$), illetve $69,0 \pm 8,2\%$ -ra ($p < 0,005$) visszaszorítani a kezeletlen kontrollhoz ($100,1 \pm 1\%$) viszonyítva LCM tápközegeben ($n=9$, egyszempontos varianciaanalízis, Bonferroni-féle többszörös összehasonlítás). Az NFAP dózis-függő módon hatott: Az alkalmazott 50 μ g/ml, 100 μ g/ml és 200 μ g/ml koncentrációk esetében rendre $97 \pm 7\%$ ($p > 0,05$), $69 \pm 4\%$ ($p < 0,005$), $47 \pm 11\%$ ($p < 0,005$) és $31 \pm 0\%$ ($p < 0,0001$) ($n=9$, egyszempontos varianciaanalízis, Bonferroni-féle többszörös összehasonlítás) növekedés volt megfigyelhető a kezeletlen kontrollhoz (100% növekedés) viszonyítva. Az NFAP Δ N antifungális hatása viszont az alkalmazott dózistól függetlennek bizonyult, ugyanis 50 μ g/ml, 100 μ g/ml, 200 μ g/ml és 400 μ g/ml koncentrációkban is nagyon hasonló mértékben $68.5 \pm 4,7\%$ ($p < 0,05$),

67,2±19,5% ($p>0,05$), 79,8±17,7% ($p<0,05$), 69±8% ($p<0,05$)-ra szorította vissza az *A. nidulans* FGSC A4 növekedését a kezeltlen kontrollhoz (100% növekedés) viszonyítva ($n=9$, egyszempontos varianciaanalízis, Bonferroni-féle többszörös összehasonlítás) (Galgóczy és mtsai. 2017).



16. Ábra. A *Pichia pastoris* KM71H által termelt és tisztított *Neosartorya fischeri* antifungális proteinnek (NFAP) és mutáns változatainak (NFAPΔh és NFAPΔN) **a)** fordított fázisú nagy teljesítményű folyadékkromatográfia (RP-HPLC, *reversed-phase high-performance liquid chromatography*) kromatogramja, **b)** tömeg- és **c)** elektronikus cirkuláris dikroizmus (ECD) spektrumai. Az RP-HPLC kromatogramokon észlelt retenciós idők alapján az NFAP egy, míg az NFAPΔh és NFAPΔN többféle szerkezeti állapotban van jelen. Ennek a szerkezeti sokféleségnek az oka lehet az, hogy a tömegspektrumok alapján az NFAPΔh és NFAPΔN N- és/vagy a C-terminálisról egy vagy akár hét aminosav is lehasadhat. Az ECD spektrumok alapján az NFAPΔh és NFAPΔN változatok az NFAP-val ellentétben elvesztették a rendezett másodlagos szerkezetüket és többféle diszulfid-híd mintázatú változat is kialakult az esetükben. NFAP: vad-típusú NFAP, NFAPΔC: diszulfid-híd deléciós NFAP mutáns, NFAPΔh: központi hidrofób mag deléciós NFAP mutáns, NFAPΔN: első öt N-terminális aminosavban mutáns NFAP. Galgóczy és mtsai. (2017) alapján.

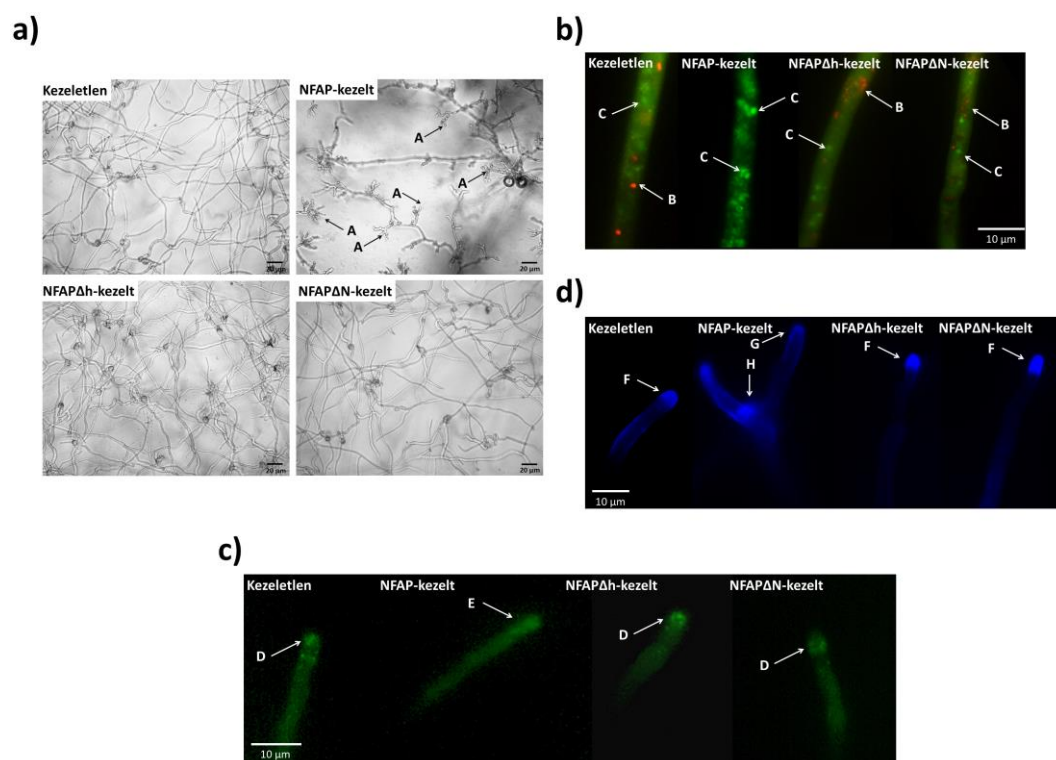
Sem az NFAP Δ N, sem az NFAP Δ h jelenlétében a növekvő *A. nidulans* FGSC A4 hifák nem mutatták azokat a jellegzetes morfológiai elváltozásokat, amiket az NFAP okozott, úgymint a rövid és többszörösen elágazó hifák, duzzadt apikális régióval (17a. **Ábra**). Továbbá az NFAP-vel ellentétben nem okozták a metabolizmus megszűnését FUN-1 festés alapján (17b. **Ábra**), nem változtatták meg a növekvő hifa csúcsi régiójára jellemző gyűrű- és sapka-szerű aktin és sapka-szerű kitin eloszlást (17c-d. **Ábra**) (Galgóczy és mtsai. 2017). Ezen megfigyelések alapján feltételezzük, hogy az NFAP Δ N az NFAP-tól eltérő módon fejt ki antifungális hatását.

A 200 μ g/ml koncentrációban alkalmazott NFAP Δ N hő- és pH-érzékenysége az NFAP által mutatotthoz volt hasonló mikrodilúciós érzékenységi tesztben, komplett tápközegben. Az 50°C-on, 30 percig történő kezelés nem okozott szignifikáns csökkenést ($p>0,05$, $n=9$, egyszempontos varianciaanalízis, Bonferroni-féle többszörös összehasonlítás) sem az NFAP, sem az NFAP Δ N *A. nidulans* FGSCA4 törzzsel szemben mutatott hatékonyságában ($50\pm6\%$, illetve $81,2\pm1,0\%$ növekedés a kezletlen kontrollhoz [$99,9\pm5,9\%$] viszonyítva) a 25°C-on, szintén 30 percig kezelt mintához viszonyítva ($55,5\pm6,7\%$, illetve $81,9\pm5,1\%$). Viszont mindkét protein inaktívnak bizonyult ugyanennyi ideig 100°C-on történő hőkezelés után ($106\pm7\%$, illetve $100\pm4\%$ növekedés) (Galgóczy és mtsai. 2017).

Az NFAP Δ N az NFAP-hez hasonlóan (200 μ g/ml) enyhén lúgos kémhatáson (pH=8,0) mutatta a legnagyobb aktivitást *A. nidulans* FGSCA4 törzzsel szemben ($64,5\pm4,3\%$, illetve $34\pm6\%$ növekedés a kezletlen kontrollhoz [$100\pm7\%$] viszonyítva; $p<0,005$, $n=9$, egyszempontos varianciaanalízis, Bonferroni-féle többszörös összehasonlítás) komplett tápközegben. Semleges kémhatáson (pH=7,0) az NFAP $48\pm3\%$ -ra, míg az NFAP Δ N $80\pm9\%$ -ra csökkentett a gomba növekedését a kezletlen kontrollhoz viszonyítva ($100\pm3\%$ növekedés) ($p<0,005$, illetve $p<0,0001$; $n=9$, egyszempontos varianciaanalízis, Bonferroni-féle többszörös összehasonlítás). Az NFAP-vel ellentétben az NFAP Δ N enyhén savas kémhatáson (pH=6,0) nem mutatott növekedésgátló hatást *A. nidulans* FGSC A4-en ($59\pm8\%$, illetve $94,8\pm5,5\%$ növekedés a kezletlen kontrollhoz [$100\pm7\%$] viszonyítva; $p<0,005$, $n=9$, egyszempontos varianciaanalízis, Bonferroni-féle többszörös összehasonlítás) (Galgóczy és mtsai. 2017).

Az NFAP antifungális hatékonyságát az *A. nidulans* FGSCA4 törzzsel szemben a 25 mM NaCl nem befolyásolta ($48,9\pm8,1\%$ növekedés, $p<0,005$), addig az 50-100 mM NaCl és 25-100 mM MgSO₄ dózisfüggő módon csökkentette azt ($61\pm1\%$ - $119\pm11\%$ növekedés). Ezzel szemben a 25 mM NaCl ($113,8\pm8,1\%$ növekedés) vagy MgSO₄

($96,3 \pm 0,1\%$ növekedés) jelenlétében az NFAP Δ N már inaktívnak bizonyult (Galgóczy és mtsai. 2017).



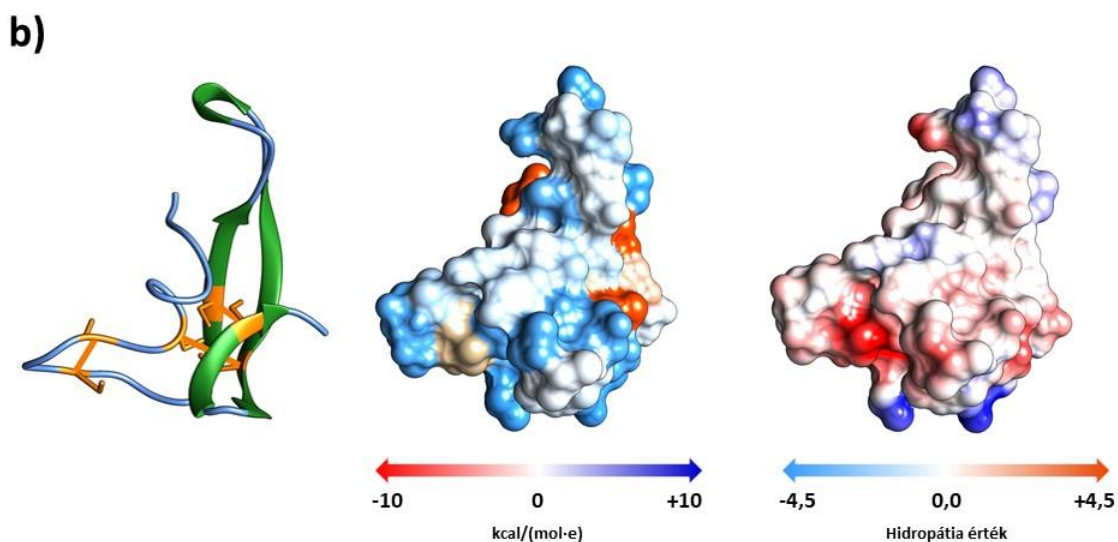
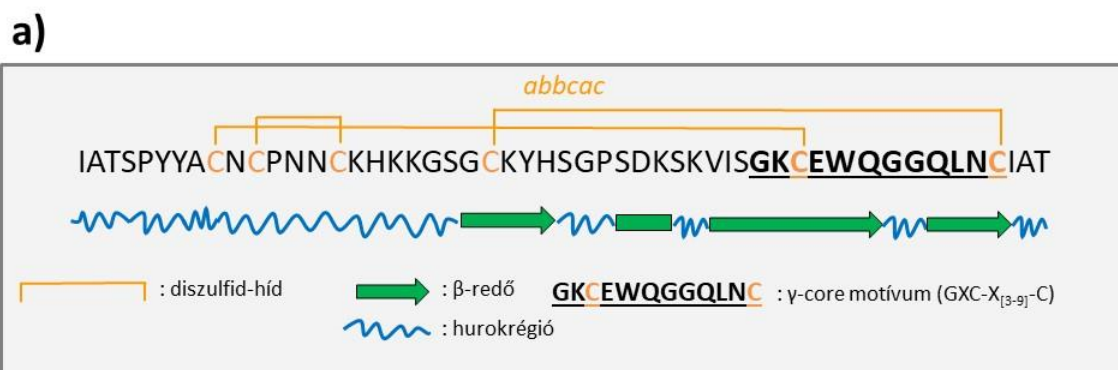
17. Ábra. a) *Aspergillus nidulans* FGSC A4 által képzett hifák 48 óra, 37 °C-on történt statikus inkubációt követően *Neosartorya fischeri* antifungális protein (NFAP)-kezelés nélkül (bal felső) és szubletális koncentrációjú (25 μg/ml) NFAP-vel (jobb felső), NFAP Δ h-val és NFAP Δ N-nel (alsó sor) kiegészített komplett tápközegegben. Az NFAP jelenlétében a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva rövid, többszörösen elágazó duzzadt végű hifák képződnek (A), amik az NFAP Δ h és NFAP Δ N jelenlétében nem figyelhetők meg. **b)** FUN-1 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) életképességi festése az *A. nidulans* FGSC A4 hifáknak 30 perc, 37°C-on történő statikus inkubációt követően NFAP nélküli (balról első) és szubletális koncentrációjú (25 μg/ml) NFAP-vel (balról második), NFAP Δ h-val (balról harmadik) és NFAP Δ N-nel (utolsó) kiegészített komplett tápközegegben. A kezeletlen, az NFAP Δ h-val és az NFAP Δ N-nel kezelt mintákban metabolikusan aktív narancssárga vakuólumok (B) és inaktív zöld vakuólumok (C) egyaránt megfigyelhetők, míg az NFAP-kezelés hatására csak a zöld, metabolikusan inaktívak. **c)** Zöld fluoreszcens fehérjével jelölt aktin-termelő *A. nidulans* hifacsúcsok 30 perc, 30°C-on történő statikus inkubációt követően NFAP-kezelés nélküli (balról első) és szubletális koncentrációjú (25 μg/ml) NFAP-vel (balról második), NFAP Δ h-val (balról harmadik) és NFAP Δ N-nel (utolsó) kiegészített komplett tápközegegben. A jellegzetes sapka- és gyűrű-szerűen rendeződő aktin eloszlás (D) rendezetlenné válása (E) figyelhető meg NFAP-kezelés hatására, míg az NFAP Δ h és NFAP Δ N jelenléte nem okoz ilyen változást. **d)** Calcofluor fehér-festett *A. nidulans* FGSC A4 hifacsúcsok 30 perc, 37°C-on történő statikus inkubációt követően NFAP nélküli (balról első) és 25 μg/ml NFAP-vel (balról második), NFAP Δ h-val (balról harmadik) és NFAP Δ N-nel (utolsó) kiegészített komplett tápközegegben. A jellegzetes sapka-szerűen rendeződő kitin eloszlás (F) az NFAP-kezelés hatására eltűnik (G) és helyette az elágazódásoknál figyelhető meg kitin felhalmozódás (H). Ez a változás nem következik be NFAP Δ h és NFAP Δ N jelenlétében. Galgóczy és mtsai. (2017) alapján.

A fentebb található bekezdésekben ismertetett az eredmények azt mutatják, hogy az N-terminális régióban alkalmazott aminosavcserek hatására bekövetkező szerkezeti változások csak az NFAP Δ N só érzékenységet fokozzák, a hő- illetve pH-érzékenységet nem.

Az NFAP Δ C, NFAP Δ h és NFAP Δ N vizsgálatai során elért eredmények alapján megállapítottuk, hogy az antifungális hatás és spektrum növelése érdekében módosítható szerkezeti elemek elsősorban a rendezetlen hurokrégiókra korlátozódnak az NFAP esetében. Egy ilyen hurokrégió lehet az első két β -redő között elhelyezkedő, az NFAP-ben is megtalálható evolúciósan konzervált. γ -core motívum (GECFTKDNTC) (**16a. Ábra**). Növényi-eredetű, gombaellenes hatással rendelkező β -defenzineknél bebizonyosodott, hogy ez a régió befolyásolja az antifungális hatásmódot és hatékonyságot, továbbá alkalmas lehet antifungálisan hatékony peptid-származékok tervezésére. Amennyiben a γ -core motívumot elsősorban pozitív töltésű és hidrofil aminosavak építik fel, akkor a defenzin sejtmembránroncsoló, fungicid hatással bír. Ezzel szemben, ha negatívan töltött és hidrofób aminosavak találhatóak itt, akkor a defenzin morfogenikus változásokat (többszörösen elágazó, rövid hifák) indukál a fejlődő hifán és sztatikus hatással van a gomba növekedésére (Sagaram és mtsai. 2011). Az Eurotiomycetes-eredetű AFP-k γ -core motívumon keresztül történő módosításának lehetőségét a PAF esetében bizonyítottuk. Amennyiben a PAF amúgy is hidrofil és pozitív össztöltéssel rendelkező γ -core régiójában olyan aminosavcsereket hajtottunk végre, amelyek növelték a pozitív töltés erősségét és még hidrofilebbé tették azt (PAF^{opt} változat), akkor a PAF sokkal hatékonyabbá vált *C. albicans*-szal szemben és a vad típusú PAF MIC értékének az egyötöde is elégnek bizonyult a teljes növekedésgátlás eléréséhez. A PAF és a PAF^{opt} γ -core régióit lefedő szintetikus peptid-származékok is antifungálisan aktívnak bizonyultak, ahol a hidrofilebb és nagyobb pozitív össztöltéssel rendelkező módosított változat hatékonyabbnak bizonyult az eredetinel (Sonderegger és mtsai. 2018).

7.5.2. Az NFAP2 szerkezete és hatásmódja közötti összefüggés

Az NFAP2 szerkezetéről a **15. Ábra** nyújt összefoglaló információt.



18. Ábra. a) A *Neosartorya fischeri* antifungális protein 2 (NFAP2) elsődleges szerkezete és másodlagos szerkezeti elemei. Vastag betűvel, aláhúzva az evolúciósan konzervált γ -core motívum került kiemelésre ($GXC-X_{3-9}-C$, ahol X bármilyen aminosav lehet). A ciszteinek által képzett diszulfid-hidak (narancssárga vonal) *abbcac* mintázatba rendeződnek. **b)** Az NFAP2 magmágneses rezonanciaspektroszkópiával meghatározott harmadlagos szerkezete (PDB azonosító: 8RP9, Váradi és mtsai. 2023a) (bal), hidrofóbicitás (középen) és töltöttségi (jobb) felszíne. Narancssárgával a ciszteinek és a közöttük kialakuló diszulfid-hidak, zölddel a β -redők, míg kékkel a rendezetlen hurokrégiók kerültek kiemelésre. A fehérjeszerkezet az UCSF Chimera szoftverrel megjelenítve (Pettersen és mtsai. 2004).

Az NFAP2 oldatbeli szerkezete nagymértékben eltér az NMR-rel vagy röntgenkristallográfiával eddig meghatározott Eurotiomycetes-eredetű AFP-k által mutatottaktól. A PAF- (Batta és mtsai. 2009, Huber és mtsai. 2018), az AFPg- (Campos-Olivas és mtsai. 1995) és a BP-csoport (Olsen és mtsai. 2004, Czajlik és mtsai. 2021) tagjaira a β -hordó-szerű szerkezet jellemző (Galgóczy és mtsai. 2019) (**6. és 14. Ábrák**). Ezzel szemben az NFAP2-t szerkezetileg két nagy egységre lehet osztani. Az első N-terminális rész (1-21 aminosavak: IATSPYYACNCPNNCKHKKGS) egy rendezetlen hurok-régió; míg második, C-terminális részt (22-52. aminosavak:

GCKYHSGPSDKSKVISGKCEWQGGQLNCIAT) három antiparallel β -redő építi fel, melyeket rövid hurokrégiók kapcsolnak össze (**18a. Ábra**). Ezt a szerkezetet az N-terminális hurokrégióban (C11-C15), az N-terminális hurokrégió és a C-terminális β -redőzött szerkezet között (C9-C40), továbbá a β -redőzött szerkezetben (C23-C49) található ciszteinek között létrejövő egy-egy diszulfid-híd stabilizálja *abbcac* mintázatban (**18a. Ábra**) (Váradi és mtsai. 2023a). Ez eltér a szintén hat ciszteint tartalmazó PAF, PAFB és NFAP által mutatott *abcabc* mintázattól (Batta és mtsai. 2009, Huber és mtsai. 2018, Hajdu és mtsai. 2019) (**6. és 18. Ábra**). Az NFAP2 elsődleges szerkezetében is felismerhető az evolúciósan konzervált γ -core motívum, az NFAP-val ellentétben viszont nem az N-terminális (**14. Ábra**), hanem a C-terminális régióban található meg az utolsó két β -redő egy-egy része és közöttük lévő hurokrégió által alkotva (GKCEWQGGQLNC) (**18a. Ábra**). Az NFAP2 felszínén az NFAP-hez hasonlóan (**14. Ábra**) hidrofil és hidrofób; továbbá pozitív, semleges és negatív töltöttségű területek váltakozó elhelyezkedése figyelhető meg (**18b. Ábra**).

Számos tanulmány már beszámolt arról, hogy az AFP-k egyes régiói alapján szintetizált peptidok is gombaellenes hatást mutatnak és plazmamembránroncsoló hatást fejtenek ki abban az esetben, amennyiben hidrofilek és nagymértékű pozitív össztöltéssel rendelkeznek (Sagaram és mtsai. 2011, Garrigues, és mtsai. 2017). Megfigyeléseink alapján az NFAP2 roncsolja az élesztősejtek plazmamembránját (7.4.2. fejezet, **13. Ábra**) (Tóth és mtsai. 2016, 2018). Feltételezésünk szerint ezért a hatásért a protein nagymértékben pozitívan töltött és hidrofil 13-23. aminosavak által alkotott (NNCKHKKGSGC) N-terminális középrégiója a felelős nem pedig a γ -core motívum (**18a. Ábra**). Ezt a feltételezésünket az ún. fehérje funkcionális térképezésének a módszerével vizsgáltuk. Ennek során a **19a. Ábrán** látható módon előállítottuk az NFAP2-t lefedő N- és C-terminális peptid-fragmentumokat (Fr-1 és Fr-2), illetve ezeket lefedő további négy kisebb peptid-fragmentumot (Fr-2, F-4, Fr-5, fr-6). Ezeknek a gombaellenes és plazmamembránroncsoló hatásait mikrodilúciós érzékenységi teszttel és PI-festéssel vizsgáltuk (**19b. Ábra**). Antifungális érzékenységi tesztekben csak az N-terminális részt lefedő Fr-2 és annak az Fr-4 által alkotott második fele mutatott gombaellenes és sejtmembránroncsoló hatást *C. albicans* ATCC 10231 izolátummal szemben (**19b. Ábra**). *In silico* előrejelzések és NMR szerkezet alapján ez a peptid régió a molekula külső részén elhelyezkedő, könnyen hozzáférhető hurokrégiót alkot (**18. és 19a. Ábrák**), ami képes lehet elektrosztatikusan kapcsolódni a gombasejtmembrán negatívan töltött részeihez.

peptid motívum megismerése lehetőséget ad az NFAP2 módosított aktivitással, hatékonysággal és szelektivitással rendelkező változatainak a kifejlesztésére. Az előző fejezetben már említésre került, hogy az Eurotiomycetes-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 összöltésű és hidrophilebb γ -core motívumot hordozó változatának a vizsgálatával (PAF^{opt}) (Sonderegger és mtsai. 2018). Utesch és mtsai. (2018) molekuladinamikai szimulációk során kimutatták, hogy az *A. giganteus* által termelt AFPg γ -core régiója képes a gomba sejtmembránhoz kapcsolódni és azt szétroncsolni. Ezt figyelembe véve kémiai szintézis módszerrel előállítottuk az NFAP2-nek egy olyan változatát, amiben a 38-49. aminosavak által alkotott szinte semleges összöltésű (-0,2; pH=7,0) és hidrophil (átlagos hidrophóbicitás érték [GRAVY, *grand average of hydropathy value*]: -0,933) GKCEWQGGQLNC γ -core motívumot kicseréltük a Sonderegger és mtsai. (2018) által a PAF módosítása (PAF^{opt}) esetében használt, a GKCKTKKNKC-re, ami nagyobb pozitív összöltéssel (+4,2 pH=7,0) rendelkezik és sokkal hidrophilebb (GRAVY: -1,910). Ez a változás mintegy kétszeresére emelte az NFAP2 összöltését (+5,2-ről +10,2-re, pH=7,0), viszont a hidrophilitását csak enyhén emelte (GRAVY -0,731-ről -0,918-ra). ECD spektroszkópiás vizsgálatok alapján, 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 (Váradí és mtsai. 2023a). Ezen felül a γ -core módosított NFAP2 MIC értéke LCM tápközegben 6,25 μ g/ml-ről, 12,5 μ g/ml-re emelkedett *C. albicans* CBS 5982 izolátummal szemben. Ennek ellenére a γ -core módosított NFAP2 megtartotta ugyanolyan mértékű *C. albicans* sejtölő hatékonyságát. Áramlási citometriával elvégzett FACS analízisek alapján, ugyanis MIC értéken alkalmazva százalékos arányban ugyanannyi sejt mutatott PI-pozitív fenotípust (a 2×10^6 db sejtől) a γ -core módosított NFAP2-vel történő kezelés hatására ($30,1 \pm 3,5\%$), mint amennyi a vad-típusú fehérje esetében ($27,6 \pm 0,6\%$) megfigyelhető volt 16 óra, 30°C-on, 160 rpm-en, LCM-ben történt inkubációt követően. Ezek alapján azt a következtetést vontuk le, hogy a PAF-fal ellentétben a γ -core régión keresztül történő fehérjemódosítás nem egy járható út az NFAP2 gombaellenes hatékonyságának és spektrumának a növelése céljából, és azt, hogy a γ -core régónak elsősorban szerkezetkialakító és megfelelő feltekeredést elősegítő szerepe lehet ebben a fehérjében (Váradí és mtsai. 2023a).

7.6. *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 emlős sejteken mutatott toxicitás (Torres és mtsai. 2019). Munkánk során vizsgáltuk azt, hogy ez igaz lehet-e a *N. fischeri* által termelt antifungális proteinekre, ezért az NFAP és NFAP2 különböző peptid-származékait állítottuk elő és tanulmányoztuk. A kísérletek során felhasznált peptid-származékokat Prof. Dr. Tóth Gábor, Dr. Váradi Györgyi (SZTE SZAOK, Orvosi Vegytani Intézet) és munkatársaik állították elő szilárd fázisú peptidszintézissel.

7.6.1. Peptid-származékok tervezése a γ -core régió alapján

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 fonalagombákkal szemben, mint amilyeneket 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).

Mindezeket figyelembe véve, úgy gondoltuk, hogy az NFAP és az NFAP2 γ -core régiói alapján antifungálisan hatékony peptid-származékok tervezhetők növénypatogén fonalagomba izolátumokkal szemben. Olyan, a γ -core régiót lefedő peptideket szintetizáltunk, amelyek ezen túlnyúló három aminosavat tartalmaztak az acilált N-terminálisukon és egy lizint az amidált C-terminálisukon. Korábbi tanulmányunk alapján ezek a módosítások szükségesnek bizonyultak a neutrális végek létrejöttéhez, a funkcionálisan aktív szerkezet kialakulásához, továbbá jelentős ellenállóképességgel ruházták fel a peptideket proteolitikus hatásokkal szemben (Sonderegger és mtsai. 2018, Tóth és mtsai. 2020b). Annak érdekében, hogy vizsgálni tudjuk vajon a nagy pozitív

össztöltés vagy a hidrofíliát jellemzően ruházza fel a γ -core peptid-származékot antifungális tulajdonsággal, olyan aminosavcsereket hordozó változatait is előállítottunk az NFAP γ -core peptid-származéknak (γ^{NFAP}), ami megemelt pozitív össztöltéssel rendelkezik és hidrofíliát ($\gamma^{\text{NFAP}}\text{-opt}$). Ez utóbbinak pedig olyan változatát, ami neutrális töltésű de megtartja átlagos hidrofóbicitás értékét ($\gamma^{\text{NFAP}}\text{-opt-Chz}$), továbbá egy olyat, ami megtartja megemelt pozitív össztöltését, de átlagos hidrofóbicitás értéke jelentősen emelkedik ($\gamma^{\text{NFAP}}\text{-optGZ}$) (Tóth és mtsai. 2020a). Az NFAP2 esetében a natív γ -core motívum mellett egy emelt pozitív össztöltésű változatot is terveztünk ($\gamma^{\text{NFAP2}}\text{-opt}$). A γ -core motívumokat lefedő, szintetikus peptid-származékok fizikokémiai tulajdonságait a 17. Táblázat foglalja össze.

17. 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
$\gamma^{\text{NFAP}}\text{-opt}$	14	1728,089	2	7/0/0	9,84	+5,8	-2,264
$\gamma^{\text{NFAP}}\text{-optChZ}$	14	1578,539	1	0/0/0	5,52	-0,1	-2,264
$\gamma^{\text{NFAP}}\text{-optGZ}$	14	1745,291	2	7/0/0	9,93	+5,8	-0,557
NFAP2 γ-core peptid-származékok							
γ^{NFAP2}	16	1792,049	2	2/0/0	8,02	+0,8	-0,450
$\gamma^{\text{NFAP2}}\text{-opt}$	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://protpcalc.sourceforge.net/>). Tóth és mtsai. (2020a, 2022) alapján.

7.6.2. A γ -core régió alapján tervezett peptid-származékok antifungális spektruma és hatékonysága

A 17. Táblázatban feltüntetett szintetikus γ -core származékok növénypatogén fonalgombák izolátumokkal szemben mutatott hatékonyságát a 18. Táblázat foglalja össze. A mikrodilúciós antifungális érzékenységi tesztek adatai rávilágítottak arra, hogy a natív γ -core régiót lefedő neutrális (össztöltés: -0,1 pH=7,0) és erősen hidrofíliát (GRAVY: -1,500) γ^{NFAP} , továbbá az enyhén pozitív össztöltésű (+0,8 pH=7,0) és enyhén hidrofíliát (GRAVY: -0,450) γ^{NFAP2} nem gátolja a gombák növekedését (MIC>200 $\mu\text{g/ml}$).

Ezzel szemben a megemelt pozitív ösztötléssel rendelkező és hidrofil γ^{NFAP} -opt (+5,8 pH=7,0, GRAVY: -2,264) és γ^{NFAP2} -opt (+5,8 pH=7,0, GRAVY: -1,079) változatok már hatékonyan bizonyultak a vizsgálatokba bevont *Botrytis* (MIC: 12,5-200 $\mu\text{g/ml}$), *Cladosporium* (MIC: 12,5-100 $\mu\text{g/ml}$) és néhány *Fusarium* (MIC: 12,5->200 $\mu\text{g/ml}$) izolátumokkal szemben.

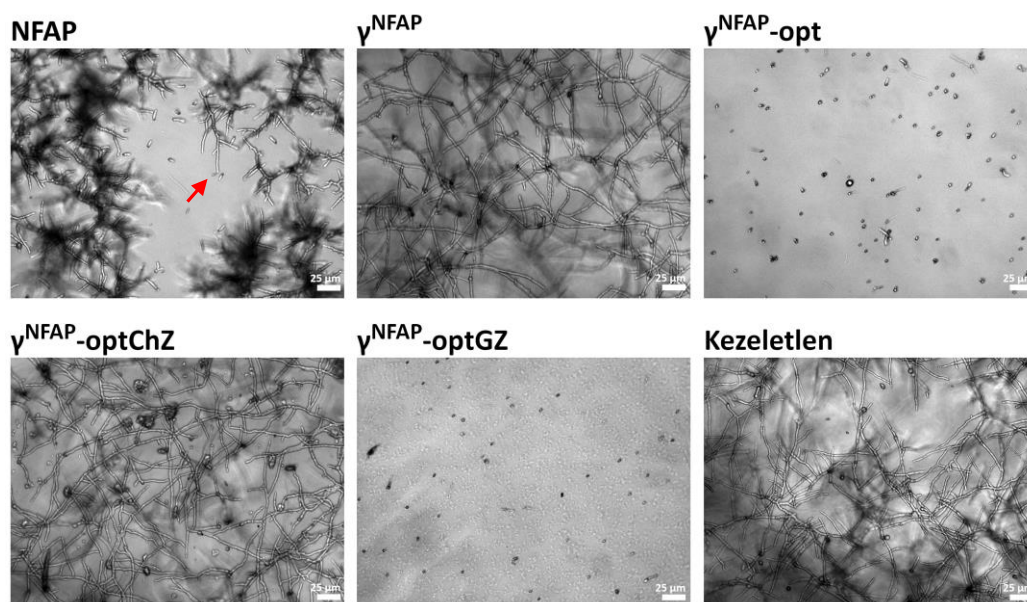
18. Táblázat. A *Neosartorya fischeri* antifungális protein (NFAP) és 2 (NFAP2) γ -core régiói alapján tervezett szintetikus peptid-származékok minimális gátló koncentráció (MIC, *minimum inhibitory concentration*) értékei 10-szeresre hígított burgonyakivonat-glükóz tápközegben (0,1×PDB, *potato dextrose broth*) növénypatogén gomba izolátumokkal (2×10^4 spóra) szemben *in vitro* mikrodilúciós érzékenységi tesztben, 25°C, rázatás nélküli inkubáció után.

Izolátum	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		Izolálás és egyéb adatok
	γ^{NFAP} -opt	γ^{NFAP2} -opt	
<i>Aspergillus flavus</i> SZMC 3014	>200	>200	<i>Triticum aestivum</i> , Magyarország
<i>Aspergillus flavus</i> SZMC 12618	>200	>200	
<i>Aspergillus flavus</i> SZMC 20745	>200	>200	<i>Zea mays</i> , Magyarország
<i>Aspergillus flavus</i> SZMC 20755	>200	>200	
<i>Aspergillus niger</i> SZMC 0145	>200	>200	gyümölcs, Magyarország
<i>Aspergillus niger</i> SZMC 2759	>200	>200	maszola, Magyarország
<i>Aspergillus welwitschiae</i> SZMC 21821	>200	>200	<i>Allium cepa</i> , Magyarország
<i>Aspergillus welwitschiae</i> SZMC 21832	>200	>200	
<i>Botrytis cinerea</i> SZMC 21472	200	200	<i>Rubus idaeus</i> , Magyarország
<i>Botrytis cinerea</i> SZMC 21474	50	200	<i>Fragaria</i> × <i>ananassa</i> , Magyarország
<i>Botrytis cinerea</i> NCAIM F.00751	50	12,5	Magyarorsrság
<i>Botrytis pseudocinerea</i> SZMC 21470	100	50	<i>Brassica napus</i> , Magyarország
<i>Botrytis pseudocinerea</i> SZMC 21471	100	200	
<i>Cladosporium herbarum</i> FSU 1148	12,5	100	n.a.
<i>Cladosporium herbarum</i> FSU 969	12,5	100	n.a.
<i>Fusarium boothi</i> CBS 110250	50	>200	<i>Zea mays</i> , Dél-Afrika
<i>Fusarium graminearum</i> SZMC 6236J	50	>200	zöldség, Magyarország
<i>Fusarium oxysporum</i> SZMC 6237J	50	>200	
<i>Fusarium solani</i> CBS 115659	12,5	50	<i>Solanum tuberosum</i> , Németország
<i>Fusarium solani</i> CBS 119996	50	200	<i>Daucus carota</i> , Hollandia

Tóth és mtsai. (2020a és 2022) alapján. Törzsgyűjtemények: CBS: *Centraalbureau voor Schimmelcultures*, Utrecht, Hollandia; FSU: *Fungal Reference Centre University of Jena*, Jéna, Németország; NCAIM: *National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms*, Budapest, Magyarország; SZMC: *Szeged Microbiology Collection*, Szeged, Magyarország. n.a.: nincs adat. A táblázat kettő vagy három független kísérletből (kísérletenként n=2) származó eredmények értékét tünteti fel.

A γ^{NFAP} -opt MIC értékénél (12,5 $\mu\text{g/ml}$) a *C. herbarum* FSU 1148 konídiumai nem voltak képesek csírázni vagy hifafonalat fejleszteni. Amennyiben csíratömlőt fejlesztettek, azok rövidek maradtak vagy szétestek valószínűsíthetően egy sejtmembránroncsoló hatás következtében. A szubletális koncentrációjú NFAP-re jellemző morfológiai változásokat indukáló hatás nem volt megfigyelhető (20. Ábra). A γ^{NFAP} -opt antifungális hatása nem bizonyult dózis-függőnek mikrodilúciós érzékenységi

tesztben: MIC értéken alkalmazva szignifikánsan csökkentette ($1,0 \pm 1,0\%$ növekedés; $p < 0,0001$, $n=6$, Levene-teszt, páros t-próba) a *C. herbarum* FSU 1148 növekedését a kezeletlen kontrollhoz képest ($100,1 \pm 9,4\%$ növekedés). A MIC érték alatt ($6,25$ és a $3,125$ $\mu\text{g/ml}$) nem mutatott szignifikáns növekedéscsökkentő hatást és a gomba növekedésének a mértéke ugyanakkorának adódott mind a két koncentráció esetében ($89,3 \pm 18,6\%$, illetve $87,1 \pm 4,4\%$) (Tóth és mtsai. 2020a). Hasonlót megfigyeléseket tettek Garrigues és mtsai. (2017) a *P. digitatum* által termelt AfpB funkcionális térképezése során, ami azt mutatja, hogy az Eurotiomycetes-eredetű AFP-k egyes szerkezeti motívumai alapján tervezett peptid-származékok nem dózis-függő módon hatnak, vagyis el kell érniük egy bizonyos koncentrációt, amikor teljes növekedésgátló hatást mutatnak. Ez alatt semmilyen szintű antifungális hatás nem figyelhető meg.



20. Ábra. A *Cladosporium herbarum* FSU 1148 által képzett hifák morfológiája 10-szeresre hígított burgonyakivonat-glükóz tápközegben ($0,1 \times \text{PDB}$, *potato dextrose broth*), szubletális koncentrációjú NFAP és minimális gátló koncentrációjú ($12,5$ $\mu\text{g/ml}$) NFAP γ -core peptid-származékok (γ^{NFAP} , $\gamma^{\text{NFAP-opt}}$, $\gamma^{\text{NFAP-optChZ}}$, $\gamma^{\text{NFAP-optGZ}}$) jelenlétében 25°C -on, 72 óráig tartó statikus inkubációt követően a kezeletlen kontrollal összehasonlításban. Egyik peptid-származék sem okozta az NFAP jelenlétében megfigyelhető morfológiai elváltozásokat (rövid, többszörösen elágazó hifák duzzadt apikális résszel; lsd. piros nyíl). A natív γ -core alapján tervezett peptid-származék (γ^{NFAP}) nem gátolta a gomba növekedését ellentétben a megemelt pozitív össztöltésű és hidrofilebb $\gamma^{\text{NFAP-opt}}$ változattal. Ez az antifungális hatás csak a $\gamma^{\text{NFAP-opt}}$ ugyanakkora töltésű, de csökkent hidrofilitású $\gamma^{\text{NFAP-optGZ}}$ változatánál marad meg, a semleges töltésű, de ugyanakkora hidrofóbicitás értékűnél ($\gamma^{\text{NFAP-optChZ}}$) nem. Tóth és mtsai. (2020a) alapján.

A γ^{NFAP} -opt pozitív össztöltésével rendelkező, de jelentősen csökkentett GRAVY értékkel bíró γ^{NFAP} -optGZ változat jelenlétében szintén nem csíráztak a *C. herbarum* FSU 1148 konídiumok (**20. Ábra**), továbbá mikrodilúciós tesztben ugyanolyan mértékben csökkentette a gomba növekedését mint az ($1\pm 0\%$, $83\pm 13\%$, $117\pm 2\%$, illetve $1\pm 1\%$, 89 ± 17 , $87\pm 4\%$ növekedések rendre $3,125 \mu\text{g/ml}$, $3,25 \mu\text{g/ml}$ és $12,5 \mu\text{g/ml}$ peptid koncentrációknál). Ezzel szemben a γ^{NFAP} -opt GRAVY értékét megőrző, de szinte neutrális töltésű γ^{NFAP} -optChZ nem mutatott gombaellenes hatást (**20. Ábra**) (Tóth és mtsai. 2020a).

A fentebb tárgyalt eredmények alapján megállapítható volt, hogy egy *Neosartorya*-eredetű antifungális protein γ -core régiója alapján tervezett és módosított peptid-származék antifungális hatékonysága elsősorban a pozitív össztöltéstől függ és nem a hidrofilitástól (Tóth és mtsai. 2020a).

ECD spektroszkópiás vizsgálatok alapján az összes általunk szintetizált γ -core peptid-származék rendezetlen szerkezetűnek mutatkozott vizes közegben és a gombaspóra jelenléte nem indukált olyan szerkezeti átrendeződést, amely alapján jellegzetes másodlagos szerkezeti elemek felismerhetők lettek volna. Ebből azt a következtetést vontuk le, hogy a gombaellenes hatás nem kíván rendezett peptid szerkezetet (Tóth és mtsai. 2020a). Vizsgálatainkhoz hasonlóan a *P. digitatum* AfpB (Garrigues és mtsai. 2017), továbbá a *P. chrysogenum* PAF γ -core régiói alapján tervezett peptid-származékok is rendezetlen szerkezetűeknek bizonyultak (Sonderegger és mtsai. 2018).

7.6.3. Az NFAP γ -core régiója alapján tervezett peptid-származékok szerkezeti integritása és annak növelése

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. Ez

megoldható a ciszteinek aminosavcseréjével, vagyok azok szulfhidriljeinek specifikus védőcsoportokkal történő blokkolásával. Ezért a szulfhidril-csoporttal nem rendelkező, a ciszteinekhez szerkezetileg és fizikokémiai tulajdonságai tekintetében nagyon hasonló szerinre cseréltük az NFAP γ -core peptid-származékainak egy vagy két ciszteinjét (C13S, illetve C6S,C13S változatok), vagy S-*terc*-butilt kapcsoltunk a szulfhidril-csoportokhoz (S-*t*Bu változatok). Ezek a módosítások elsősorban a peptid-származékok GRAVY értékét változtatták meg (általában csökkentették), a pozitív össztöltést nem (Váradí és mtsai. 2024). Ezekről a peptid-származékokról a **19. Táblázat** nyújt átfogó információt.

19. Táblázat. A *Neosartorya fischeri* antifungális protein (NFAP) γ -core motívuma alapján tervezett szintetikus peptid-származékok és azok cisztein módosított változatainak fizikokémiai tulajdonságai.

Peptid	Aminosavak száma	Molekulatömeg (Da)*	Ciszteinek száma*	K/R/H arány*	Becsült pI*	Töltés (pH 7)**	GRAVY*
Ac-EYKGEC(-SH)FTKDNTC(-SH)K-NH₂							
γ^{NFAP}	14	1707,879	2	3/0/0	6,26	-0,1	-1,500
Ac-EYKGECFTKDNTSK-NH₂							
γ^{NFAPC13S}	14	1691,814	1	3/0/0	6,27	-0,1	-1,736
Ac-EYKGESFTKDNTSK-NH₂							
$\gamma^{\text{NFAPC6S,C13S}}$	14	1675,749	0	3/0/0	6,28	-0,1	-1,971
Ac-EYKGEC(-StBu)FTKDNTC(-StBu)K-NH₂							
$\gamma^{\text{NFAPS-tBu}}$	14	1820,108	2	3/0/0	n.a.	n.a.	n.a.
Ac-EYKGK(-SH)KTKKNKC(-SH)K-NH₂							
$\gamma^{\text{NFAP-opt}}$	14	1728,089	2	7/0/0	9,84	+5,8	-2,264
Ac-EYKGKCKTKKNKSK-NH₂							
$\gamma^{\text{NFAP-optC13S}}$	14	1712,025	1	7/0/0	10,02	+5,9	-2,500
Ac-EYKGKSKTKKNKSK-NH₂							
$\gamma^{\text{NFAP-optC6S,C13S}}$	14	1695,960	0	7/0/0	10,22	+5,9	-2,736
Ac-EYKGK(-StBu)KTKKNKC(-StBu)K-NH₂							
$\gamma^{\text{NFAP-optS-tBu}}$	14	1840,318	2	7/0/0	n.a.	n.a.	n.a.
Ac-EIKIK(-SH)KIKKIK(-SH)K-NH₂							
$\gamma^{\text{NFAP-optGZ}}$	14	1745,291	2	7/0/0	9,93	+5,8	-0,557
Ac-EIKIKCKIKKIKSK-NH₂							
$\gamma^{\text{NFAP-optGZC13S}}$	14	1729,226	1	7/0/0	10,14	+5,9	-0,793
Ac-EIKIKSKIKKIKSK-NH₂							
$\gamma^{\text{NFAP-optGZC6S,C13S}}$	14	1713,162	0	7/0/0	10,40	+5,9	-1,029
Ac-EIKIK(-StBu)KIKKIK(-StBu)K-NH₂							
$\gamma^{\text{NFAP-optGZS-tBu}}$	14	1857,520	2	7/0/0	n.a.	n.a.	n.a.

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://protcalc.sourceforge.net/>). n.a.: nincs adat. Váradí és mtsai. (2024) alapján.

A **19. Táblázatban** feltüntetett peptidek gombaellenes hatékonyságát mikrodilúciós érzékenységi tesztben, szerkezeti integritásukat pedig RP-HPLC és ECD analízisekkel vizsgáltuk úgy, hogy a szintézis befejeztével elkészült liofilizát peptideket vízben feloldottuk és azonnal érzékenységi tesztet mértünk össze velük, majd a vizes

oldatot két részre osztottuk. Az egyiket rögtön -20°C-ra helyeztük (-20°C minta) a szerkezetvizsgálatig, a másikat pedig 4°C-ra, 7 napra ez által biztosítva az oxidatív körülményt. Ezután ezzel a második adaggal is mikrodilúciós érzékenységi tesztet mértünk össze, majd a maradékot szintén -20°C-ra helyeztük (4°C minta) a szerkezetvizsgálatig. Az érzékenységi tesztek eredményei alapján a γ^{NFAP} nem gátolta a vizsgálatba bevont *Aspergillus fumigatus* CBS 101355 és a *C. albicans* SC5314 izolátumok növekedését. A γ^{NFAP} -opt (MIC: 12,5-50 $\mu\text{g/ml}$) és γ^{NFAP} -optGZ (MIC: 12,5-25 $\mu\text{g/ml}$) mindegyike gátolta a *C. albicans* SC5314 növekedését, míg az *A. fumigatus* CBS 101355 izolátumra csak a γ^{NFAP} -optGZ (MIC: 25-50 $\mu\text{g/ml}$) és a γ^{NFAP} -opt^{S-tBu} (MIC: 25 $\mu\text{g/ml}$) voltak antifungális hatással. Általánosságban elmondható volt, hogy a cisztein-szerin csere és az S-*terc*-butiláció csökkentette az NFAP γ -core peptid-származék hatékonyságát *C. albicans* SC5314 izolátummal szemben (MIC: 25-50 $\mu\text{g/ml}$). Az S-*terc*-butil módosítás hatékonyá tette a γ^{NFAP} -opt-ot *A. fumigatus* CBS 101355-tel szemben (MIC: 25 $\mu\text{g/ml}$) és nem változtatta meg a γ^{NFAP} -optGZ hatékonyságát, amit a cisztein-szerin cserék csökkentettek (MIC: 50 $\mu\text{g/ml}$). Az egy hét 4°C-on történő tárolás csak a γ^{NFAP} -opt hatékonyságát csökkentette *C. albicans* SC5314-gyel szemben, a többi peptid hatékonysága változatlan maradt (Váradí és mtsai. 2024). Ezeknek a mikrodilúciós érzékenységi teszteknek az eredményeit a **20. Táblázat** foglalja össze.

20. Táblázat. A *Neosartorya fischeri* antifungális protein (NFAP) γ -core régiói alapján tervezett szintetikus peptid-származékok és azok cisztein módosított változatainak MIC (*minimum inhibitory concentration*) értékei alacsony ionerősségű tápközegben (LCM, *low cationic medium*) *in vitro* mikrodilúciós érzékenységi tesztben (1×10^4 spóra, 30°C, 48 óra [*Candida albicans*] és 72 óra [*Aspergillus fumigatus*] statikus inkubáció).

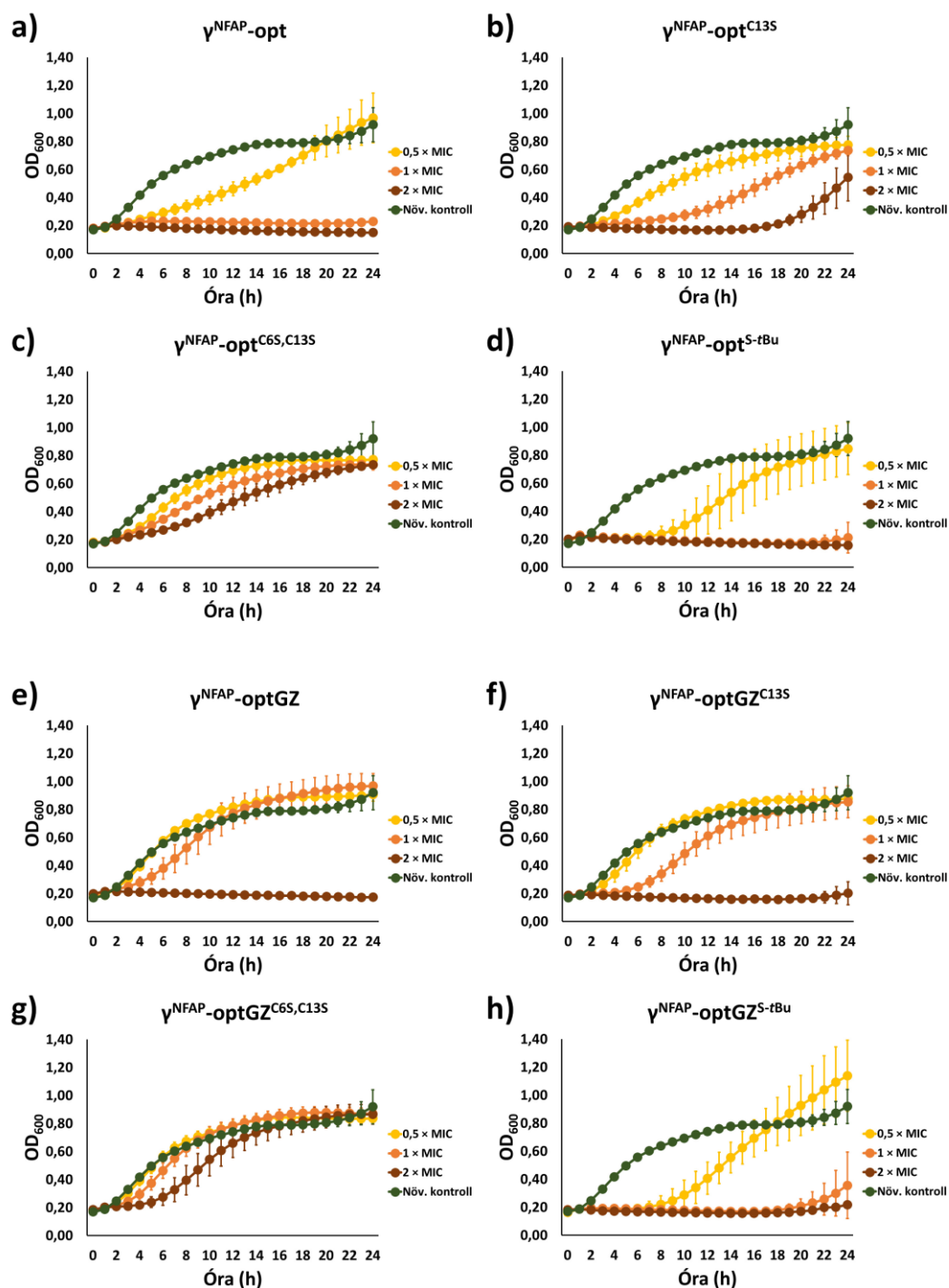
Peptid	MIC ($\mu\text{g/ml}$)			
	<i>A. fumigatus</i> CBS 101355		<i>C. albicans</i> SC5314	
	-20°C minta	4°C minta	-20°C minta	4°C minta
γ^{NFAP} -opt	>200	>200	12,5	25
γ^{NFAP} -opt ^{C13S}	>200	>200	50	50
γ^{NFAP} -opt ^{C6S,C13S}	>200	>200	50	50
γ^{NFAP} -opt ^{S-tBu}	25	25	50	50
γ^{NFAP} -optGZ	25	25	12,5	12,5
γ^{NFAP} -optGZ ^{C13S}	50	50	25	25
γ^{NFAP} -optGZ ^{C6S,C13S}	50	50	25	25
γ^{NFAP} -optGZ ^{S-tBu}	25	25	25	25

C13S és C6S,C13S: cisztein-szerin cserélt változatok, S-tBU: S-*terc*-butilált változat. Váradí és mtsai. (2024) alapján. A táblázat kettő vagy három független kísérletből (kísérletenként n=2) származó eredmények értékét tünteti fel.

Az *A. fumigatus*-szal elért eredményeink valamilyen mértékben ellentmondtak a *C. herbarum*-mal elért korábbi megfigyelésünknek (7.6.2. fejezet), amely szerint egy γ -core régió alapján tervezett peptid akkor rendelkezik gombaellenes hatással, ha jelentős pozitív összöltéssel bír, és a hidrofóbicitás nem játszik ebben szerepet. Ugyanis a γ^{NFAP} -opt peptid változatok ugyanakkora összöltéssel rendelkeznek, mint a γ^{NFAP} -optGZ peptidek, viszont ez utóbbiak kevésbé hidrofílek (**19. Táblázat**) és mégis gátolták az *A. fumigatus* CBS 101355 növekedését (**20. Táblázat**). Az is érdekes, hogy az *S*-terc-butiláció (ami jelentős mértékben növeli a hidrofóbicitást) hatékonyra tette a γ^{NFAP} -opt peptidet ezzel a gombával szemben, és nem befolyásolta a γ^{NFAP} -optGZ hatékonyságát (**20. Táblázat**). Ezek alapján úgy tűnik, hogy a γ -core peptidek antifungális aktivitása és hidrofóbicitása között nincsen általános összefüggés és az nagymértékben inkább függ a vizsgálatba bevont gombafajtól nem úgy, mint az antibakteriális hatással rendelkező peptidek esetében, ahol a hidrofóbicitás növelése emeli a membránpermeabilizációs hatékonyságot (Kumar és mtsai. 2018).

A cisztein-szerin cserélt γ -core peptid változatokkal elért eredményeink alapján a diszulfid-híd képzés és az ez általi szerkezet stabilizáció nem szükséges az antifungális hatás kifejtéséhez, habár a megfigyelt MIC értékek alapján ez a hatékonyságot csökkentheti (**20. Táblázat**). Cisztein-szerin cserélt antibakteriális hatású peptideknél is hasonló jelenséget figyeltek meg Gram-negatív baktériumokkal és élesztőgombákkal szemben (Pál és mtsai. 2006, Imamura és mtsai. 2008). Viszont ez az aminosavcsere növelte vagy egyáltalán nem befolyásolta az antibakteriális hatékonyságot Gram-pozitív fajokkal szemben (Pál és mtsai. 2006, Imamura és mtsai. 2008, Björn és mtsai. 2012, O' Connor és mtsai. 2018).

C. albicans SC5314 izolátummal a γ -core peptidek jelenlétében felvett ölési görbék részletesebb betekintést engedtek abba, hogy időben hogyan is befolyásolták a cisztein módosítások az antifungális hatékonyságot (**21. Ábra**). Ezek alapján megerősítést nyert az, hogy a ciszteinek jelenléte szükséges a nagyobb mértékű antifungális hatáshoz (**21a-c.** és **e-g. Ábra**), viszont valamilyen mértékben ellentmondott az *S*-terc-butilált változattal a MIC meghatározása során elért eredményünknek (**20. Táblázat**). Ugyanis, az ölési görbék alapján az *S*-terc-butiláció rövid időtávon belül hatékonyabbá tette a peptidet *C. albicans* SC5314-gyel szemben, habár bizonyos idő után ezen a nagyobb ölési hatékonyságon a gomba túl tudott lépni (**21a,d,e,h. Ábra**). Hasonló jelenséget *S*-terc-butilált antibakteriális hatású peptideknél is megfigyeltek már korábban (Imamura és mtsai. 2008).



21. Ábra. A hatékonynak bizonyult *Neosartorya fischeri* antifungális protein (NFAP) γ -core peptid-származékok és cisztein módosított változatainak (γ^{NFAP} -opt: **a – d**, γ^{NFAP} -optGZ: **e – h**) idő-ölés görbéi eltérő minimális gátló koncentráció (MIC, *minimum inhibitory concentration*) értékeken *Candida albicans* SC5314 mid-log fázisú sejtekkel ($\text{OD}_{600}=0,2$) szemben, alacsony ionerősségű tápközegben (LCM, *low cationic medium*) 24 óra alatt, 30°C-on, statikus inkubáció során. A cisztein-szerin cserék (C13S és C6S,C13S) rontják az ölési hatékonyságot, míg az S-*terc*-butiláció (S-tBu) rövidtávon emeli azt. A diagramok két független kísérletből (kísérletenként $n = 3$) származó eredmények átlagértékét tüntetik fel szórással együtt. Váradi és mtsai. (2024) alapján.

Annak ellenére, hogy az oxidatív körülmények közötti tárolás nem befolyásolta lényegesen gombaellenes hatékonyságot (**20. Táblázat**), az NFAP γ -core régiója alapján tervezett peptidek jelentős szerkezeti átrendeződésen mentek át a különböző tárolási körülmények után felvett RP-HPLC elúciós profiljaik szerint (**5-7. Mellékletek**). Már a -20°C -on tárolt γ^{NFAP} peptid esetében is megfigyelhető volt kis mennyiségű ciklikus és dimer forma jelenléte, amik mennyisége az oxidatív körülmények közötti tárolás közben jelentősen megemelkedett. A cisztein-szerin csere és az *S-terc*-butiláció következtében a peptid megőrizte a szerkezeti integritását, csak a lineáris forma jelenléte volt megfigyelhető (**5. Melléklet**). Hasonló jelenség volt észlelhető a γ^{NFAP} -optGZ esetében is, habár itt a cisztein módosításon nem átesett peptid teljes mennyisége ciklizálódott az oxidatív körülményeknek történő kitettség után (**7. Melléklet**). A γ^{NFAP} -opt peptid jelentős mennyisége a -20°C -on történő tárolás után ciklizálódott és már csak ez a forma volt jelen oxidatív körülmény között történő tárolás után (**6. Melléklet**). A C13S csere ennél a peptidnél nem segítette a lineáris forma megtartását, ugyanis a -20°C -os mintában is megfigyelhető volt dimer forma jelenléte és a peptid mennyiségének körülbelül a fele dimerizálódott oxidatív körülmények között (**6. Melléklet**). A C13S, C6S és az *S-terc*-butilált változatoknál csak a lineáris forma volt jelen (**6. Melléklet**).

Minegyik NFAP γ -core peptid rendezetlen szerkezetűnek mutatkozott különböző tárolási körülmények után felvett ECD spektrumaik alapján (**8. Melléklet**). Kismértékű intenzitásbeli különbségek megfigyelhetők voltak az oxidatív körülményeknek történő kitettség után elsősorban a γ^{NFAP} és a γ^{NFAP} -opt és cisztein módosított származékaik esetében, aminek a szerkezetbeli átrendeződés vagy a peptidek lebomlása lehet az oka. A γ^{NFAP} -optGZ esetében kismértékű helikális hozzájárulás volt megfigyelhető az ECD spektrumban, ami a C13S és az *S-terc*-butilált változatok esetében bizonyult a legjelentősebbnek és intenzitásuk az oxidatív körülmények közötti tárolás során emelkedett (**8. Melléklet**).

Az RP-HPLC és az ECD analízisek eredményei alapján összességében elmondható volt, hogy a lineáris, szabad szulfhidril-csoportot tartalmazó γ -core peptidek már oxidatív körülményeknek rövid ideig tartó kitettség után is képesek voltak dimerizálódni és ciklizálódni, amit a mindkét cisztein szerinre történő cseréje vagy azok *S-terc*-butilációja képes volt megakadályozni. Ezek a módosítások, segítették a szerkezeti integritás megtartását (**5-7. Mellékletek**), de nem csökkentették lényegesen az antifungális hatékonyságot (**20. Táblázat**) (Váradi és mtsai. 2024).

7.7. A *Neosartorya fischeri* antifungális proteinek toxicitása növényeken és állatokon

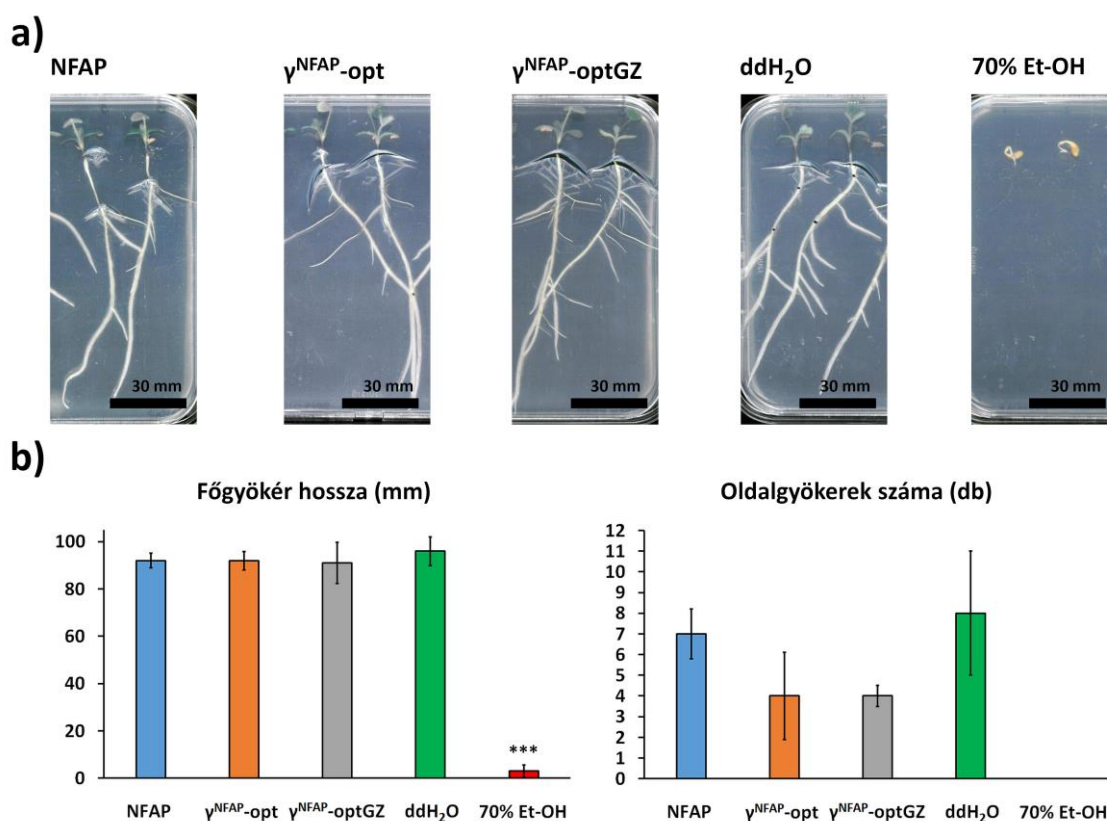
Annak ellenére, hogy számos antifungális hatással rendelkező természetes eredetű vagy szintetikus peptidről bebizonyosodott, hogy biztonságosan alkalmazható lehet növényvédelmi vagy gyógyászati célokra, néhány azonban valamilyen károsító hatással rendelkezhet állati vagy növényi sejteken (Ciociola és mtsai. 2016, Rautenbach és mtsai. 2016, Li és mtsai. 2021b, 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. Ezt figyelembe véve vizsgáltuk ezeknek a fehérjéknek és peptideknek a csírázó növény növekedésére gyakorolt hatását és a növényi sejtmembránroncsoló aktivitását; vörösvértesteken, emlős sejtvonalakon, szövetmodellen és állatokon pedig az azokra gyakorolt citotoxikus és sejtmembránt károsító hatásukat.

7.7.1. Toxicitásvizsgálatok növényeken

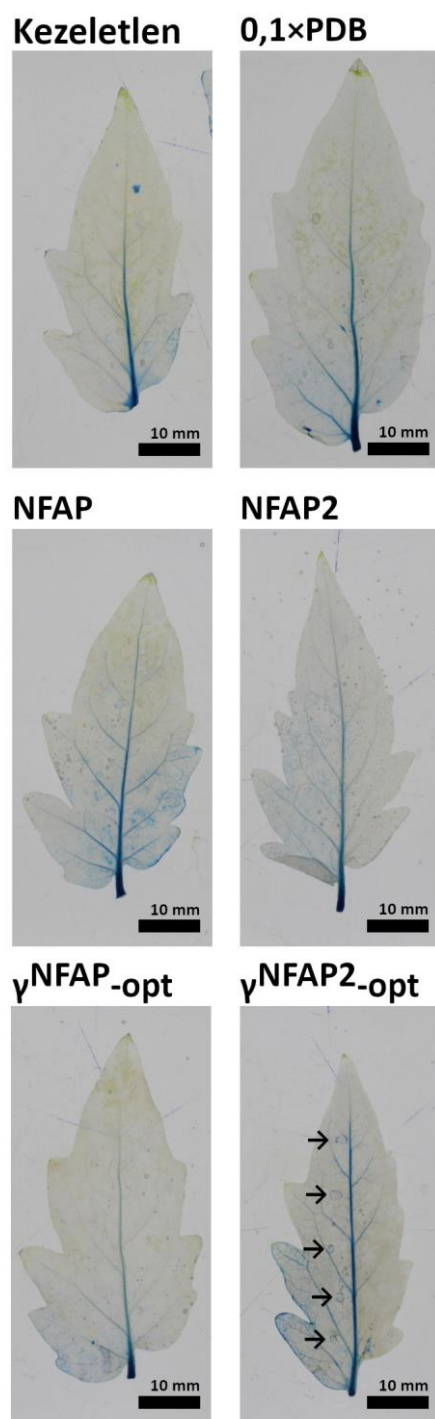
A *Medicago truncatula* A-17 egy laboratóriumi körülmények között, Petri-csészében is könnyen tenyészthető növény és kiválóan alkalmas különböző vegyületek növény fejlődését befolyásoló hatásának a vizsgálatára (Barker és mtsai. 2006). Az NFAP és az antifungálisan hatékony γ^{NFAP} -opt és γ^{NFAP} -optGZ peptid-származékok 400 $\mu\text{g/ml}$, illetve 25-25 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációjú oldatával, 10 napon át történő gyökércsúcs kezelést követően sem volt megfigyelhető morfológiai elváltozás a fejlődő *M. truncatula* A-17 növényen (**22a. Ábra**). Ezen felül nem volt szignifikáns különbség a főgyökér hosszában (NFAP: 92 ± 3 mm, γ^{NFAP} -opt: 92 ± 4 mm, γ^{NFAP} -optGZ: 91 ± 9 mm) és az oldalgyökerek számában (NFAP: 7 ± 1 db, γ^{NFAP} -opt: 4 ± 2 db, γ^{NFAP} -optGZ: 4 ± 1 db) a kezeletlen kontrollhoz (96 ± 6 mm, illetve 8 ± 3 db) viszonyítva (**22b. Ábra**) (Tóth és mtsai. 2020a).

Az NFAP, NFAP2 és a γ^{NFAP} -opt, γ^{NFAP2} -opt peptidek növényi sejtmembránroncsoló hatását intakt paradicsomnövények levelén vizsgáltuk Evan's kék festési módszerrel, amely a klorofill színének eltávolítása után kék színűre festi a sejtmembrán roncsolódása következtében elhalt szöveti részeket. Eredményeink alapján a paradicsomnövény levél abaxiális levélepidermiszének főerei közé felvitt fehérje és peptid oldat cseppek közül csak a γ^{NFAP2} -opt mutatott enyhe sejtmembrán károsító hatást a *B. cinerea* SZMC 21472 izolátummal szemben mutatott MIC értékének kétszeresénél (400 $\mu\text{g/ml}$) (**23. Ábra**) (Tóth és mtsai. 2022).

Ezen eredmények alapján azt a következtetést vontuk le, hogy mindkét antifungális protein és az NFAP γ -core peptid-származékok biztonságosan alkalmazhatóak lehetnek a növény vagy termésének védelmére. Hasonló tesztek során egy másik tanulmányunkban szintén biztonságosan alkalmazhatónak bizonyult a *P. chrysogenum* PAF, ennek az antifungális hatékonyság és spektrum szélesítése céljából létrehozott γ -core módosított változata (PAF^{opt}) és ez utóbbi motívumot lefedő szintetikus peptid-származék (P γ ^{opt}) is (Tóth és mtsai. 2020b).



22. Ábra. A fejlődő *Medicago truncatula* A-17 növény **a)** morfológiája, **b)** főgyökér hossza és oldalgökök száma 10 napon át tartó 400 μ g/ml *Neosartorya fischeri* antifungális proteinnel (NFAP), illetve 25 μ g/ml γ -core peptid-származékaival ($\gamma^{NFAP-opt}$ - és $\gamma^{NFAP-optGZ}$) történő kezelést (20 μ l/nap) követően 23°C-on, 60% páratartalom és a gyökér feletti rész folyamatos megvilágítása (1200 lux) mellett. Az NFAP-val, a $\gamma^{NFAP-opt}$ - és $\gamma^{NFAP-optGZ}$ peptidekkel történő kezelést követően nem volt szemmel megfigyelhető morfológiai elváltozás a fejlődő növényen, továbbá a főgyökér hossza és a mellékgökök száma sem különbözött szignifikánsan a desztillált vízzel kezelt kontrollhoz viszonyítva. Ezzel szemben az ölési kontrollként használt 70%-os etanollal történő kezelés hatására a növény elpusztult, oldalgökökerek nem képzett. ***: $p < 0,0001$ - szignifikáns különbség (Levene-teszt, páros t-próba). A **b)** paneleken látható diagramok két független kísérletből (kísérletenként $n=12$) származó eredmények átlagértékét tüntetik fel szórással együtt.



23. Ábra. Intakt paradicsomnövény leveleinek Evan's kék festése az abaxiális levélepidermisz főerei közé öt pontban (10 μ l) felvitt *Neosartorya fischeri* antifungális proteinek, NFAP (12,5 μ g/ml), NFAP2 (100 μ g/ml), és γ -core peptid-származékok, γ^{NFAP} -opt és γ^{NFAP2} -opt (400 μ g/ml) oldatcseppjeivel történő kezelését követően 3 hét, 23°C-on, 60% páratartalom és 12-12 óra fény-sötét ciklus (1200 lux) inkubáció után. Csak a γ^{NFAP2} -opt-tal történő kezelést követően volt megfigyelhető a sejtmembránroncsoló hatást jelző kék színváltozás a felcseppentés helyén, amit a fekete nyilak jelölnek.

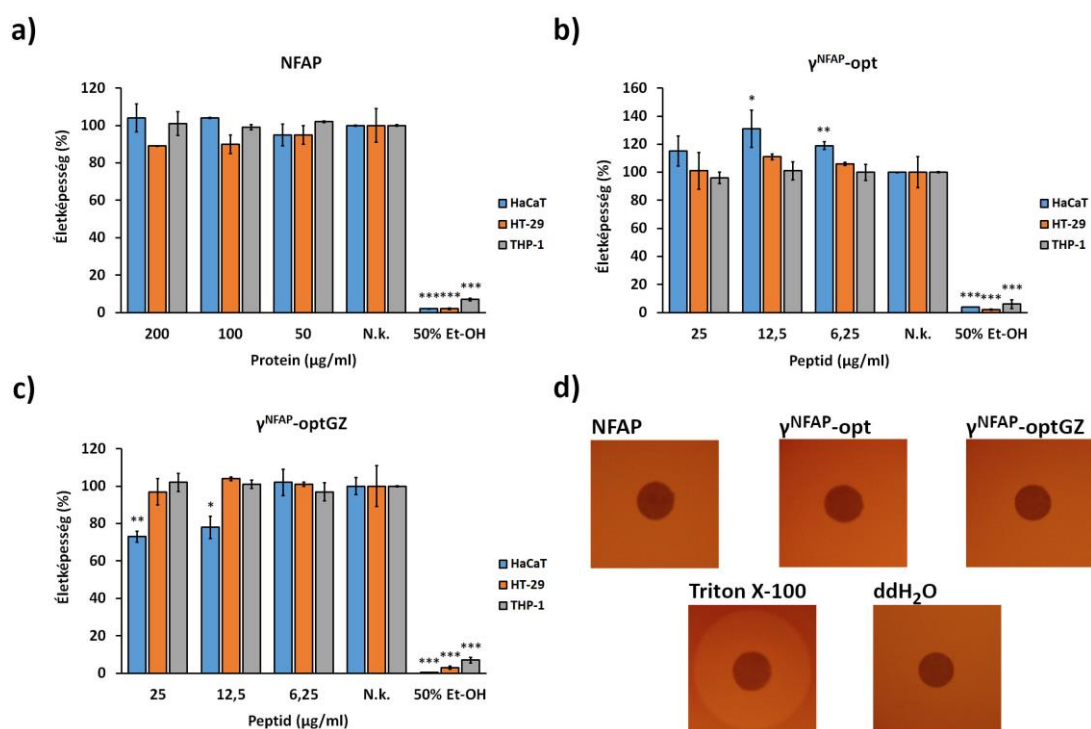
7.7.2. Toxicitásvizsgálatok emlős sejteken, szövetmodellen és állaton

Biztonságos gyakorlati alkalmazhatóságuk előrejelzése céljából, munkánk során vizsgáltuk az NFAP, NFAP2 és γ -core peptid-származékaik károsító hatásait emlős sejtvonalakon (Kovács és mtsai. 2019, Tóth és mtsai. 2020a), háromdimenziós szövetmodellen (Holzknecht és mtsai. 2022) és *Galleria mellonella* állatmodellrendszerben (Váradí és mtsai. 2024).

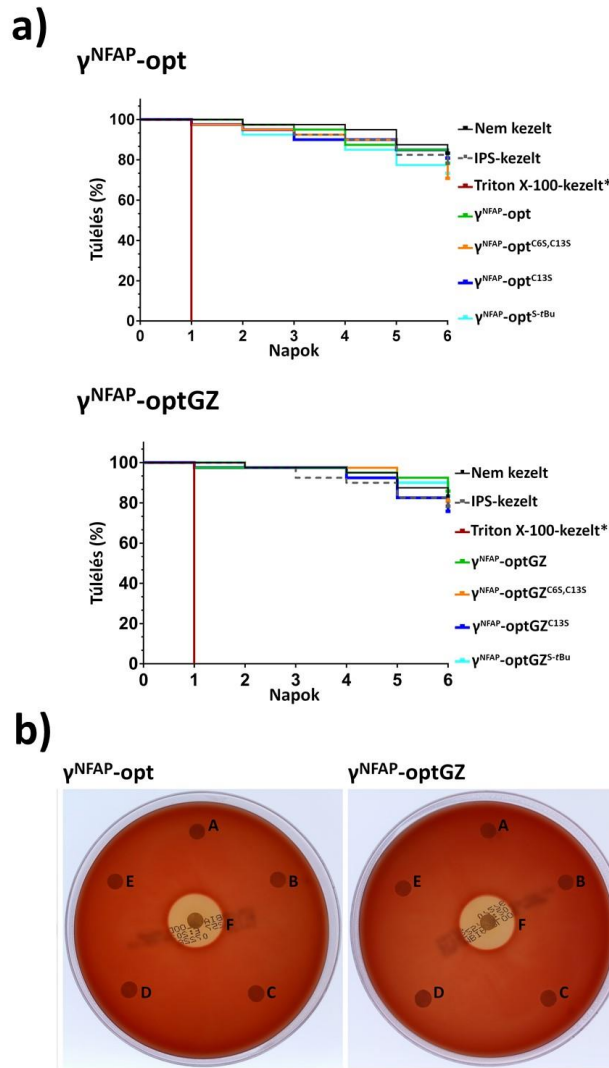
Amennyiben az NFAP és az γ -core motívuma alapján tervezett antifungálisan aktív szintetikus peptid-származékokat biofungicidként szeretnénk felhasználni, akkor a növényi toxicitás teszteken túl érdemes megvizsgálni azt is, hogy kiválthatnak-e valamilyen károsító hatást olyan sejttípusokon az emberi/állati szervezetben, amelyek közvetlen kontaktusba kerülhetnek velük a fehérje- vagy peptid-kezelt mezőgazdasági termék fogyasztása esetén. Ilyenek sejttípusok lehetnek a keratinociták és a bélhámsejtek. Az előbbieket az epidermisz fő sejttípusa, az utóbbiak pedig szerepet játszanak a tápanyagok felszívásában, továbbá nagymértékben hozzájárulnak a veleszületett és az adaptív immunválaszok kialakulásához. Monocitákat szintén bevontunk a vizsgálatokba, amik, mint a szervezet fontos immunsejtjeiként a fertőző mikroorganizmusok vagy sejtkárosító molekulákkal szembeni védelemben játszanak szerepet. Ezeken a sejtvonalakon elvégzett metabolikus aktivitásmérésén alapuló életképességi vizsgálatok azt mutatták, hogy az NFAP és a γ^{NFAP} -opt *C. herbarum* FSU 1148 izolátummal szemben mutatott MIC értékének a kétszere (200 $\mu\text{g/ml}$, illetve 25 $\mu\text{g/ml}$) sem befolyásolja a sejtek életképességét (**24a-b. Ábra**), ellenben a γ^{NFAP} -optGZ-vel, ami ennél a koncentrációnál (25 $\mu\text{g/ml}$) és a MIC értéken (12,5 $\mu\text{g/ml}$) már szignifikánsan csökkentette a monociták életképességét ($73\pm3\%$, illetve $78\pm6\%$) a kezeletlen kontrollhoz ($100\pm5\%$) viszonyítva (**24c. Ábra**). Érdekes módon a 12,5 $\mu\text{g/ml}$, továbbá a 6,25 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációjú γ^{NFAP} -opt pedig szignifikánsan növelte a keratinociták metabolikus aktivitását, és azt $131\pm13\%$, illetve $119\pm3\%$ -ra növelte a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva ($100\pm0\%$) (**24b. Ábra**). Véres agarlemezen elvégzett hemolízis tesztek azt mutatták, hogy sem az NFAP sem az antifungálisan aktív γ -core peptid-származékai nem ronsolják a vörösvértestek membránját (**24d. Ábra**) (Tóth és mtsai. 2020a).

A nagy viaszmolylárván (*G. mellonella*) alapuló állatmodellrendszer kitűnően alkalmas lehet arra, hogy előre jelezzük egyes molekulák lehetséges toxikus hatását az állati szervezet egészére nézve (Ignasiak és Maxwell 2017). Az antifungálisan aktív NFAP γ -core peptid-származékok és azok cisztein módosított változatai (**17-20.**

Táblázatok) még a MIC értékük többszörösénél (200 µg/ml) sem okozták a lárvák szignifikáns elhullását az azokba történő injekciózást követő 6. napon (**25a. Ábra.**). A cisztein módosított antifungálisan aktív NFAP γ -core peptid-származékok (C13S, C6S, C13S és S-*t*Bu változatok) (**19-20. Táblázatok**) egyike sem okozta a vörösvértestek hemolízisét véres agarlemezen (**25b. Ábra.**) (Váradi és mtsai. 2024).



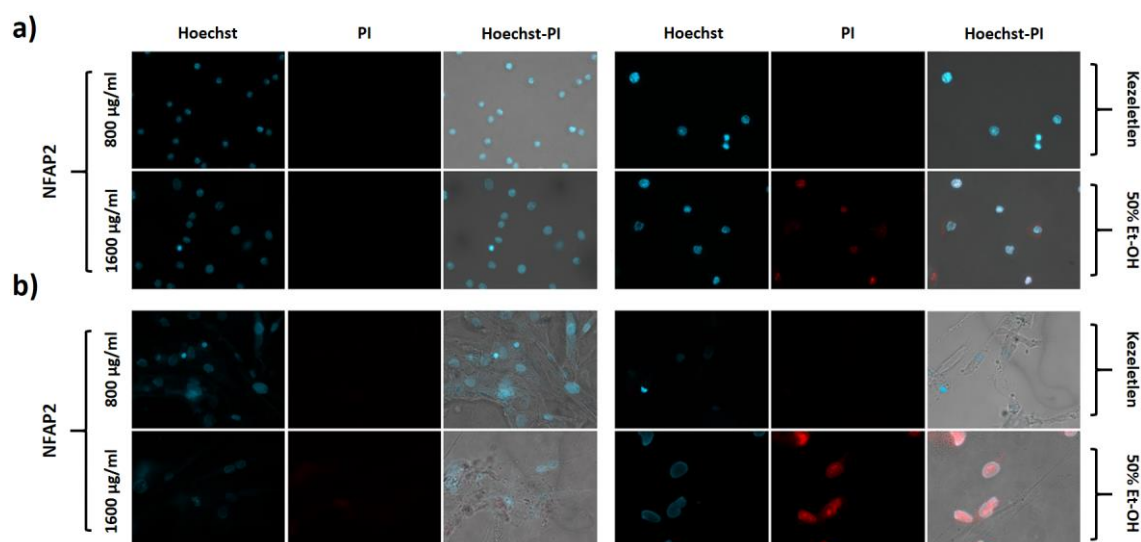
24. Ábra. Humán HaCaT keratinocita (kék), HT-29 bélhámsejt (narancssárga) és THP-1 monocita (szürke) sejtvonalak életképessége *CCK8 Cell Proliferation and Cytotoxicity Assay Kit*-tel (Dojindo Molecular Technologies Inc.; Rockville, MD, USA) végzett spektrofotometriás (OD₄₅₀) metabolikus aktivitás mérések alapján az **a)** *Neosartorya fischeri* antifungális protein (NFAP) és γ -core peptid-származékok, **b)** γ^{NFAP} -opt és **c)** γ^{NFAP} -optGZ eltérő koncentrációinak a jelenlétében 24 óra, 37°C, 5% CO₂ jelenlétében történő inkubációt követően a kezeletlen kontrollal (N.k.) összehasonlításban. Ölési kontrollként a sejtek 10 percig tartó etanol-kezelésen (50% Et-OH, V/V%) estek át. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,005$, ***: $p < 0,0001$ - szignifikáns különbség (Levene-teszt, páros t-próba). Az eredmények alapján a γ^{NFAP} -opt kis mértékben növeli, míg a γ^{NFAP} -optGZ kis mértékben csökkenti a keratinociták életképességét, míg más kezelések más sejt típusokét nem befolyásolják. **d)** Szűrőpapír korongra felvitt vizes oldatú NFAP (40 µg) és antifungálisan aktív γ -core peptid-származékainak (25 µg/ml γ^{NFAP} -opt és γ^{NFAP} -optGZ) hemolitikus aktivitása juhvéres agarlemezen (*Columbia Blood Agar*) 24 óra 37°C-on történt inkubációt követően a vízzel és a 20% (V/V) Triton X-100-zal kezelt mintákkal összehasonlításban. Az eredmények alapján egyik NFAP γ -core peptid-származék sem okozta a vörösvértestek hemolízisét, míg a pozitív kontrollként alkalmazott Triton X-100-kezelés igen. Az **a) - c)** paneleken látható diagramok két független kísérletből (kísérletenként $n=3$) származó eredmények átlagértékét tünteti fel szórással együtt. Tóth és mtsai. (2020a) alapján.



25. Ábra. a) *Galleria mellonella* lárvák túlélése százalékban kifejezve $\gamma^{\text{NFAP-opt}}$ és $\gamma^{\text{NFAP-optGZ}}$ és cisztein módosított (C13S, C6S,C13S, S-tBu) változataikkal történő kezelést (20 μl , 200 $\mu\text{g/ml}$, rovar fiziológias sóoldatban [IPS, *insect physiological saline*] oldva) követően, a kezeltlen, az IPS-sel és a 20% (V/V%) Triton X-100-zal kezelt kontrollokkal összehasonlításban 6 nap, 37°C-on történő inkubáció után. *: $p < 0,05$ - szignifikáns különbség (Mantel-Cox és Gehan-Breslow-Wilcoxon tesztek). Az eredmények alapján egyik NFAP γ -core peptiddel történő kezelés sem okozta az állatok szignifikáns elhullását, míg az ölési kontrollként alkalmazott Triton X-100-kezelés igen. **b)** Szűrőpapír korongra felvitt vizes oldatú $\gamma^{\text{NFAP-opt}}$ és $\gamma^{\text{NFAP-optGZ}}$ (10 μg) peptidek hemolitikus aktivitása juhvörös agarlemezen (*Columbia Blood Agar*) 24 óra 37°C-on történő inkubációt követően a vízzel és a 20% (V/V%) Triton X-100-zal összehasonlításban. **A:** ddH₂O; **B:** módosítástalan peptid, **C:** C13S változat, **D:** C6S,C13S változat, **E:** S-*terc*-butilált változat, **F:** Triton X-100 (20% [V/V%]). Az eredmények alapján egyik NFAP γ -core sem okozta a vörösvértestek hemolízisét, míg a pozitív kontrollként alkalmazott Triton X-100-kezelés igen. Az **a)** panelen látható diagramok két független kísérletből (kísérletenként $n=20$) származó eredmények átlagértékét tüntetik fel. Váradi és mtsai. (2024) alapján.

Mivel az NFAP2 alkalmazását elsősorban felszíni gombafertőzések kezelésében képeltük el (Galgóczy és mtsai. 2019), ezért vizsgáltuk a keratinociták és dermális fibroblaszt sejtek életképességét a fehérje jelenlétében (Kovács és mtsai. 2019), továbbá lehetséges károsító hatását háromdimenziós bőrmodellen (Holzknecht és mtsai. 2022).

A keratinociták az epidermiszt alkotó fő sejtípusok, a dermális fibroblasztok pedig az extracelluláris mátrix és a kollagén termelésért felelősek. Emiatt fontos szerepük van a szöveti összetartás kialakításában. PI- és Hoechst-festési eljárások kombinált alkalmazásával megállapítottuk, hogy még az RPMI-1640-ben egy flukonazol-rezisztens *C. albicans* 27700 izolátummal szemben mutatott MIC érték kétszerese, az 1600 µg/ml NFAP2 koncentráció sem okozza ezeknek a sejtípusoknak az elhalását (**26. Ábra**) (Kovács és mtsai. 2019). Ezen eredmények alapján valószínűsítettük, hogy az NFAP2 magát a kültakarót sem károsítja topikális alkalmazás esetén, amit egy háromdimenziós bőrmodellen bizonyítottunk (Holzknecht és mtsai. 2022).

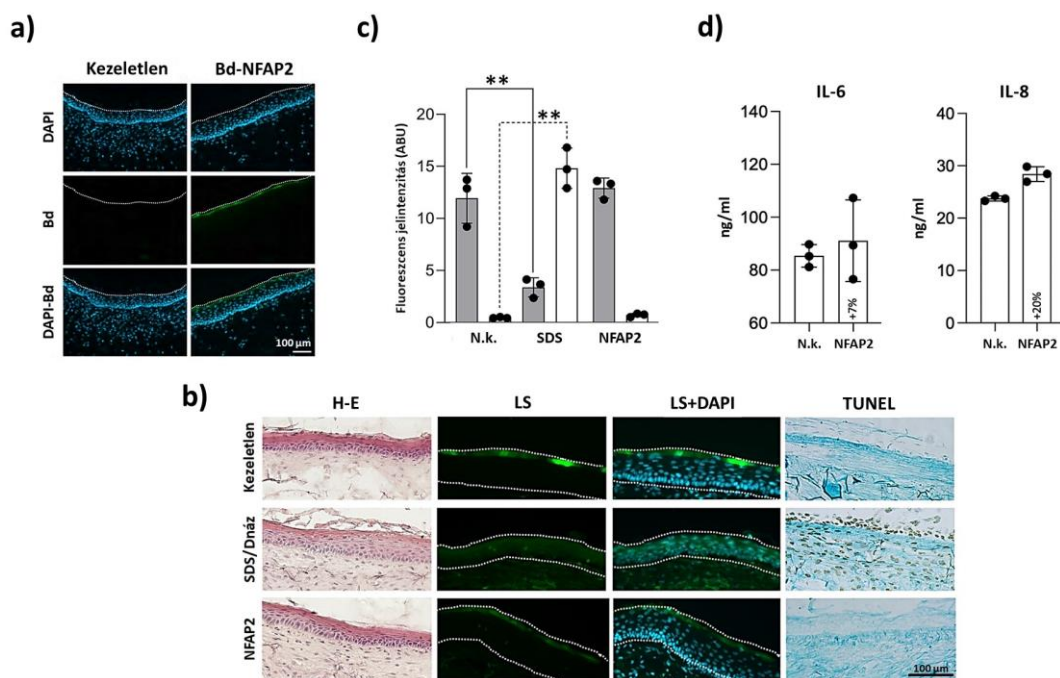


26. Ábra. A *Neosartorya fischeri* antifungális protein 2 (NFAP2) *in vitro* citotoxikus hatása **a)** humán keratinocitákon és **b)** dermális fibroblaszt sejteken 24 óra, 37°C, 5% CO₂ jelenlétében történő inkubáció után CnT-BM (*CellInTec basal medium*), illetve R-10 tápközegben. Kombinált Hoechst-propídium (PI)-jodid festési eljárás alapján sem a 800 µg/ml, sem a 1600 µg/ml koncentrációjú NFAP2 nem okozta a sejtek elhalását (piros fluoreszcencia), míg az ölési kontrollként alkalmazott 50% (V/V%) etanol (50% Et-OH) igen. Kovács és mtsai. (2019) alapján.

A kereskedelmi forgalomban elérhető patofiziológiai és farmakológiai kutatások szempontjából megbízhatóan alkalmazható háromdimenziós bőrmodellek (Neupane és mtsai. 2020, Pfuhler és mtsai. 2021). Már számos tanulmány bizonyította ezek alkalmazhatóságát felszíni gombafertőzések vizsgálatában és új topikális gombaellenes

molekulák toxicitásának és hatékonyságának a tesztelésében (Kühbacher és mtsai. 2017, Fink és mtsai. 2022, Merk és mtsai. 2022). Egy lényeges szempont az, hogy a háromdimenziós bőrmodellek alkalmazása ilyen jellegű vizsgálatokban összhangban áll az ún. 3R alapelvvel, ami az angol *replacement* (helyettesítés), *reduction* (csökkentés) és *refinement* (tökéletesítés) szavakból eredeztethető. A 3R alapelv alapján, amennyiben lehetőség adódik, akkor ne alkalmazzunk állatkísérleteket, viszont amennyiben szükséges akkor csak a tudományos kérdés megválaszolásához szükséges lehető legkevesebb állatot használjuk úgy, hogy azokat a lehető legkevesebb szenvedés érje (Tannenbaum és Bennett 2015). A *P. chrysogenum*-eredetű PAF^{opt}, PAFB és PAFC antifungális proteinekhez hasonlóan az NFAP2 is jó penetrációs tulajdonságokkal rendelkezett a *stratum corneum*-ba (27a. Ábra). Hematoxin-eozin (H-E) festés alapján az NFAP2 ezekhez hasonlóan szintén nem ronsolta a modellt, és nem okozott morfológiai és vastagság változást az egyes rétegekben (27b. Ábra). Lucifer sárga CH (LS)-festéssel történő vizsgálatok alapján nem sértette az epidermális permeabilitás gát működését sem (27b. Ábra), ui. az NFAP2 kezelés hatására az LS festék csak a *stratum corneum*-ban halmozódott fel (27c. Ábra). TUNEL-festés (*TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling*) alapján az NFAP2 nem indukált programozott sejthalált a szövetmodellben (27b. Ábra), és nem okozta proinflammatorikus citokinek (interleukin, IL-6 és IL-8) szekréciójának a szignifikáns megváltozását a PAF^{opt}-hoz és PAFC-hez hasonlóan (27d. Ábra) (Holzknecht és mtsai. 2022).

A fent ismertetett eredmények alapján azt a következtetést vontuk le, hogy az NFAP2, az ugyanebben a tesztrendszerben vizsgált *Eurotium*-eredetű AFP-khez (PAF^{opt}, PAFB, PAFC) hasonlóan biztonságosan alkalmazható lehet felszíni mikózisok kezelésében, ugyanis vizes oldatban is kiváló penetrációs tulajdonságokkal rendelkezett és nem károsította a kültakarót (Holzknecht és mtsai. 2022). Más tanulmányok is hasonló eredményre jutottak természetes (Do és mtsai. 2014), vagy szintetikus antimikrobiális hatással rendelkező peptidek esetében (Xu és mtsai. 2023), amelyek szintén jó penetrációs tulajdonságokkal rendelkezhetnek az epidermiszben és nem toxikusak a keratinocitákkal (Do és mtsai. 2014), illetve dermális fibroblasztokkal szemben (Xu és mtsai. 2023), sugallva ezzel biztonságos topikális alkalmazhatóságukat a felhámot érintő mikrobiális fertőzések kezelésében.



27. Ábra. a) Vízben oldott BODIPY (boron-dipirrometén)-jelölt *Neosartorya fischeri* antifungális protein 2 (Bd-NFAP2: 25 μl, 6,4 mg/ml) penetrációja háromdimenziós bőrmódelben 24 óra, 32°C, 5% CO₂ jelenlétében és sötétben történő inkubáció után. A zöld fluoreszcens jel a Bd-NFAP2 jelenlétére utal a *stratum corneum*-ban. DAPI: Sejtmagok festése 4',6-diamidin-2-fenilindollal (kék fluoreszcencia). **b)** NFAP2-kezelés (25 μl, 6,4 mg/ml vizes oldat) hatásának a vizsgálata a háromdimenziós bőrmódel morfológiájára (H-E: hematoxinil-eozin festés), az epidermális permeabilitás gát működésére (LS és LS+DAPI: lucifer sárga CH-festés, illetve lucifer sárga + DAPI-festés kombináció), és életképességére (TUNEL-festés, *TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling*) 24 óra, 37°C, 5% CO₂ jelenlétében történő inkubációt követően a kezeletlen, a dodecil-szulfát nátrium sóval (SDS) és DNázal kezelt mintákkal (SDS/DNáz) összehasonlításban. Az LS (200 μl, 1 mg/ml)-kezelés két óra hosszáig történt az inkubáció után hasonló körülmények között sötétben, míg az 1% SDS- (m/V%) és a DNáz (1U) kezelés 60 percig. Ez utóbbiak szolgáltak toxicitás kontrollként a H-E- és az LS(+DAPI)-, illetve a TUNEL-festések számára. A H-E-festés eredményei alapján az NFAP2-kezelés nem ronsolja a felső epidermisz réteget ellentétben az SDS-sel. Az LS (zöld fluoreszcencia) felhalmozódása csak a *stratum corneum*-ban figyelhető meg (LS és LS+DAPI), ami a permeabilitás gát működésének a sértetlenségére utal, szemben az SDS-kezelt mintával, ahol a festék a bőrmódel mélyebb élő epidermális rétegeiben is megjelenik. TUNEL-festés alapján nem figyelhetők meg apoptotikus sejtmagok (barna elszíneződés) az NFAP2-kezelt mintában, szemben az SDS-kezelttel. **c)** LS fluoreszcencia jelintenzitása a b)-ben kezelt szövetmódel mintáknak, ahol a szürke oszlopok a *stratum corneum*-ban mért zöld fluoreszcencia jelintenzitásokat, míg a fehér oszlopok az élő epidermális rétegekben mértetket mutatják. Az eredmények alapján az NFAP2-kezelés nem sérti a módel permeabilitás gátjának működését, mivel az NFAP2 kezelés utána az LS a kezeletlen mintához (N.k.) hasonlóan csak a *stratum corneum*-ban halmozódik fel, szemben az SDS-kezelt mintával, ahol a felhalmozódás a mélyebb, élő epidermális rétegekben is megfigyelhető. **: $p < 0,005$ - szignifikáns különbség (egyszempontos varianciaanalízis, Tukey-próba). **d)** A bőrmódel interleukin-6 (IL-6) és interleukin-8 (IL-8) termelőképesége NFAP2-kezelés (25 μl, 6,4 mg/ml vizes oldat) hatására a kezeletlen kontrollal összehasonlításban 24 óra, 32°C, 5% CO₂ jelenlétében történő inkubáció után. Az eredmények alapján az NFAP2 nem okoz szignifikáns változást egyik interleukin termelődésében sem. Az **c)** és **d)** paneleken látható diagramok három független kísérletből (kísérletenként $n=1$) származó eredmények átlagértékét tünteti fel szórással együtt. Holzknacht és mtsai. (2022) alapján.

7.8. A *Neosartorya fischeri* antifungális proteinek és peptid-származékaik gyakorlati alkalmazhatósága

Mivel az NFAP és a γ -core régiója alapján tervezett peptid-származékok elsősorban a növénypatogén fonalgombák ellen mutattak nagymértékű hatékonyságot és az NFAP2 pedig a humánpatogén élesztőgombákkal szemben (**11., 18., 20. Táblázatok**), ezért az előbbi gyakorlati alkalmazhatóságát a mezőgazdaságban a növénykórokozó fonalgombákkal szembeni védelemben, míg utóbbiét a gyógyászatban az élesztőgombák által okozott fertőzések kezelésére képzeltük el és végeztünk ilyen irányú laboratóriumi kísérleteket.

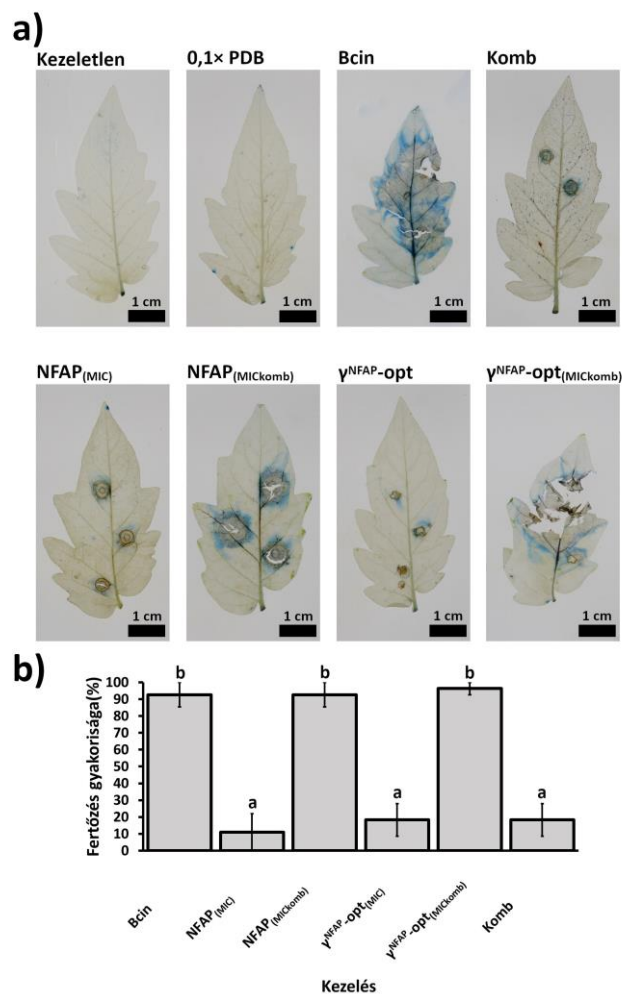
7.8.1. Az NFAP és γ -core peptid-származékok növény- és terményvédelmi alkalmazhatósága

Az NFAP és a γ -core peptid-származékok biológiai-eredetű fungicidként történő gyakorlati alkalmazhatóságát *B. cinerea* SZMC 21472 és *C. herbarum* FSU 1148 izolátumokkal szemben paradicsomnövényen vizsgáltuk laboratóriumi körülmények között. Az előbbi gomba 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). 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). Az utóbbi években nem csak Európa, hanem világszerte egyaránt nehézséget jelent a *B. cinerea* elleni 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 paradicsomnövény kitűnő modellszervezet a *B. cinerea* patogenitásának a nyomon követésére, és ehhez jól kidolgozott laboratóriumi módszerleírások elérhetők (Lian és mtsai. 2018). Mivel az NFAP és γ -core peptid-származékok nem bizonyultak toxikusnak az intakt paradicsomnövény levelén (**23. Ábra**), ezért mi is ezt a modellszervezetet választottuk növény- és terményvédelmi kísérleteinkhez.

Checkerboard-titrálás módszerével megállapítottuk, hogy az NFAP képes szinergista kölcsönhatásba lépni a γ^{NFAP} -opt peptiddel *B. cinerea* SZMC 21472 ellen *in vitro* (frakcionális gátló koncentráció index=0,28). A teljes növekedésgátlás eléréséhez kombinált alkalmazás során az NFAP 1,56 $\mu\text{g/ml}$, míg a γ^{NFAP} -opt 6,25 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációjára volt szükség szemben az egyedüli alkalmazásuk esetén mutatott 6,25 $\mu\text{g/ml}$, illetve a 200 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációkkal (Tóth és mtsai. 2022). Ezt az ígéretes kombinációt a növényvédelmi kísérleteinkbe is bevontuk.

Az NFAP, a γ^{NFAP} -opt és a kettő kombinációjának felületi szerként történő alkalmazhatóságát levágott paradicsomnövény levélen vizsgáltuk úgy, hogy fertőzéshez használt konídiumokat a fehérje/peptid jelenlétében vagy anélkül 0,1×PDB oldatban cseppentettük fel az abaxiális levélepidermisz főerei közé. Evan's kék festési kísérletek eredményei alapján a fehérje/peptid hiányában a *B. cinerea* SZMC 21472 képes volt kolonizálni a levelet és annak a szövetét jelentős mértékben roncsolni (28a. Ábra). Mind az NFAP, mind a γ^{NFAP} -opt a MIC értékén (6,25 $\mu\text{g/ml}$, illetve 200 $\mu\text{g/ml}$) ezt a folyamatot megakadályozta (28a. Ábra). Ezzel szemben a kombinációban alkalmazott MIC értéknél az NFAP (1,56 $\mu\text{g/ml}$) egyedül ezt csak mérsékelte, míg a γ^{NFAP} -opt (6,25 $\mu\text{g/ml}$) egyáltalán nem akadályozta meg (28a. Ábra). Az utóbbi koncentrációkkal történő kombinált alkalmazás esetén a fehérje és peptid önállóan mutatott MIC értéke során megfigyelt eredményhez hasonló volt elérhető, vagyis a *B. cinerea* nem kolonizálta a paradicsomnövény levelét (28a. Ábra). Statisztikai analízisek alapján a *B. cinerea* SZMC 21472 fertőzés kialakító képessége ($93\pm 7\%$ fertőzés kialakulás) szignifikánsan $11\pm 11\%$ és $18\pm 10\%$ -ra csökkent a MIC értékű NFAP (6,25 $\mu\text{g/ml}$) és γ^{NFAP} -opt (200 $\mu\text{g/ml}$) jelenlétében (28b. Ábra). A MIC érténél alacsonyabb, szinergista koncentrációk kombinált alkalmazása (1,25 $\mu\text{g/ml}$ és 6,25 $\mu\text{g/ml}$) esetében is megfigyelhető volt ez a szignifikáns csökkenés ($18\pm 10\%$) (28b. Ábra) (Tóth és mtsai. 2022), míg ha a fehérjét vagy a peptidet önállóan alkalmaztuk ezeken a koncentrációértékeken, akkor nem ($93\pm 7\%$, illetve $96\pm 4\%$) (28b. Ábra).

Megfigyeléseink összevethetők voltak egy másik munkánk eredményeivel, amely során az alkalmazott paradicsomnövény modellrendszerben laboratóriumi körülmények között bizonyítottuk a PAF alkalmazhatóságát *B. cinerea*-val szembeni védelemben. Ezzel szemben ennek a fehérjének korábban említett γ -core módosított változata (PAF^{opt}) és az ezen a régióan alapuló peptid-származék (Py^{opt}) fokozta a fertőzés intenzitását, habár önmagukban alkalmazva nem károsították a növényi szöveteket (Tóth és mtsai. 2020b).

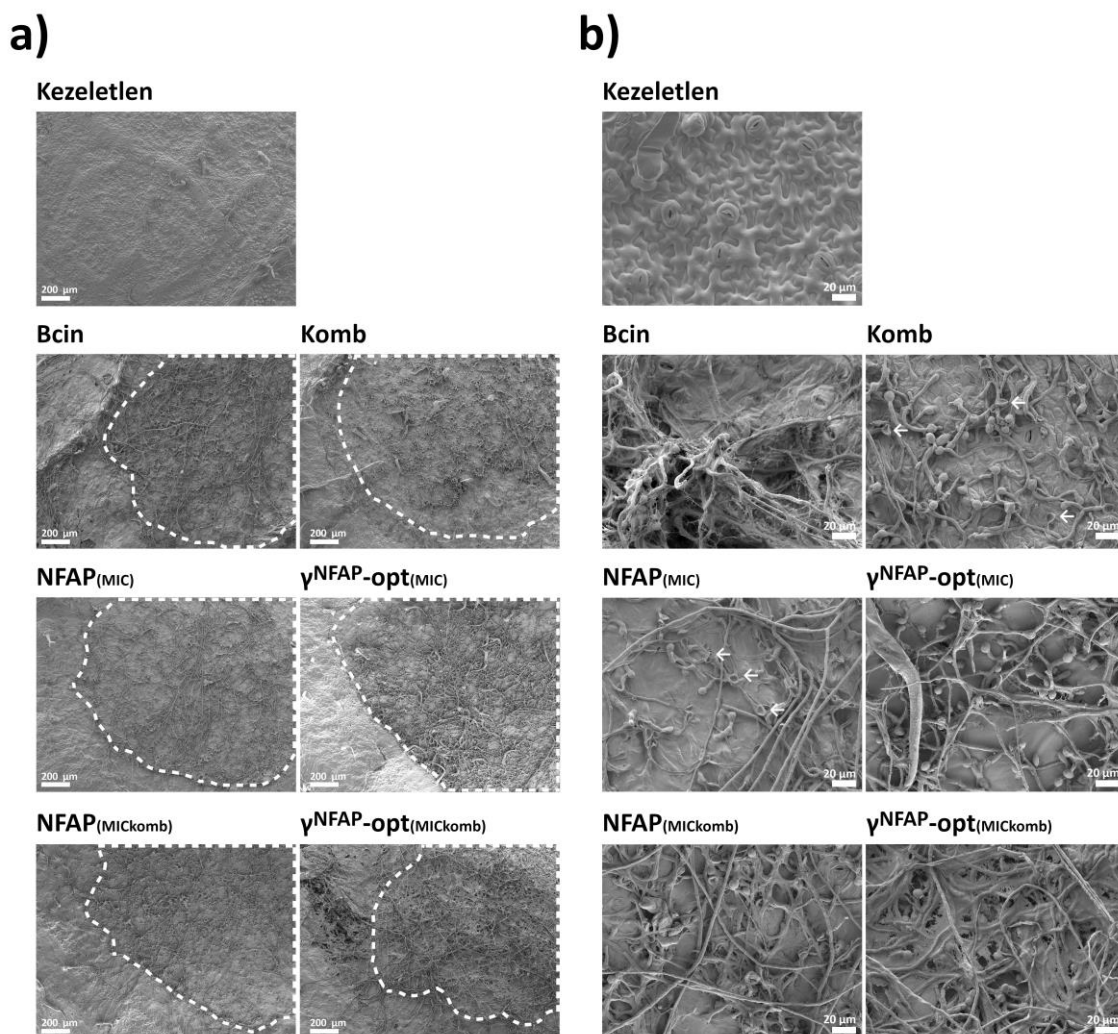


28. Ábra. a) Paradicsomnövény levágott leveleinek Evan's kék festése az abaxiális levélepidermisz főerei között három pontban felvitt *Botrytis cinerea* SZMC 21472 izolátummal történő fertőzést ($10 \mu\text{l}$, 1×10^7 konídium/ml, 10-szeresre hígított burgonyakivonat-glükóz tápközegben [$0,1 \times \text{PDB}$, *potato dextrose broth*] elkészítve) követően 4 nap 23°C -on, 60% páratartalom és 12-12 óra fény-sötét ciklus (1200 lux) inkubáció után a kezeletlen és a $0,1 \times \text{PDB}$ -vel kezelt kontrollokhoz viszonyítva. Bcin: fertőzött és nem kezelt, Komb: $1,56 \mu\text{g/ml}$ NFAP + $6,25 \mu\text{g/ml}$ γ^{NFAP} -opt kombinációval kezelt, NFAP_(MIC): $6,25 \mu\text{g/ml}$ *Neosartorya fischeri* antifungális protein (NFAP)-kezelt, NFAP_(MICkomb): $1,56 \mu\text{g/ml}$ NFAP-kezelt, γ^{NFAP} -opt_(MIC): $200 \mu\text{g/ml}$ γ^{NFAP} -opt-kezelt, γ^{NFAP} -opt_(MICkomb): $6,25 \mu\text{g/ml}$ γ^{NFAP} -opt-kezelt. Az NFAP és a γ^{NFAP} -opt a minimális gátló koncentráció (MIC, *minimum inhibitory concentration*) értékeik jelenlétében és szinergista koncentráció kombinációjuk (Komb) esetében képesek megakadályozni a *B. cinerea* kolonizációját a paradicsomnövény levelén, míg szinergizmus esetében mutatott MIC koncentrációján (MICkomb) az NFAP ezt csak mérsékeli, a γ^{NFAP} -opt (MICkomb) pedig egyáltalán nem befolyásolja. **b)** A *B. cinerea* fertőzés/kolonizáció kialakulásának gyakorisága az a) panel kísérletében a: szignifikáns különbség ($p < 0,001$; egyszempontos varianciaanalízis, Tukey-próba) a fertőzött de nem kezelt kontrollal (Bcin) összehasonlításban, b: szignifikáns különbség ($p < 0,001$; egyszempontos varianciaanalízis, Tukey-próba) a fertőzött és NFAP + γ^{NFAP} -opt szinergista kombinációval kezelt mintával (Komb) összehasonlításban. A **b)** panelen látható diagramok három független kísérletből (kísérletenként $n=9$) származó eredmények átlagértékét tünteti fel szórással együtt. Tóth és mtsai. (2022) alapján.

Garrigues és mtsai. (2018) is bizonyítottak, hogy a *P. digitatum*-eredetű AfpB és a *P. expansum* PeAfpA is hatékonyan, koncentráció-függő módon gátolja a *B. cinerea* kolonizációját paradicsomnövény levelén és azt, hogy egy már fertőzött növény rövid időn belüli (hat órával a fertőzés után) utólagos kezelésével a tünetek visszaszoríthatók (Garrigues és mtsai 2018). Ehhez hasonló megfigyelést tettek Shi és mtsai. (2019), amikor is a *Pencillium digitatum* AfpB-t a dohányfélékhez tartozó *Nicotiana benthamiana*-ban termeltették meg és a növény levelének kivonata, ami tartalmazta az antifungális fehérjét, hatékonyan megakadályozta a paradicsomnövény levelén a *B. cinerea* fertőzés elterjedését (Shi és mtsai. 2019).

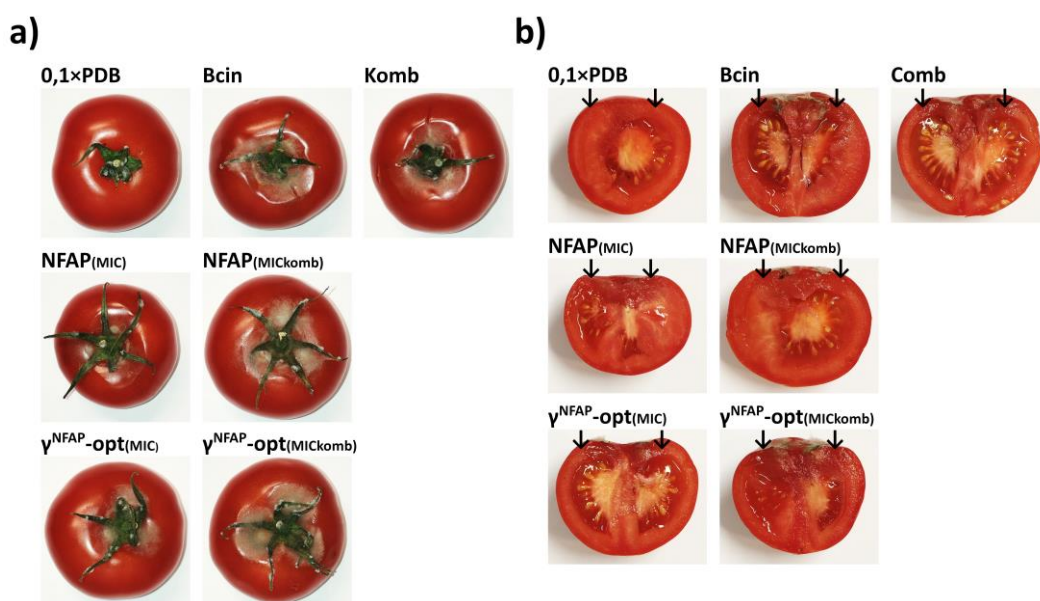
A fent részletezett megfigyelések azt jelezték, hogy a nagy pozitív ösztötlésű és nagymértékben hidrofil tulajdonságú Eurotiomycetes-eredetű AFP-k és peptid-származékaik hatékonyan lehetnek nekrotróf növényi gombakórokozókkal szemben *in planta*, de fokozhatják a patogenitását és elősegíthetik annak növényi kolonizációját egy esetleges a protein/peptid károsító hatására adott stresszválasz reakció beindításával. A patogenitás fokozódása, mintegy stresszválasz reakció a nekrotróf fitopatogén gombák esetében (így a *B. cinerea*-nál is) egy általánosa megfigyelhető jelenség (Castillo és mtsai. 2017, Singh és Verma 2021).

Az előző bekezdésben említett MIC értékű NFAP (6,25 µg/ml), γ^{NFAP} -opt (200 µg/ml) és kétfő csökkentett koncentrációjával kombinációban (1,56 µg/ml, illetve 6,25 µg/ml) kezelt paradicsomnövény levelek SEM felvételei azt mutatták, hogy a konídium szuszpenzió felcseppentésének a területéről a képződő *B. cinerea* SZMC 21472 hifák nem tudnak tovább terjedni **(29a. Ábra)** és nem képeznek olyan sűrű hálózatot, mint a kezeletlen és a kombinációban mutatott MIC értékkel kezelt (1,56 µg/ml és 6,25 µg/ml) minták esetében **(29b. Ábra)**. Az NFAP jelenlétében összeesett, sérült csírázó konídiumok is megfigyelhetők voltak **(29b. Ábra)**.

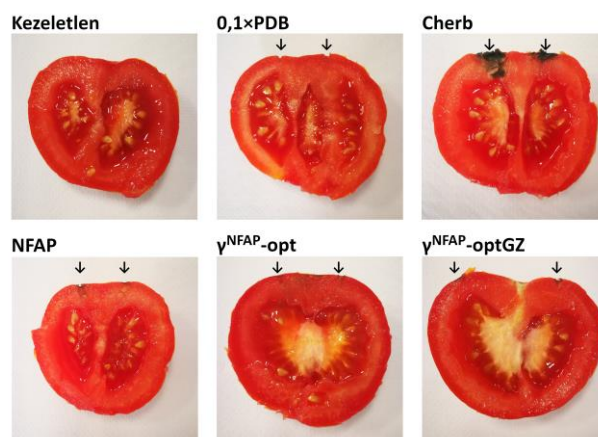


29. Ábra. Paradicsomnövény abaxiális levélepiszének pásztázó elektronmikroszkópos felvétele *Botrytis cinerea* SZMC 21472 izolátummal történő fertőzést (10 µl, 1×10^7 konídium/ml, 10-szeresre hígított burgonyakivonat-glükóz tápközegben [0,1×PDB, *potato dextrose broth*] elkészítve) követően 4 nap 23°C-on, 60% páratartalom és 12-12 óra fény-sötét ciklus (1200 lux) inkubáció után a kezeletlen kontrollokhöz viszonyítva **a)** 60× és **b)** 300× nagyításban. Bcin: fertőzött és nem kezelt, Komb: 1,56 µg/ml NFAP + 6,25 µg/ml γ^{NFAP} -opt kombinációval kezelt, NFAP_(MIC): 6,25 µg/ml *Neosartorya fischeri* antifungális protein (NFAP)-kezelt, NFAP_(MICkomb): 1,56 µg/ml NFAP-kezelt, γ^{NFAP} -opt_(MIC): 200 µg/ml γ^{NFAP} -opt-kezelt, γ^{NFAP} -opt_(MICkomb): 6,25 µg/ml γ^{NFAP} -opt-kezelt. **a)** A fehér szaggatott vonal a konídium szuszpenzió felcseppentésének a helye, ahonnan a *B. cinerea* hifák nem tudnak tovább terjedni 6,25 µg/ml NFAP, 200 µg/ml γ^{NFAP} -opt (MIC), és 1,56 µg/ml NFAP + 6,25 µg/ml γ^{NFAP} -opt (MICkomb) jelenlétében. A kezeletlen és a MICkomb koncentrációval kezelt minták esetében ez megfigyelhető volt. **b)** A 6,25 µg/ml NFAP, 200 µg/ml γ^{NFAP} -opt (MIC), és 1,56 µg/ml NFAP + 6,25 µg/ml γ^{NFAP} -opt (MICkomb) jelenlétében kevésbé sűrű hifahálózat jön létre, mint a kezeletlen és a MICkomb koncentrációval kezelt minták esetében. A fehér nyilak az NFAP jelenlétében megfigyelhető összeesett, sérült csirázó konídiumokat mutatják. Tóth és mtsai. (2022) alapján.

Paradicsomtermésvédelmi kísérletek során hasonló módon jártunk el, mint a növényvédelmi kísérletek esetében. Ekkor a termés kocsány melletti részét három ponton megszúrtuk és szúrásponthoz 0,1×PDB-ben elkészített *B. cinerea* SZMC 21472 konídium szuszpenziót fecskendeztünk NFAP, γ^{NFAP} -opt, vagy a kettő fentebb említett szinergista kombinációjának a jelenlétében vagy ezek nélkül. Az alkalmazott kezelések közül csak a MIC értékű NFAP (6,25 $\mu\text{g/ml}$) és a szinergista NFAP (1,25 $\mu\text{g/ml}$) + γ^{NFAP} -opt (6,25 $\mu\text{g/ml}$) kombináció volt képes kis mértékben csökkenteni a fertőzés tüneteit, de nem voltak képesek azt teljes mértékben visszaszorítani (**30. Ábra**). Szöveti roncsolás minden fertőzés és kezelés esetében megfigyelhető volt (**30. Ábra**) (Tóth és mtsai. 2022). Ezzel szemben az NFAP, a γ^{NFAP} -opt és a γ^{NFAP} -optGZ MIC értékein alkalmazva (100 $\mu\text{g/ml}$, illetve 12,5 $\mu\text{g/ml}$) képes volt gátolni a *C. herbarum* FSU 1148 fertőzés kialakulását a paradicsomtermésen (**31. Ábra**) (Tóth és mtsai. 2020a).



30. Ábra. *Botrytis cinerea* SZMC 21472 izolátummal fertőzött paradicsomtermés (10 μl , 1×10^7 konídium/ml, 10-szeresre hígított burgonyakivonat-glükóz tápközegben [0,1×PDB, *potato dextrose broth*] elkészítve) **a)** felülnézeti és **b)** keresztmetszeti képe 7 nap, 23°C-on történő inkubációt követően az inokulum készítéséhez használt 0,1×PDB-vel kezelt kontrollal összehasonlításában. Bcin: fertőzött és nem kezelt, Komb: 1,56 $\mu\text{g/ml}$ NFAP + 6,25 $\mu\text{g/ml}$ γ^{NFAP} -opt kombinációval kezelt, NFAP_(MIC): 6,25 $\mu\text{g/ml}$ *Neosartorya fischeri* antifungális protein (NFAP)-kezelt, NFAP_(MICkomb): 1,56 $\mu\text{g/ml}$ NFAP-kezelt, γ^{NFAP} -opt_(MIC): 200 $\mu\text{g/ml}$ γ^{NFAP} -opt-kezelt, γ^{NFAP} -opt_(MICkomb): 6,25 $\mu\text{g/ml}$ γ^{NFAP} -opt-kezelt. A nyilak a fertőzési pontok helyét jelölik. A MIC értékén alkalmazott NFAP (MIC) és a szinergista NFAP + γ^{NFAP} -opt kombináció (Komb) mindössze mérsékelni tudta a fertőzés kialakulását. A többi kezelés esetében a Bcin-hez hasonló fertőzés intenzitás és szöveti károsodás volt megfigyelhető. Tóth és mtsai. (2022) alapján.



31. Ábra. *Cladosporium herbarum* FSU 1148 izolátummal fertőzött paradicsomtermés (10 µl, 1×10^7 konídium/ml, 10-szeresre hígított burgonyakivonat-glükóz tápközegben [0,1×PDB, *potato dextrose broth*] elkészítve) keresztmetszeti képe 7 nap, 23°C-on történő inkubációt követően a kezeletlen és az inokulum készítéséhez használt 0,1×PDB-vel kezelt kontrollokkal összehasonlításában. Cherb: fertőzött és nem kezelt, NFAP: 100 µg/ml *Neosartorya fischeri* antifungális protein (NFAP)-kezelt, γ^{NFAP} -opt: 12,5 µg/ml γ^{NFAP} -opt-kezelt, γ^{NFAP} -optGZ: 12,5 µg/ml γ^{NFAP} -optGZ-kezelt. A nyilak a fertőzési pontok helyét jelölik. A MIC értékén alkalmazott NFAP, γ^{NFAP} -opt és γ^{NFAP} -optGZ megakadályozta a fertőzés kialakulását, jelentős szöveti károsodás nem volt megfigyelhető. Tóth és mtsai. (2020a) alapján

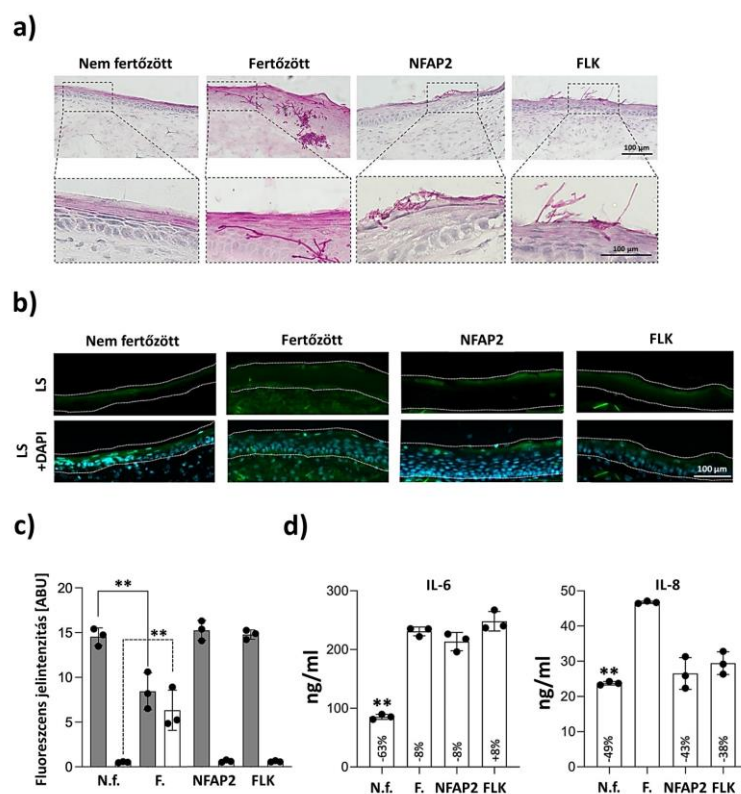
Egy másik munkánkban megfigyeltük, hogy az NFAP2 rövidtávon képes megvédeni a narancstermést *P. digitatum* fertőzéssel szemben (Gandía és mtsai. 2021). Ezek a megfigyeléseink tovább erősítik azt a feltételezést, hogy az antifungális hatással rendelkező, a környezeti körülmények között stabil szerkezettel és a proteolitikus degradációval szemben ellenálló antifungális proteinek és peptidek felhasználhatók lehetnek a raktározott termés védelmére penészgomba kártevőkkel szemben. Alkalmazásuk szempontjából különösen előnyös lehet az, hogy mikotoxin termelő gombák növekedését is képesek visszaszorítani *in vitro* (Martínez-Culebras és mtsai. 2021a,b).

7.8.2. Az NFAP2 alkalmazhatósága felületi humán gombás fertőzések kezelésében

Az NFAP2 nagymértékű élesztőgombaellenes aktivitással rendelkezett még a klinikai érzékenységi tesztek során alkalmazott RPMI-1640 tápközegben is (**11. Táblázat**) (Tóth és mtsai. 2018, Kovács és mtsai. 2019, 2021), hatékonynak bizonyult (multi)drog-rezisztens izolátumokkal szemben és képes volt a *Candida* biofilmeket is megszüntetni (**13. Táblázat**) (Kovács és mtsai. 2019, 2021). 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 szer-rezisztens) 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.

Immunszupresszált páciensek esetében a gyakori kután *C. albicans* fertőzés könnyen szubkután onnan pedig súlyos, az életet is veszélyeztető invazív formává alakulhat (Vazquez és Sobel 2002, Cavaleiro és Teixeira 2018). A kután és szubkután forma kezelésére echinokandinokat, azolokat és nisztatint alkalmaznak (Pappas és mtsai. 2016, Pfaller és mtsai. 2016). Ezek használata az immunkompetens egyének esetében 70-100%-os terápiás sikerrel járhat, viszont az immunszupresszáltak esetében nem, elsősorban azért mert a gazda immunrendszere nem „asszisztál” a gobaellenes szer hatásához. Mindezt tovább súlyosítja az azol-rezisztens *Candida* izolátumok folyamatos, világszintű terjedése (Pappas és mtsai. 2016, Taudorf és mtsai. 2016). Korábban már említésre került, hogy a háromdimenziós bőrmódel rendszer képes kiváltani az állatkísérleteket és kiválóan alkalmas a gombák okozta fertőzések patofiziológiás vizsgálatára, továbbá új gombaellenes vegyületek hatékonyságának a tesztelésre (Kühbacher és mtsai. 2017, Fink és mtsai. 2022, Merk és mtsai. 2022). Egy ilyen módelrendszerben az NFAP2 vizes oldatának felszíni alkalmazása képes volt a *C. albicans* CBS 5982 kolonizációját és az ehhez szüksége élesztőből fonalas formába történő átalakulást nagymértékben csökkenteni. Az NFAP2 kezelés hatására a gomba csak a *stratum corneum*-ban volt megtalálható csekély számban, szemben a kezeletlen-fertőzött módellel, ahol az epidermiszben és a dermális rétegekben is nagy mennyiségben előfordult (**32a. Ábra**). Az NFAP2 kezelés megővta az epidermális permeabilitás gát működést a *C. albicans* fertőzés károsító hatásával szemben. Ugyanis, a kezeletlen-fertőzött mintával ellentétben, ahol a kimutatásra alkalmazott LS festék jelenléte az egész epidermiszben a dermális réteig megfigyelhető volt, addig az NFAP2 kezelés hatására,



32. Ábra. a) *Candida albicans* CBS 5982 izolátummal fertőzött (25 µl, $1,6 \times 10^4$ sejt/ml foszfáttal pufferelt sóoldatban) háromdimenziós bőrmódel perjódsv-Schiff- festése 25 µl vizes oldatú *Neosartorya fischeri* antifungális protein 2-vel (NFAP2, 6,24 µg/ml) és flukonazol (FLK, 0,02 µg/ml) történő kezelést követően a kezeletlen-nem fertőzött és a kezeletlen-fertőzött mintákkal összehasonlításban. A modellek NFAP2 és FLK kezelése, 24 óra, 32°C, 5% CO₂ jelenlétében történő inkubáció után kezdődött meg és 24 óra hosszáig tartott ugyanezen inkubációs körülmények között. Az NFAP2 és az FLK megakadályozta a *C. albicans* szöveti invázióját. **b)** A fertőzött háromdimenziós bőrmódel epidermális permeabilitás gát működésének a vizsgálata az a) pontban leírt vizes oldatú NFAP2-vel és FLK-val történő kezelést követően a kezeletlen-nem fertőzött és a kezeletlen-fertőzött mintákkal összehasonlításban. LS és LS+DAPI: lucifer sárga CH-festés (zöld fluoreszcencia), illetve lucifer sárga + DAPI (4',6-diamidin-2-fenilindollal; kék fluoreszcencia)-festés kombináció. Az NFAP2 és az FLK megakadályozta a fertőzés következtében létrejövő epidermális permeabilitás gát működésének az elvesztését, mivel a vizsgálatra alkalmazott LS festék csak a *stratum corneum*-ban volt megtalálható a kezeletlen-nem fertőzött kontrollhoz hasonlóan, míg a kezeletlen-fertőzött minta esetében az élő epidermisz rétegekben is megfigyelhető volt. **c)** LS fluoreszcencia jelintenzitása a b)-ben kezelt mintának, ahol a szürke oszlopok a *stratum corneum*-ban mért intenzitásokat, míg a fehér oszlopok az élő epidermisz rétegekben mért jelintenzitásokat mutatják. Az eredmények alapján az NFAP2- és FLK-kezelés megakadályozza a fertőzés következtében kialakuló epidermális permeabilitás gát működésének a megszűnését, mivel LS festék csak a *stratum corneum*-ban halmozódik fel kezeletlen-nem fertőzött mintához (N.k.) hasonlóan, szemben a kezeletlen-fertőzött (F.) mintával ahol a felhalmozódás a mélyebb, élő epidermisz rétegekben is megfigyelhető volt. **: $p < 0,005$ - szignifikáns különbség (egyszempontos varianciaanalízis, Tukey-próba). **d)** A fertőzött bőrmódel interleukin-6 (IL-6) és interleukin-8 (IL-8) termelőképessége NFAP2- és FLK-kezelést követően a kezeletlen-nem fertőzött (N.f.) és a kezeletlen-fertőzött (F.) mintákkal összehasonlításban. Az eredmények alapján az NFAP2- és FLK-kezelés során nem történik szignifikáns változás az IL-6 termelésében, míg az IL-8 termelés alacsonyabb szintű volt, mint a kezeletlen-fertőzött mintában és ugyanakkora, mint a kezeletlen-nem fertőzött esetében. **: szignifikáns különbség ($p < 0,005$) egyszempontos varianciaanalízis. Az **c)** és **d)** paneleken látható diagramok három független kísérletből (kísérletenként $n=1$) származó eredmények átlagértékét tünteti fel szórással együtt. Holzknicht és mtsai. (2022) alapján.

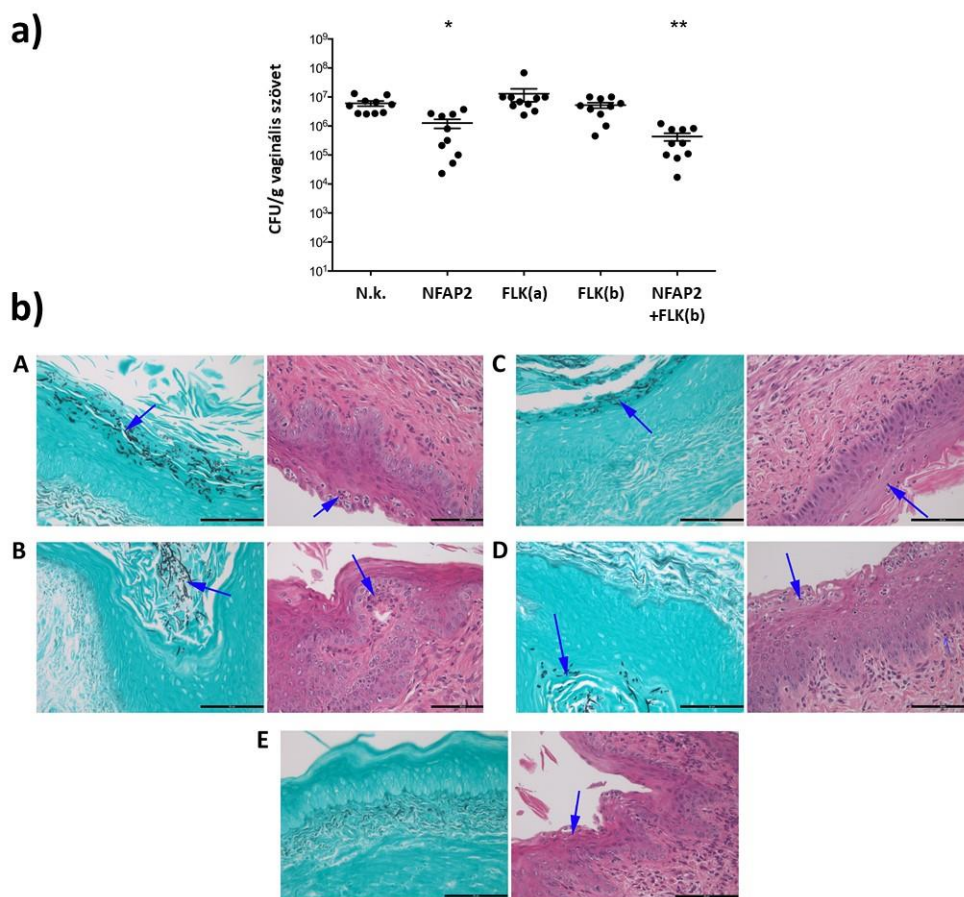
a nem fertőzött kontrollhoz hasonlóan csak a *stratum corneum*-ban (32b. Ábra). Ezt az eredményt a *stratum corneum* és az élő epidermisz rétegek fluoreszcens jelintenzitásainak a mérései is megerősítették (32c. Ábra). A fertőzött-kezeletlen mintához viszonyítva az IL-8 szint szignifikáns csökkenése volt megfigyelhető az NFAP2-kezelés hatására, míg az IL-6 esetében semmilyen változás nem volt megfigyelhető (32d. Ábra). Az IL-8 kemokin a fagocitáló immunsejteket vonzza a fertőzés helyszínére (Dongari-Bagtzoglou és mtsai. 2003, Javed és mtsai. 2012), míg az IL-6 citokin a pro- és az antiinflammatorikus regeneratív folyamatokban játszik szerepet (Scheller és mtsai. 2011, Faway és mtsai. 2019). Az NFAP2-kezelt mintában a kezeltlen-nem fertőzött mintával azonos IL-8 szint azt jelezte, hogy komoly fertőzés nem alakult ki vagy az már lecsengett; míg az ennél nagyobb szint az IL-6 esetében azt, hogy működnek a pro- és az antiinflammatorikus regeneratív folyamatok (32d. Ábra). Hasonló jelenségek voltak megfigyelhetők a flukonazol alkalmazása esetében is (32. Ábra), ami azt jelezte, hogy az NFAP2 felszíni gombafertőzésekkel szemben mutatott hatékonysága összemérhető azével (Holzknecht és mtsai. 2022).

Az NFAP2 alkalmazhatóságát antifungális szer-rezisztens élesztőgomba törzsek által okozott nyálkahártya fertőzések kezelésére egy egér VVC modellben vizsgáltuk flukonazol-rezisztens *C. albicans* izolátummal szemben (Kovács és mtsai. 2019). A vulvovaginális candidiázis az egyik leggyakoribb gombás megbetegedés (Sobel 2007, Sherry és mtsai. 2017), ami a külső női nemi szervnek és/vagy a hüvely nyálkahártyájának *Candida* (elsősorban *C. albicans*) által okozott fertőzését jelenti (Gonçalves és mtsai. 2016). A női populáció ~75%-a legalább egyszer érintett élete során ezzel a fertőzéssel. Az esetek ~10%-a folyamatosan visszatérő a nem megfelelő terápia következtében és súlyos egészségügyi következményekkel járhat (pl. meddőség) (Gonçalves és mtsai. 2016). A fertőzés kezelésére általában valamilyen flukonazol-tartalmú készítményt alkalmaznak topikálisan, de alternatív módon tabletta szájon át történő szedése is szóba jöhet (Sobel 2013, Muzny és Schwebke 2015). Heveny esetben akár féléven át tartó intravénás flukonazol alkalmazás a javasolt, ami súlyos mellékhatásokat válthat ki a gazda szervezetében (Brand és mtsai 2018). A flukonazol-rezisztens *C. albicans* törzsek elterjedésével a VVC esetek sikeres kezelése egyre nagyobb kihívássá vált (Marchaim és mtsai 2012, Sherry és mtsai. 2017). Már bizonyították, hogy antifungális hatással rendelkező peptidek terápiás alkalmazása egy megoldást jelenthet erre a problémára, ugyanis hatékonyan képesek gátolni VVC-ből származó *C. albicans* izolátumok

növekedését *in vitro* érzékenységi tesztekben (Ng és mtsai. 2017). Ezt megfontolva vizsgáltuk az NFAP2 terápiás hatékonyságát ennek a fertőzésnek a kezelésében.

Az NFAP2 hatékonyan gátolta egy VVC-ből származó flukonazol-rezisztens *C. albicans* izolátum planktonikus és szesszilis biofilm sejtjeinek a növekedést egyaránt 800 µg/ml MIC értékkel, RPMI-1640 tápközegben *in vitro* (11. Táblázat). Ezt a hatékonyságát az NFAP2 vizes oldatú felületi szerként alkalmazva *in vivo* körülmények között is megőrizte VVC egérmodellben a fertőzés utáni 24. órában megkezdett terápia során. Szemben az intarperitoneálisan vagy intravaginálisan alkalmazott fiziológiás sóoldattal (0,5 ml, illetve 25 µl), továbbá az intraperitoneálisan flukonazzal kezelt (humán dózishoz arányosítható egyszeri 0,5 ml 35 mg/kg vagy naponta egyszeri 0,5 ml 2 mg/kg) csoportokkal, az NFAP2 naponta egyszeri (25 µl, 800 µg/ml) intravaginális alkalmazása szignifikánsan csökkentette a fertőzést követő negyedik napon a vulvovaginális szövetek élő *C. albicans* sejtszámát (33a. Ábra). Mindez az NFAP2 *in vivo* topikális hatékonyságát jelezte flukonazol-rezisztens *C. albicans*-szal szemben. Az előbb említett élősejtszám csökkenés sokkal szembetűnőbb volt abban az esetben, amikor az NFAP2 kezelést kiegészítette a napi egyszeri, intraperitoneális flukonazol-kezelés (0,5 ml, 2 mg/kg) (33a. Ábra) (Kovács és mtsai. 2019). Ez utóbbi eredményünk arra enged következtetni, hogy az NFAP2 adjuváns szereként újra érzékennyé tehet egy rezisztens *C. albicans* izolátumot flukonazzal szemben akár *in vivo* körülmények között is.

Hisztológiai vizsgálatok alapján az NFAP2 nem okozott morfológiai elváltozásokat és súlyos patológiás reakciókat a vaginális és vulvális szövetekben, továbbá a kezelt szervek makromorfológiájában (nem közölt adat) és nagymértékben gátolta a *C. albicans* hifális formába történő átalakulását (33b. Ábra) (Kovács és mtsai. 2019), ami a biofilm képzéshez szükséges egyik kulcslépés (Cavalheiro és mtsai. 2018). A fertőzési folyamatra aktiválódó neutrofil granulociták jelenléte az összes szöveti mintában megfigyelhető volt, de az NFAP2-vel és NFAP2 + flukonazol kombinációval kezeltékben kisebb mértékben (33b. Ábra). Ez azt jelezte, hogy a fehérje nem gátolta ezeknek az immunsejteknek a működését az immunválasz kialakulása során és azt, hogy a gyulladásos folyamat kisebb mértékű volt, mint a kezeletlen és az flukonazzal kezelt mintákban. Annak ellenére, hogy az NFAP2-vel történő kezelés nem szüntette meg teljes mértékben a fertőzést, az annak kialakítására használt magas élősejtszámot ($\sim 1 \times 10^7$ kolóniaképző egység) akár két-három nagyságrenddel is képes volt csökkenteni a rövid kezelési időn belül (32a. Ábra) (Kovács és mtsai. 2019). Ez a hatás sokkal nagyobb mértékű is lehet hosszabb ideig tartó terápia esetében.



33. Ábra. a) A *Neosartorya fischeri* antifungális protein 2 (NFAP2) és az NFAP2 + flukonazol (NFAP2+FLK) kombináció hatékonysága élősejtszám alapján vulvovaginális candidiázis egérmódelben FLK-rezisztens *Candida albicans* 27700 izolátummal szemben a fertőzést (25 μ l $\sim 1 \times 10^7$ kolóniaképző egység) követő 4. napon a kezeletlen-fertőzött (N.k.) és a FLK-kezelt (FLK(a) és FLK(b)) csoportokkal összehasonlításban. N.k.: 0,5 ml, 25 μ l/nap intraperitoneális/intravaginális fiziológiás sóoldat, NFAP2: naponta egyszer intravaginális 25 μ l, 800 μ g/ml NFAP2, FLK(a): egyszeri intraperitoneális 0,5 ml 35 mg/kg FLK, FLK(b): naponta egyszeri intraperitoneális 0,5 ml 5 mg/kg FLK, NFAP2+FLK(b): NFAP2 és FLK(b) kombinációja. Az NFAP2- és az NFAP2+FLK(b)-kezelés szignifikánsan csökkentette a *C. albicans* élősejtszámot a fertőzött vulvális és vaginális szövetekben. **: $p < 0,05$ - szignifikáns különbség (Kruskal-Wallis-próba, Dunn-teszt). **b)** A kezelt szövetek (A-D) hisztológiai vizsgálata Grocott, Gömöri-féle ezüstmetamin (bal) és hematoxin-eozin (jobb) festéssel a kezeletlen-fertőzött (A, N.k.) és a kezeletlen-nem fertőzött (E) kontrollokhöz viszonyítva. B: FLK(b), C: NFAP2, D: NFAP2+FLK(b) kezelések. A kék nyilak a *C. albicans* (bal) és a neutrofíl granulociták (jobb) jelenlétét mutatják. Az NFAP2 és NFAP2+FLK(b) kezelések hatására kevesebb *C. albicans* sejt és neutrofíl granulocita látható, továbbá a gombasejtek fonalasodása nagymértékben gátolt. CFU: kolóniaképző egység (*colony-forming unit*). Az a) panelen látható diagram két független kísérletből (kísérletenként $n=5$) származó eredmények átlagértékét tünteti fel szórással együtt. Kovács és mtsai. (2019) alapján.

A VVC egérmódel vizsgálata során elért eredményeink összevethetők Palicz és mtsai. (2013, 2016) által leírtakkal, amikor is egy másik Eurotiomycetes-eredetű AFP, a

PAF intraperitoneális alkalmazás során nem bizonyult toxikusnak egerekben (Palicz és mtsai. 2013), továbbá intranazálisan alkalmazva meghosszabbította az egerek túlélését egy *A. fumigatus* tüdőfertőzés modellben, ami az NFAP2-höz hasonlóan szintén szembetűnőbb volt amfotericin B-vel történő kombinált alkalmazása esetén (Palicz és mtsai. 2016). Ez utóbbi eredmény is erősíti az Eurotiomycetes-eredetű AFP-k adjuváns gombaellenes szerként történő alkalmazásának a lehetőségét.

8. Következtetések és további tervek

Kutatómunkánk elsődleges célja az volt, hogy a *Neosartorya (Aspergillus) 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 szeszilis, biofilmet alkotó sejtekkel szemben is, minimális eséllyel alakul ki rezisztencia ellene, gomba-specifikus célpontot támad, a gazdára nézve biztonságosan alkalmazható, a környezetre nézve ártalmatlan és az aktuális kihívásoknak megfelelően módosítható. A *N. fischeri* antifungális proteinekkel és γ -core peptid-származékaikkal (AFP-k) 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, gyógyszer- és élelmiszeripari szempontból alapvetően biztonságosnak ítélt (GRAS, *generally recognized as safe*) *Pichia pastoris* (újabbán: *Komagataella phaffii*) és *Penicillium chrysogenum*-alapú expressziós rendszerek alkalmasnak bizonyultak a minimális gátló koncentrációértékek (MIC, *minimum inhibitory concentration*) figyelembevételével relatíve nagy mennyiségben történő (9. Táblázat), 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 felülűszojából egy ultraszűrési folyamat után mindkét fehérje nagy tisztaságban (93-97%) izolálható volt már egy lépéses 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 (11. Táblázat) (Tóth és mtsai. 2016, 2018, 2020a, 2022, Kovács és mtsai. 2019, Gandia és mtsai. 2021, Holzkecht és

mtsai. 2022, Dán és mtsai. 2024). Általánosan megállapítható volt, hogy az NFAP elsősorban a növénypatogén fonalgombákkal, míg az NFAP2 humánpatogén élesztőgombákkal szemben mutat jelentős növekedésgátló hatást *in vitro* (**11. Táblázat**). 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 (*Candida albicans* és *Candida auris*) által képzett biofilmeket már önálló alkalmazása során is megsemmisíteni, továbbá, hogy a klinikumban alkalmazott antifungális szerekkel szinergisztikus kölcsönhatásba lépett ellenük (**13. Táblázat**) (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* biofilmmentesítésére, amelyek általában elsődleges forrásként szolgálnak nozokomiális gombafertőzések számára (Cavalheiro és Teixeira 2018). Jelenleg az NFAP2 biofilmellenes molekuláris mechanizmusát tanulmányozzuk *C. albicans* és *C. auris* sejteken. Eddigi eredményeink alapján feltételezhető, hogy gátolja az élesztőből fonalgombává történő átalakulást, ami a biofilmképzés egyik kulcslépése (Cavalheiro és Teixeira 2018).

Az, hogy vizsgálataink során az NFAP és NFAP2 nem lépett szinergisztikus kölcsönhatásba egymással növénypatogén fonalgombákkal szemben (Tóth és mtsai. 2022) (**13. Táblázat**), azt jelzi, hogy hatásmódjuk talán valamilyen szinten hasonló lehet. A kombinált alkalmazásuk során megfigyelt paradox hatást (ami egyedüli alkalmazás során nem volt megfigyelhető) azt jelzi, hogy a gombák valószínűleg valamilyen stresszválasz folyamat bekapcsolásán keresztül túl tudnak jutni a károsító hatásaikon akkor, ha egymás jelenlétében és nagy koncentrációban alkalmazzuk a fehérjéket. Ez 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 AFP-t egyszerre vagy egymás után alkalmazzuk.

Egy újonnan kifejlesztett antifungális szerjelölt molekula hosszútávú gyakorlati alkalmazásának a lehetőségét az is jelzi, hogy milyen eséllyel és mennyi idő alatt alakul ki rezisztencia vele szemben. Mivel mind az NFAP, mind az NFAP2 viszonylag rövid időn belül, már viszonylag alacsony MIC értéken elpusztítja a gombasejtet (**13. Táblázat**) (Virágh és mtsai. 2015, Tóth és mtsai. 2016,2018), vagyis cidikus módon hatnak, a rezisztencia kialakulásának a kockázata sokkal kisebb velük szemben, mint egy csak a növekedést gátló (sztatikus) szer ellen. Ezt a felvetést az NFAP2 esetében bizonyítottuk egy, a dolgozat írása közben bírálati folyamaton áteső kéziratunkban: Mikroevolúciós kísérleteink eredményei alapján a *C. albicans*-ban kisebb eséllyel alakult ki rezisztencia stabil genomi mutációk következtében az NFAP2-vel, mint a sztatikus flukonazollal szemben. Vizsgálataink szerint az NFAP2-rezisztencia hátterében a gombasejt csökkent NFAP2-kötő és/vagy felvételi képessége állhat, ami nem befolyásolta más különböző típusú, hagyományos antifungális szerekekkel (allilaminok, azolok, echinokandinok és poliénok) szembeni érzékenységet. Az NFAP2-rezisztens *C. albicans* törzsek csökkent mértékű toleranciával rendelkeztek sejtfal, hő és UV stresszhatásokkal szemben, a szülői, vad típushoz képest, de nem mutattak megváltozott metabolikus fitneszt és virulenciát (Bende és mtsai. 2024). Mindezek azt jelzik, hogy az NFAP2 akár éveken át is hatékonyan alkalmazható antifungális szer lehet a klinikai terápiában a (multi)drog rezisztencia kialakulásának az alacsony kockázata mellett.

Növényeken, humán sejtvonalakon, vörösvértesteken, szövetmodellen és *Galleria mellonella*-n elvégzett toxicitás tesztek az NFAP és az NFAP2 a gombán kívüli, más organizmuskora nézett biztonságos alkalmazhatóságát és gomba-specifikus célpontokon keresztül megvalósuló hatásmechanizmusnak a meglétét feltételezik (Tóth és mtsai. 2020a,2022, Kovács és mtsai. 2019, Holzkecht és mtsai. 2022, Várad és mtsai. 2024). Az NFAP esetében ez a célpont a feltárt molekuláris hatásmechanizmus folyamatának egyik eleme lehet. Ez valószínűsíthetőleg egy membránba ágyazott G-proteinnel kapcsolt receptor, ami a polarizált hifanövekedés gátlásban és apoptózis indukciójában játszik szerepet; továbbá egy mitogén-által aktivált protein-kinázon keresztül aktiválódó ismeretlen célpont, ami sejthalált okoz (**11. és 12. Ábrák**) (Virágh és mtsai. 2015). Ezek azonosítása keresztkötő molekulákat alkalmazó fehérje-fehérje kölcsönhatási kísérletekkel jelenleg folyamatban van. Tekintetbe véve az NFAP előre jelezett rossz farmakokinetikai és -dinámiai tulajdonságait és azt, hogy emiatt valószínűleg

intravénásan közvetlenül nem alkalmazható gombák okozta fertőzések kezelésére, a célpontok ígéretes templátul szolgálhatnak molekula-adatbázisok szerkezet-alapú szűrésére egy gyógyszer-újrahasznosítási folyamatban, hogy olyan már engedélyezett gyógyszer-molekulákat találjunk, amik terápiás szempontból jobb tulajdonságokkal rendelkeznek az NFAP-nél, 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 az egyes szerveket vagy az egész szervezetet károsító mellékhatások kialakulásában (Spencer és mtsai. 2023).

Az NFAP2 esetében egy viszonylag egyszerű hatásmechanizmus, a gomba plazmamembránjának a szelektív roncsolása valószínűsíthető (**13. és 19. Ábrák**) (Tóth és mtsai. 2016,2018). Egy most megjelent közleményünk és eddig nem közölt megfigyeléseink eredményei alapján viszont azt feltételezzük, hogy a NFAP2 koncentráció-függő hatásmóddal rendelkezik *C. albicans* sejteken. Különböző organizmusok membránját modellező micellákon végzett *in vitro*, molekuladinamikai (MD) szimulációkkal is alátámasztott kísérletek alapján MIC értéken alkalmazva az NFAP2-nek gomba-szelektív plazmamembránroncsoló hatása van, vagyis az NFAP2 a gomba sejtmembrán egyik jellegzetes lipid alkotóelemével a foszfoinozitol-ceramiddal lép kölcsönhatásba és dimereket képez, amit a plazmamembrán sérülése követ. Bakteriális és emlős sejtmembránmodelleken ez nem volt megfigyelhető (Pavela és mtsai. 2024). Ugyanezek az MD szimulációk megerősítették (Pavela és mtsai. 2024), hogy az NFAP2-nek ugyanaz az N-terminális középső régiója alakítja ki ezt a kölcsönhatást a gomba sejtmembránnal, mint amit a peptid funkcionális térképezése során is megállapítottunk (**19. Ábra**) (Tóth és mtsai. 2018). A MIC értéknél alacsonyabb koncentráció alkalmazása esetén az NFAP2 először a *C. albicans* sejtek külső rétegeiben lokalizálódik anélkül, hogy megzavarná a sejtmembrán integritását. Ezután, az NFAP2 egy vakuoláris transzportfolyamattal bejut a sejtbe és ott intracelluláris fehérjékhez kapcsolódva fejti ki gombaellenes hatását (nem közölt adat). Ezeknek a sejten belüli célpontoknak az azonosítása fehérje-fehérje kölcsönhatási kísérletekkel jelenleg folyamatban van, és szintén felhasználhatók lehetnek gyógyszer-adatbázisok szerkezet-alapú szűrésére egy gyógyszer-újrahasznosítási stratégia során új gombaellenes szerek azonosítására.

Transzkriptom analízisekkel mélyebb betekintést nyerhetünk az NFAP vagy az NFAP2 hatására a gomba életműködésében bekövetkező változásokba. Ezek alapján következtetni lehet az AFP-k hatásmechanizmusára, továbbá a velük szemben mutatott stresszválasz reakciókra. Ilyen irányú kísérletek mind az NFAP-val, mind az NFAP2-vel folyamatban vannak *Aspergillus nidulans*-on, illetve *C. albicans*-on. Az utóbbival kapcsolatban rendelkezésre álló eredmények alapján az NFAP2 hatására számos membrántranszport, bioszintetikus és metabolikus folyamat, továbbá a fonalas formába történő átalakulás gátlódik, míg a sejtfal szintézisben szerepet játszó és az éhezésre adott stresszválasz reakciókkal kapcsolatosak pedig fokozódnak (nem közölt adat). Ezek összevethetők az NFAP2 biofilmellenes hatékonyságával (élesztőből fonalas formába történő átalakulás gátlása) és talán válaszul szolgálhatnak az NFAP2 NFAP-val történő kombinált alkalmazás során megfigyelt paradox hatásra (**13. Táblázat**) (Tóth és mtsai. 2022).

A szerkezet-antifungális hatás feltárására irányuló kísérleteink eredményei alapján az NFAP estében megállapítható volt, hogy az antifungálisan aktív szerkezet kialakításban és/vagy annak stabilizálásban szerepet játszó ciszteinek számában és meglétében, a központi hidrofób magban és az első öt N-terminális aminosavban bekövetkező változások megszüntethetik vagy csökkentik a környezeti hatásokkal szembeni ellenállóképességet és a gombaellenes hatékonyságot (Galgóczy és mtsai. 2017). Ezért az antifungális hatékonyság növelése és a spektrum szélesítése céljából a NFAP „szabadon” szerkeszthető elemeit a fehérjét alkotó öt β -redő között megtalálható, rendezetlen szerkezetű hurokrégiók jelentik (**14. és 18. Ábrák**). Egy későbbi tanulmányban Giner-Llorca és mtsai. (2023b) megfigyelték (mintegy igazolva az NFAP-re tett megállapításunkat), hogy az NFAP szerkezetéhez nagyon hasonló, *P. expansum* által termelt PeAfpB hurokrégióiban létrehozott többszörös aminosavcserék nem befolyásolják a harmadlagos szerkezetet, viszont az antifungális hatékonyságot növelhetik vagy csökkenthetik (Giner-Llorca és mtsai. 2023b). Az egyik ilyen hurokrégió az evolúciósan konzervált γ -core motívum, ami az AFP-k esetében felelős lehet a hatás kiváltásáért, elsősorban plazmamembrán roncsoláson keresztül (Sagaram és mtsai. 2011, Lacerda és mtsai 2014). A *P. chrysogenum* által termelt PAF-fal elért eredményeink alapján feltételeztük (Sonderegger és mtsai. 2018, Tóth és mtsai. 2020b), hogy a γ -core régió megváltoztatásával (nagyobb pozitív össztöltés és csökkent hidrofóbicitás) emelhető egy *N. fischeri*-eredetű AFP hatékonysága és bővíthető a spektruma, anélkül hogy sérülne a harmadlagos szerkezet. Megfigyeléseink alapján az NFAP elsődleges

szerkezetében bekövetkező ilyen változás, igaz hogy növeli a fehérje hatékonyságát *Cladosporium herbarum*-mal szemben, de egy alapvetően rendezetlen fehérjeszerkezetet okoz (nem közölt adat). Az NFAP2 esetében pedig csökkenti a hatékonyságot *C. albicans*-szal szemben és szintén rendezetlen szerkezet kialakulását vonja maga után (Váradi és mtsai. 2024). Ezt azt jelenti, hogy az NFAP és NFAP2 γ -core régiójának inkább szerkezet kialakító vagy stabilizáló szerepe lehet és nem felelős egy sejtmembrán roncsoláson keresztül megvalósuló gombaellenes hatásmechanizmusért. Ez megerősíti az NFAP2 estén a középső N-terminális régióval kapcsolatos megfigyelésünket, vagyis azt, hogy ennél a fehérjénél ez felelős az ilyen módon megvalósuló gombaellenes hatásért **(19. Ábra)** (Tóth és mtsai. 2018). A γ -core régió kívül feltárt többi „szabadon” szerkeszthető fehérjeszerkezeti elemek lehetőséget adhatnak az NFAP és NFAP2 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 régiók alapján tervezett szintetikus peptid-motívumok önmagukban nem mutattak semmilyen gombaellenes hatást ellentétben a PAF és a növényi AFP-k γ -core motívumaival, amiknél ez megfigyelhető **(18. Táblázat)** (Sagaram és mtsai. 2011, Sonderegger és mtsai. 2018, Tóth és mtsai. 2020a és b, 2022, Váradi és mtsai. 2024). Ez az eredmény tovább erősítette az előbbi következtetésünket, 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). Viszont az NFAP és NFAP2 γ -core peptid-származékokra szintén igaz volt az **(17. és 19. Táblázatok)**, hogy az aminosavcserékkel történő pozitív ösztötés növelés és hidrofóbicitás csökkentés növeli a peptid antifungális hatékonyságát **(19. és 20. Táblázatok)** (Tóth és mtsai. 2020a, 2022, Váradi és mtsai. 2024). Mivel ezen peptidek többsége nem bizonyult károsnak a korábban említett 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. Egy ilyen lehetőség a ciszteinek szabad szulfhidril-csoportjainak az S-*terc*-butilációja, ami megakadályozza a kénhidakon keresztül létrejövő ciklikus és dimer formák kialakulását oxidatív körülmények között **(5-7. Mellékletek)**. Igaz, hogy eredményeink alapján ez a változtatás kismértékben csökkentheti a hatékonyságot **(20. Táblázat)**, de a spektrumot tágíthatja, továbbá nem teszi a peptidet toxikussá állatokon (Váradi és mtsai. 2024) **(25. Ábra)**. Az egyre gazdaságosabbá és hatékonyabbá váló

szilárd fázisú peptidszintézis módszerek miatt a közeljövőben realitása lehet a szintetikus AFP-k 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 AFP-k válaszul a gombaellenes stratégiák rezisztenciával és epidemiológiai változásokkal szembeni kihívásaira.

Felületi kontakt növényvédőszerként alkalmazva mind az NFAP és γ -core peptid-származékaik képesek voltak a megakadályozni a nekrotróf, *Botrytis cinerea* fertőzés kialakulását paradicsomnövény levelén vagy annak intenzitását csökkenteni már mikromolos koncentrációtartományban laboratóriumi körülmények között (28. Ábra) (Tóth és mtsai.2022). Ezen felül hatékonyak mutatkoztak a paradicsomtermés védelmében is ugyanezzel a gombakórokozóval és *C. herbarum*-mal szemben (29. és 30. Ábrák) (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 támasztott követelményeknek (Európai Bizottság 2021). Növény- és terményvédelmi gyakorlati alkalmazhatóságukig azonban még sok felmerülő problémát meg kell oldani és számos vizsgálatot szükséges elvégezni, amiket laboratóriumi és üvegházi körülmények között mi is tervezünk a közeljövőben. Az egyik megoldandó problémát a kontakt növényvédőszerként történő alkalmazás veti fel. Amennyiben az NFAP vagy a γ -core peptid-származékok nem jutnak be a növénybe, akkor a növény felszíni részeiről az eső könnyen lemoshatja őket és nagy mennyiségben a talajba juthatnak. Információ arról, hogy a talajba jutva hogyan befolyásolják a rizobium összetételét (ami szükséges lehet a növény egészséges fejlődéséhez és a megfelelő terméshozam eléréshez) még nem áll rendelkezésünkre. Ezért mindenképpen szükséges ökotoxikológiai vizsgálatokat elvégezni, amik nem csak a rizobium összetételére, hanem más élőlényekre, pl. rovarok is irányulnak. A növényi felülethez történő „rögzítésük” megoldható lehet a mezőgazdaságban már alkalmazott tapadást elősegítő készítményekkel. Mikrodilúciós érzékenységi tesztek előzetes eredményei alapján az ilyen jellegű készítmények csak kismértékben csökkentik az NFAP és γ -core peptid-származékok antifungális hatékonyságát és a növény levelén ilyen készítmény jelenlétében is hatékonyan megakadályozzák a fertőzés kialakulását (nem közölt adat).

Alkalmazásuk másik lehetőségét a szisztémás növényvédőszerként történő használat jelentené. Ehhez meg kellene oldani azt, hogy a növénybe jussanak a viaszos kutikularétegen keresztül és vizsgálni kellene ilyen formában mutatott hatékonyságukat. A γ -core peptid-származékok lipopeptidként történő előállítása és növényvédelmi hatékonyságuk vizsgálata a rövid távú terveink között szerepel. A növényi szövetekbe történő bejutást elősegíthetik, ha megfelelő lipid láncot kapcsolunk hozzájuk, vagyis lipopeptidként állítjuk elő őket, ha sejtpenetráló peptidhez kapcsoljuk őket, vagy ha olyan nanokapszulába csomagoljuk, ami képes átjutni ezen a rétegen. Persze ebben az esetben is fontos, hogy megőrizzék gombaellenes hatékonyságukat. Raktározott terményvédelmi szempontból előnyös tulajdonságuk lehet az, ha képesek csökkenteni a mikotoxin szennyeződés mértékét. Ilyen jellegű kísérleteket már végeztünk NFAP-vel és NFAP2-vel *Aspergillus flavus*, illetve *Fusarium verticillioides* ellen, de szignifikáns mikotoxin szint csökkenést nem figyeltünk meg egyik esetben sem (nem közölt adat).

Figyelembe véve az NFAP2 nagymértékű élesztőgomba-ellenes hatását és azt (**11. és 13. Táblázatok**), 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 terápiás alkalmazását ennek a *N. fischeri*-eredetű AFP-nek képzeltük el. Előzetes vizsgálataink alapján intravénásan alkalmazva az NFAP2 nem igazán alkalmas invazív gombafertőzések kezelésére köszönhetően a humán szérumalbuminhez való nagymértékű kötődésének (nem közölt adat, Kovács és mtsai. 2019). Topikális szerként viszont alkalmasnak bizonyult akár flukonazol-rezisztens *C. albicans* által okozott felületi bőr- vagy nyálkahártya fertőzés kezelésére háromdimenziós bőr-, illetve egér vulvovaginális candidiázis (VVC) modellben anélkül (**32. és 33. Ábrák**), hogy a gazdára nézve valamilyen károsító hatást váltott volna ki (Kovács és mtsai. 2019, Holzknecht és mtsai. 2020). Tekintettel arra, hogy immunszupresszált pácienseknél a felszíni mikózisok könnyen szisztémássá válhatnak az NFAP2 hatékony klinikai alkalmazása az ilyen pácienseknél és jellegű gombafertőzések esetében képzelhető el (Barlow és mtsai 2020). Ezáltal csökkenthető lehet a szervezet hagyományos gombaellenes szerekekkel történő terhelése, ami, mint tudjuk hosszan tartó terápia esetén súlyos mellékhatásokat válthat ki (Spencer és mtsai. 2023). Figyelembe véve az NFAP2 VVC modellben mutatott nagymértékű hatékonyságát (**33. Ábra**) (Kovács és mtsai. 2019), hüvelyzuhanyként történő alkalmazása elképzelhető akár hagyományos antifungális szerekekkel szemben rezisztenciát mutató gomba okozta hüvelynyálkahártya fertőzés kezelésére. Ehhez

azonban további vizsgálatok és klinikai tesztfázisokban történő sikeres szereplés szükséges. Mindenesetre az NFAP2 az eddigi antifungális szerekétől különböző, új hatásmóddal rendelkező alternatívát jelenthet a felületi mikózisok kezelésében. Napjainkban viszont a szisztémás mikózisok hatékony kezelésére alkalmas új antifungális molekulára lenne leginkább szükség a klinikumban (Wall és Lopez-Ribot 2020a). Az NFAP2 humán szérumalbuminhez való kötőképessége előnyös lehet abból a szempontból, hogy akadályozza a molekula gyors kiürülését a szervezetből és segíti annak eljutását a szervezet minden részére, viszont csökkentheti a hatékonyságát. Az NFAP2 különösen előnyös tulajdonsága lehet, ha képes átjutni a vér-agy gáton és alkalmas lenne központi idegrendszeri gombás fertőzések kezelésére, amire jelenleg nem áll rendelkezésünkre a vér-agy gáton kiválóan penetráló és nagy hatékonysággal alkalmazható szer. A fentieket figyelembe véve mindenképpen érdemes lenne az NFAP2-t olyan kisserelésben alkalmazni (pl. ciklodextrinek), amelyek javíthatják az intravénás alkalmazhatóságát.

Az NFAP, NFAP2 és γ -core peptid-származékok további gyakorlati alkalmazásának csak a fantázia szab határt. A fentebb tárgyaltakon kívül egy másik alkalmazási terület lehet a műemlékvédelem, elsősorban a beltéri falfestmények (pl. freskók) penészgombákkal szembeni védelme. Ugyanis ezek hatékony penészmentesítésére és a penészesedés megakadályozására jelenleg nem igazán állnak olyan módszerek a rendelkezésünkre, amelyek ne okoznának további állagkárosítást, mint pl. a fizikai módszerekkel vagy szerves oldószer alapú fungicidekkel történő penészmentesítés és védelem. Az NFAP és NFAP2 hatékonynak bizonyult egy műemlékvédelem alá első templom belső falairól izolált penészgombákkal szemben. Egy általunk kifejlesztett falmodell rendszerben pedig vizes oldataik felületi szerként történő alkalmazása hatékonyan gátolta egy toxinogén beltéri penész, az *Aspergillus creber* elszaporodását még három hónappal az alkalmazás után is (Dán és mtsai. 2024). Ezen kívül különösen előnyös tulajdonságuk az volt, hogy a falmodellben jelentősen csökkentették a konidíofórok, így a képződő konídiumok számát is, ami felveti alkalmazhatóságukat a beltéri penészgombák által okozott allergiás reakciók elleni küzdelemben. Kutatásaink a közeljövőben erre is irányulnak majd.

A következő években tanulmányozni kívánjuk az Eurotiomycetes-eredetű AFP-k „bubble” protein csoportjához tartozó harmadik *N. fischeri* AFP-t, az NFBP-t (10. Táblázat). Az NFBP aminosav-szekvencia szinten 76% hasonlóságot mutat az ugyanebben a csoportban megtalálható és jól jellemzett *P. chrysogenum* PAFC-hez, ami

alapján azt feltételezzük, hogy spektruma és hatékonysága eltérhet ezétől. A *P. chrysogenum* Q176-alapú expressziós rendszer alkalmatlannak bizonyult a megtermeltetésére, viszont a *P. pastoris* KM71H-alapúval ~8,4 mg/l hozamot sikerült elérnünk. Az így termelt rekombináns NFBP hatékonysága (MIC) alulmaradt az NFAP és az NFAP2-vel szemben és számos gomba a növekedését nem gátolta, amelyeket a másik kettő igen (nem közölt adatok). Igaz, a mikrodilúciós érzékenységi tesztekbe eddig csak azok a gomba izolátumok kerültek bevonásra, amelyek növekedését az NFAP és/vagy az NFAP2 hatékonyan gátolta. Ezért nem kizárt, hogy az NFBP teljesen más antifungális spektrummal rendelkezik, mint az NFAP és az NFAP2, aminek a tanulmányozása jelenleg folyamatban van.

Összefoglalásként elmondható, hogy a *N. fischeri* által szekretált AFP-k és szintetikus peptid-származékaik ígéretes biológiai-eredetű fungicid molekulák, amelyek közvetlen alkalmazása, ha nem is mindegyik fentebb vázolt problémára fog megoldást nyújtani a közeljövőben, de hatásmechanizmusuk tanulmányozása során új gomba-specifikus célpontokat táthatunk fel, amelyekre új típusú biztonságosan alkalmazható molekulák tervezhetők.

9. A legfontosabb új eredmények összefoglalása

Munkánk legfontosabb eredményeit az alábbi pontokban foglalhatjuk össze röviden:

- Kimutattuk, hogy a *Neosartorya (Aspergillus) fischeri* NRRL 181 izolátum három, különböző Eurotiomycetes-eredetű antifungális protein csoportba sorolható fehérjét termelhet: 1) a *Neosartorya fischeri* antifungális proteint, az NFAP-t (*Penicillium chrysogenum* antifungális protein, PAF-csoport), 2) a csoportnak nevet adó *N. fischeri* antifungális protein 2-t, az NFAP2-t, 3) és a *N. fischeri* „bubble” proteint, az NFBP-t (*Penicillium brevicompactum* „bubble” protein, BP-csoport). Ezekből kettőt (NFAP és NFAP2) sikerült a natív termelő folyadéktenyészetének a felülúszójából kis mennyiségben izolálnunk.
- Az NFAP-t és szerkezeti mutáns változatait nagy mennyiségben sikeresen megtermeltettük egy gyógyszer- és élelmiszeripari szempontból alapvetően biztonságosnak ítélt (GRAS, *generally recognized as safe*) *Pichia pastoris* (újabban: *Komagataella phaffii*) KM71H-alapú expressziós rendszerben.
- Az NFAP és az NFAP2 nagy mennyiségben történő előállítására és magmágneses rezonancia (NMR, *nuclear magnetic resonance*) spektroszkópiás szerkezetvizsgálatokhoz kidolgoztunk egy GRAS *P. chrysogenum* Q176-alapú expressziós rendszert, amiben mindkét fehérjét sikeresen megtermeltettük.
- Megállapítottuk az NFAP és NFAP2 antifungális spektrumait eltérő humán- és növénypatogén gomba izolátumokon, amiből azt a következtetést vontuk le, hogy az NFAP elsősorban a fonalas-, míg az NFAP2 az élesztőgombákkal szemben hatékony.
- Az NFAP2 hatékonynak bizonyult (multi)drog-rezisztens *Candida* izolátumok által képzett biofilmekkel szemben és szinergisztikus kölcsönhatásba lépett a klinikumban terápiás alkalmazott antifungális szerekkel (amfotericin B, echinokandinok, flukonazol). Növénypatogén gombákkal szemben az NFAP és az NFAP2 kombinált alkalmazása indifferens kölcsönhatást mutatott és ekkor az ún. paradox hatás is megfigyelhető volt.
- 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. Az NFAP antifungális hatékonyságát

a kétértékű kationokra disszociáló sók nagy mennyiségű jelenléte jelentősen csökkenetette. Bizonyítottuk az NFAP2 hőstabilitását.

- Felvázoltuk az NFAP lehetséges hatásmechanizmusát *Aspergillus nidulans*-on, ami alapján a fehérje egy membránba ágyazott heterotrimer G-proteinnel kapcsolt receptoron keresztül egy a ciklikus adenosin-monofoszfát/protein-kináz A szignalizációs útvonalat indukál, ami a polarizált hifanövekedés gátlásban és apoptózis indukciójában játszik szerepet. Ezen kívül apoptózist indukálhat még egy mitogén-aktivált protein-kináz által aktivált ismeretlen célponton keresztül. Mindezek rövid többszörösen elágazó hifák képződésében, a metabolikus folyamatok leállításában és végül sejthalálban nyilvánulnak meg.
- Megállapítottuk, hogy az NFAP2 minimális gátló koncentráción (MIC) alkalmazva roncsolja a *Candida albicans* sejtmembránját, ami az egyik hatásmechanizmusa lehet, és ezért a fehérje N-terminális közepregiója a felelős.
- Izotóp-jelölt (^{15}N és $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$) NFAP- és NFAP2-t állítottunk elő NMR szerkezetvizsgálatokhoz, amik alapján az NFAP harmadlagos szerkezete egy három diszulfid-híd által, *abcabc* mintázatban stabilizált kompakt β -hordó, amit hurokrégiókkal összekapcsolt öt antiparallel állású β -redő épít fel. Ezzel szemben az NFAP2-t szerkezetileg két nagy egységre lehet bontani, az N-terminális rendezetlen hurokrégióra és a C-terminális β -redőzött szerkezetre, amit hurokrégiókkal összekapcsolt három antiparallel állású β -redő alkot. Az NFAP2 harmadlagos szerkezetét szintén három diszulfid-híd stabilizálja, de *abbcac* mintázatban. Mindkét fehérje felszínén hidrofil és hidrofób; továbbá pozitív, semleges és negatív töltöttségű területek váltakozó elhelyezkedése figyelhető meg. Az előbbi nagymértékű oldhatóságot biztosít számukra különböző oldószerekben.
- 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. 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 az 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 GXC-X₃₋₉-C felépítéssel, ahol X bármilyen aminosav lehet.

- Megállapítottuk, hogy a *P. chrysogenum* által termelt PAF-fal ellentétben, az NFAP2 γ -core régió pozitív összöltésének és hidrofilitásának aminosavcserékkel történő növelése rendezetlen fehérjeszerkezetet eredményez és csökkenti az antifungális hatékonyságot. Ez azt jelezte, hogy az NFAP2 esetében a γ -core régióknak elsősorban a megfelelő feltekercsedésében és a szerkezet stabilizálásban lehet szerepe.
- 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. Az NFAP és az NFAP2 natív γ -core régiója alapján tervezett peptidek antifungálisan hatékonyvá váltak olyan aminosavcserékkel, amelyek növelték a pozitív összöltést és a hidrofilitást. Ebben az esetben az antifungális hatékonyság elsősorban a pozitív összöltéstől és nem a hidrofóbicitás értéktől függött.
- 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. 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 tágíthatja az antifungális spektrumot.
- Növényeken elvégzett toxicitásteszték alapján az NFAP és 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. Ugyanezek nem okozták a vörösvértetek hemolízisét és egy γ -core peptid-származék kivételével nem befolyásolták különböző humán sejtvonalak (keratinociták, bélhámsejtek, monociták) metabolikus aktivitását (életképességét). *Galleria mellonella* állatmodellben egyik antifungálisan aktív γ -core peptid-származék sem bizonyult ártalmasnak. 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 és a megfigyeléseink szerint akár a MIC értékének a többszöröse is biztonságosan alkalmazható lehet kután, vagy a nyálkahártyát érintő mikózisok kezelésére.
- Paradicsomnövényen elvégzett növényvédelmi kísérletek során az NFAP, és egy γ -core peptid-származéka és ezek szinergista koncentráció kombinációja topikális, kontak növényvédőszerként alkalmazva megakadályozták a *Botrytis cinerea* fertőzés kialakulását vagy annak szétterjedését a növény levágott levelén.
- Paradicsomtermésen elvégzett terményvédelmi kísérletekben az NFAP és az antifungálisan hatékony γ -core peptid-származékai megakadályozták a *Cladosporium herbarum* által okozott fertőzést, míg *B. cinerea* fertőzés tüneteit mérsékeltek.
- Háromdimenziós bőrmodellen 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.
- Flukonazol-rezisztens izolátummal végrehajtott vulvovaginális candidiázis egérmodellben az NFAP2 topikális alkalmazása szignifikánsan csökkentette a *C. albicans* élősejtszámot a vulvális és vaginális szövetekben. Hisztológiai vizsgálatok alapján az NFAP2 nem okozott súlyos patológias 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.

10. Köszönetnyilvánítás

Nehéz számba venni azt, hogy az elmúlt húsz évben kik és hogyan segítették és támogatták szakmai pályafutásomat azért, hogy eljussak ennek a dolgozatnak a megírásáig. Célszerűnek tartottam időrendben felsorolni ezeket a személyeket, ami nem feltétlenül egy fontossági sorrendet jelent, viszont a dolgomat megkönnyítette. Valószínű, hogy nem akarattal, de kihagyok valakit a felsorlásból. Tőlük előre is elnézést kérek, nem szándékos volt!

Sorban először szeretném megköszönni Prof. Dr. Vágvölgyi Csabának (SZTE, TTIK, Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszék – régebben Mikrobiológiai Tanszék) diplomamunkám és doktori dolgozatom témavezetőjének, hogy Prof. Dr. Pócsi Istvánnal (DE, TTK, Molekuláris Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszék) együtt tudományos érdeklődésemet a fonalas tömlősgombák által termelt antifungális proteinek irányába terelték. Prof. Dr. Vágvölgyi Csabának külön köszönöm, hogy a doktori évek után az általa vezetett tanszéken posztdokorként és ösztöndíjasként dolgozhattam, támogatta szakmai ötleteim megvalósítását, amikkel jelentős sikereket értem el. A fent említett személyeken keresztül kerültem kapcsolatba Dr. Florentine Marx-szal (Innsbrucki Orvosi Egyetem, Molekuláris Biológiai Intézet), akinek a laboratóriumában dolgozhattam a posztdoktori témámon 2014-2017. év között. Neki hálás vagyok az ott eltöltött éveikért, amik alatt mind szakmailag, mind emberileg sokat fejlődtem és azért, hogy az addig megszokottaktól teljesen más fényben világította meg számomra a tudományos, szakmai munkához való hozzáállást. Köszönöm neki, hogy mind a mai napig intenzív szakmai együttműködésben dolgozunk!

Az SZTE, TTIK, Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszékéről kitüntettet köszönetet szeretnék mondani a következő személyeknek ugyanebből az időszakból, akikre barátilag és/vagy szakmailag folyamatosan számíthattam az elmúlt évek alatt: Dr. Csernetics Árpád, Farkas Elvira, Prof. Dr. Gácsér Attila, Dr. Hamari Zsuzsanna, Dr. Kocsubé Sándor, Dr. Kredics László, Dr. Manczinger László, Dr. Nagy Gábor, Dr. Nyilasi Ildikó, Dr. Papp Csaba, Prof. Dr. Papp Tamás, Dr. Pfeiffer Ilona, Dr. Szébenyi Csilla, Dr. Szekeres András, Dr. Takó Miklós.

Külön köszönöm Prof. Dr. Batta Gyulának (DE, TTK, Szerves Kémiai Tanszék) már nem csak szakmainak, hanem barátnak is mondható támogatását és azt, hogy fantáziát látott az Eurotiomycetes-eredetű antifungális proteinekben és oldatbeli

szerkezetük meghatározásában. Csoportjának (köszönettel Dr. Czajlik Andrásnak, Dr. Fizil Ádámnak és Hajdu Dorottyának) eredményire építve rengetek ötletünk támadt és új kutatási irányokat jelöltünk ki. Professzor úron keresztül kerültem kapcsolatba olyan kiváló szakemberekkel, akik kutatási témámat teljesen más, elsősorban szerkezeti kémiai szempontból világították meg, ők Prof. Dr. Bodor Andrea (ELTE, Kémiai Intézet, Analitikai és BioNMR Laboratórium) és Dr. Gáspári Zoltán (PPKE, ITK). Köszönöm nekik értékes szakmai észrevételeiket és a kémiai gyorstalpalókat!

Amennyiben már a vegyészeknél tartunk, szeretném megköszönni Dr. Borics Attila (HUN-REN, SZBK, Biokémiai Intézet) elektronikus cirkuláris dikroizmus spektroszkópiás mérésekben, molekula és kölcsönhatás modellezésekbe nyújtott, a mai napig tartó folyamatos szakmai támogatását. Köszönöm!

Hálásan köszönöm Prof. Dr. Tóth Gábornak (SZTE, SZAOK, Orvosi Vegytani Intézet), aki felkarolta és támogatta az γ -core peptid-származékokkal és antifungális fehérjék kémiai szintézisével kapcsolatos ötleteinket és támogatta ezek megvalósulását. Kitüntetett köszönet illeti Dr. Váradi Györgyit, ugyanebből az intézetből, aki (a fordított fázisú nagy teljesítményű folyadékkromatográfiás tisztítások mellett) fáradhatatlanul támogatja kutatásainkat peptidek és fehérjék kémiai szintézisével, de ami a legfőbb, kiváló és új irányokba mutató szakmai ötleteivel. Köszönöm neki, hogy nem ismer lehetetlent és addig gondolkodik, majd dolgozik egy szintézis problémán, amíg meg nem tudja oldani! Ugyanebből az intézetből egy másik személynek, Dr. Kele Zoltánnak is szeretném megköszönni mindent felülmúló szakmai támogatását és profizmusát, amit tömegspektrometria mérések területén nyújt számunkra mind a mai napig.

Köszönettel tartozom kollégáimnak Dr. Florentine Marx (Innsbrucki Orvosi Egyetem, Molekuláris Biológiai Intézet) kutatócsoportjából, akikkel az elmúlt évek alatt lehetőségem adódott számos izgalmas kutatási projekten együtt dolgozni. Barátságuk és munkafegyelmük példaértékű volt. Ők a következő személyek: Dr. Jeanett Holzkecht, Dr. Anna Huber, Doris Bratschun-Khan, Dr. Christoph Sonderegger. Ugyanitt köszönettel tartozom az akkori intézetvezetőnek, Dr. Peter Loidl-nak a szakmai támogatásért.

Kutatóhelyváltások miatt nehéz volt számomra a 2018. év. Ennek elviselését és megkönnyítését nagyban segítette Dr. Maróti Gergely (HUN-REN, SZBK, Növénybiológiai Intézet), akinek a laboratóriuma befogadott minket és elkezdhattuk az antifungális proteinek és peptidek növényvédelmi alkalmazhatóságának a vizsgálatát. Szeretném megköszönni az ugyanebben a laboratóriumban dolgozó Farkas Attila

önzetlen szakmai segítségét a konfokális és pásztázó elektron mikroszkóppal történő magas színvonalú képek elkészítésében. Ugyanebből az intézetből köszönöm Dr. Nagy István támogatását és Dr. Boros Éva segítségét a humán sejtvonalakon végzett vizsgálatokban.

Ugyanebben az évben Dr. Rákhely Gábor (SZTE, TTIK, Biotechnológiai Tanszék) befogadta kutatócsoportomat az általa vezetett tanszékre, amivel egy állandó és magas színvonalú kutatóhelyet biztosított szakmai munkámnak. Kutatócsoportomat szakmailag, anyagilag és emberileg folyamatosan támogatta 2023. év novemberében bekövetkezett haláláig. Ezért mindörökre hálás leszek neki. Hiánya pótolhatatlan.

Külön köszönöm Dr. Kovács Renátónak és Dr. Majoros Lászlónak (DE, ÁOK, Orvosi Mikrobiológiai Intézet) hogy alkalmunk volt és van együtt dolgozni az NFAP2 *Candida*-ellenes hatásának a vizsgálatában. Köszönöm értékes szakmai észrevételeiket és megbízható munkájukat! Ötleitek nélkül talán mind a mai napig rejtve maradna a fehérje *in vivo* hatékonysága és biofilmroncsoló képessége.

Régi barátommal, Dr. Nagy Lászlóval (HUN-REN, SZBK, Biokémiai Intézet) az utóbbi öt évben sikerül egy gyümölcsöző szakmai kapcsolatot is kiépíteni, ami a mikroszkopikus gombákra szűkült látókörömet a kalapos gombák csodálatos világával tágitotta. Köszönöm neki és párjának Demcsák Anettnek a barátságukat és a támogatást!

Szintén az utóbbi öt-hat évben kerültem szakmai kapcsolatba Dr. Beke-Somfai Tamással (HUN-REN, TTK, Anyag- és Környezetkémiai Intézet) és kutatócsoportjának néhány tagjával (Dr. Juhász Tünde, Dr. Kohut Gergely, Pavela Olivér), akik nem csak a gombaellenes hatású peptidek növényvédelmi alkalmazásában látták meg a fantáziát, hanem nagyban segítik az NFAP2 gombaszpecifikus antifungális hatásmechanizmusának a megértését. Általuk rengeteg új, elsősorban szerkezeti kémiai ismerettel és módszerrel bővült a tudásom. Köszönöm nekik!

Ígértem, hogy időrendben haladok, de ezt meg kellett szegnem, hisz majdnem a felsorolás végére maradtak a PhD, MSc és BSc hallgatók, akik fáradhatatlanul és nagy lelkesedéssel dolgoztak a kutatási projektjeimen. A volt és mára már végzett PhD hallgatók: Dr. Kovács Laura, Dr. Virágh Máté, Dr. Homa Mónika, Dr. Tóth Liliána, Dr. Földi Csenge. Köszönöm nekik szakmai odaadásukat és azt, hogy bizalommal voltak a kutatási projektek iránt az elmúlt évek alatt! Külön szeretném megköszönni Dr. Tóth Liliánának a mai napig kitartó munkáját, azt hogy BSc hallgató kora óta a kutatócsoportom nélkülözhetetlen tagja. Nélküle nem olyan eredményesen működne a kutatócsoport, mint most. Köszönöm jelenlegi PhD hallgatóimnak és a csoporttagjaink,

hogy a Szegeden fellelhető számos kutatási projekt közül az enyéimet választották, és hogy nagy lelkesedéssel dolgoznak rajta. Ők a következő személyek: Bende Gábor, Dán Kinga, John K. Karemera, Merber Richárd, Papp Rebeka. Köszönöm az összes volt és jelenlegi BSc és MSc szakdolgozónak a témában nyújtott munkájukat!

Majdnem a végére maradt párom (Mára Petra) és kislány (Pólya Péter), akikkel egy szerető család örömét és minden nyűgjét megélhetem. Köszönöm nekik a sok szeretet, támogatást és azt, hogy kitartottak mellettem a dolgozat megírás közben. Tudom, nem volt könnyű. Köszönöm!

A legvégére hagytam a szüleimet. Hálás vagyok nekik, hogy kisgyerekkorom óta támogatták (néha csapongó) tudományos érdeklődésemet, azt hogy bíztak bennem, folyamatosan támogatták a tanulmányaimat és az álmomat, hogy felnőtt koromban kutató lehessenek. Büszke vagyok rá, hogy ők lehetnek a szüleim, minden gyermeknek ilyeneket kívánok!

Külön köszönet illeti azokat a szakmai szervezeteket, amelyek anyagi támogatásukkal segítették a dolgozat alapját képező kutatómunkámat. Ezek a következők: Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal - NKFIH (Országos Tudományos Kutatási Alap) - PD 83355, PD 135248, ANN 131341, FK 134343, K 146131; Osztrák Tudományos alap - FWF Lise Meitner Program - M1776-B20; MTA Bolyai János Kutatási Ösztöndíj; Új Nemzeti Kiválóság Program; Nemzeti Felsőoktatási Kiválóság Ösztöndíj - Bolyai+ Felsőoktatási Fiatal Oktatói, Kutatói Ösztöndíj; Konvergencia-Magyary Zoltán Posztdoktori Ösztöndíj-2012.

11. Saját közlemények jegyzéke

A folyóiratcikkek után a cikk megjelenésének évének impakt faktora (ahol nem elérhető a legutolsó évi ismert) került feltüntetésre, továbbá a cikk profiljához legjobban illeszkedő tudományterület SJR (*Scimago Journal Rank*) indikátora.

11.1. 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 (Scopus - 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

Váradi 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

Váradi 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 képző publikációk összesített impakt faktora: 70,206

Az értekezés alapját képző publikációkra kapott független hivatkozások száma: 272

11.2. Az értekezés témájához kapcsolódó, a dolgozatban idézett publikációk

- Czajlik A, Holzkecht J, **Galgóczy L**, Tóth L, Poór P, Ördög A, Váradi 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
- Holzkecht J, Kühbacher A, Papp C, Farkas A, Váradi 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;6:141. 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, Holzkecht 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.bbmem.2020.183246. IF₂₀₂₀: 3,747 (Scopus - Biophysics - SJR indikátor: Q1); Független idézők száma: 20
- Galgóczy L**, Papp T, Lukács G, Leiter E, Pócsi I, Vágvolgyi 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, Vágvolgyi 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, Vágvolgyi 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, Vágvolgyi 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 - Chemistry (miscellaneous) - SJR indikátor: Q1); 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 - Microbiology - SJR indikátor: Q1); Független idézők száma: 9

Tóth L, Boros É, Poór P, Ördög A, Kele Z, Váradi G, Holzknecht 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

11.3. Tudománymetria 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

12. Irodalomjegyzék

- Agrawal P, Bhalla S, Chaudhary K, Kumar R, Sharma M, Raghava GPS. *In silico* approach for prediction of antifungal peptides. *Front Microbiol.* 2018;9:323. doi: 10.3389/fmicb.2018.00323
- Ahmad M, Hirz M, Pichler H, Schwab H. Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2014;98:5301-5317. doi: 10.1007/s00253-014-5732-5
- Aigner M, Lass-Flörl C. Encochleated amphotericin B: Is the oral availability of amphotericin B finally reached? *J Fungi (Basel).* 2020;6:66. doi: 10.3390/jof6020066
- Arastehfar A, Gabaldón T, Garcia-Rubio R, Jenks JD, Hoenigl M, Salzer HJF, és mtsai. Drug-resistant fungi: An emerging challenge threatening our limited antifungal armamentarium. *Antibiotics (Basel).* 2020;9:877. doi: 10.3390/antibiotics9120877
- Ashley ED. Antifungal drugs: Special problems treating central nervous system infections. *J Fungi (Basel).* 2019;5:97. doi: 10.3390/jof5040097
- Barakat H, Spielvogel A, Hassan M, El-Desouky A, El-Mansy H, Rath F, és mtsai. The antifungal protein AFP from *Aspergillus giganteus* prevents secondary growth of different *Fusarium* species on barley. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2010;87:617-624. doi: 10.1007/s00253-010-2508-4
- Barakat H, Hassan M, El-Desouky AI, Stahl U, El-Mansy H. The antifungal protein AFP from *Aspergillus giganteus* prevents *Alternaria* spoilage on tomato and mango fruits during storage. In: The 1st International Conference on Biotechnology Applications in Agriculture, Benha University, Moshtohor and Hurghada, 18-22 February, (2012): 29-38.
- Barakat H. Bio-control of *Alternaria alternata* during banana storage by purified AFP using isoelectric focusing technique. *Food Nutr Sci* 2014;5:1482-1495. doi: 10.4236/fns.2014.515161
- Barker D, Pfaff T, Moreau D, Groves E, Ruffel S, Lepetit M, és mtsai. Growing *M. truncatula*: choice of substrates and growth conditions. In: *Medicago truncatula* Handbook (Szerk.: Journet E-P és Mathesius U). Ardmore: The Samuel Roberts Noble Fondation. (2006): 1-25.
- Barlow G, Irving WL, Moss PJ. 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.
- Barna B, Leiter E, Hegedus N, Bíró T, Pócsi I. Effect of the *Penicillium chrysogenum* antifungal protein (PAF) on barley powdery mildew and wheat leaf rust pathogens. *J Basic Microbiol.* 2008;48:516-520. doi: 10.1002/jobm.200800197
- Batta G, Barna T, Gáspári Z, Sándor S, Kövér KE, Binder U, 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. doi: 10.1111/j.1742-4658.2009.07011.x
- Beckerman J, Palmer C, Tedford E, Ypema H. Fifty years of fungicide Development, deployment, and future use. *Phytopathology.* 2023;113:694-706. doi: 10.1094/PHYTO-10-22-0399-IA
- Belanger ES, Yang E, Forrest GN. Combination antifungal therapy: When, where, and why. *Curr Clin Micro Rpt.* 2015;2:67-75. doi: 10.1007/s40588-015-0017-z
- Bencina M, Legisa M, Read ND. Cross-talk between cAMP and calcium signalling in *Aspergillus niger*. *Mol Microbiol.* 2005;56:268-281. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04541.x

- Bende G, Zsindely N, Laczi K, Kristóffy Zs, Papp Cs, Farkas A, és mtsai. The *Neosartorya (Aspergillus) fischeri* antifungal protein NFAP2 has low potential to trigger resistance development in *Candida albicans* *in vitro*. bioRxiv. 2024;594093. doi: <https://doi.org/10.1101/2024.05.14.594093>
- Benedict K, Whitham HK, Jackson BR. Economic burden of fungal diseases in the United States. Open Forum Infect Dis. 2022; 9:ofac097. doi: 10.1093/ofid/ofac097
- Bhattacharyya R, Pal D, Chakrabarti P. Disulfide bonds, their stereospecific environment and conservation in protein structures. Protein Eng Des Sel. 2004;17:795-808. doi: 10.1093/protein/gzh093
- Binder U, Oberparleiter C, Meyer V, Marx F. The antifungal protein PAF interferes with PKC/MPK and cAMP/PKA signalling of *Aspergillus nidulans*. Mol Microbiol. 2010;75:294-307. doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06936.x
- Binder U, Bencina M, Eigentler A, Meyer V, Marx F. The *Aspergillus giganteus* antifungal protein AFP_{NN5353} activates the cell wall integrity pathway and perturbs calcium homeostasis. BMC Microbiol. 2011;11:209. doi: 10.1186/1471-2180-11-209
- Björn C, Håkansson J, Myhrman E, Sjöstrand V, Haug T, Lindgren K, és mtsai. Anti-infectious and anti-inflammatory effects of peptide fragments sequentially derived from the antimicrobial peptide centrocin 1 isolated from the green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*. AMB Express. 2012;2:67. doi: 10.1186/2191-0855-2-67
- Bondaryk M, Staniszevska M, Zielińska P, Urbańczyk-Lipkowska Z. Natural antimicrobial peptides as inspiration for design of a new generation antifungal compounds. J Fungi. 2017;3:46. doi: 10.3390/jof3030046
- Borghi E, Borgo F, Morace G. Fungal biofilms: Update on resistance. Adv Exp Med Biol. 2016;931:37-47. doi: 10.1007/5584_2016_7
- Bourdichon F, Casaregola S, Farrokh C, Frisvad JC, Gerds ML, Hammes WP, és mtsai. Food fermentations: microorganisms with technological beneficial use. Int J Food Microbiol. 2012;154:87-97. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.12.030
- Bouz G, Doležal M. Advances in antifungal drug development: An up-to-date mini review. Pharmaceuticals (Basel). 2021;14:1312. doi: 10.3390/ph14121312
- Brand SR, Degenhardt TP, Person K, Sobel JD, Nyirjesy P, Schotzinger RJ, és mtsai. A phase 2, randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-ranging study to evaluate the efficacy and safety of orally administered VT-1161 in the treatment of recurrent vulvovaginal candidiasis. Am J Obstet Gynecol. 2018;218:624.e1-624.e9. doi: 10.1016/j.ajog.2018.03.001
- Brauer VS, Rezende CP, Pessoni AM, De Paula RG, Rangappa KS, Nayaka SC, és mtsai. Antifungal agents in agriculture: Friends and foes of public health. Biomolecules. 2019;9:521. doi: 10.3390/biom9100521
- Brito C, Hansen H, Espinoza L, Faúndez M, Olea AF, Pino S, 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. doi: 10.3390/plants10081719
- Buchan DW, Minneci F, Nugent TC, Bryson K, Jones DT. Scalable web services for the PSIPRED Protein Analysis Workbench. Nucleic Acids Res. 2013;41:W349-57. doi: 10.1093/nar/gkt381
- Buchta V, Otcenášek M. Factors affecting the results of a broth microdilution antifungal susceptibility testing *in vitro*. Zentralbl Bakteriол. 1996;283:375-390. doi: 10.1016/s0934-8840(96)80073-9

- Buda De Cesare G, Cristy SA, Garsin DA, Lorenz MC. Antimicrobial peptides: A new frontier in antifungal therapy. *mBio*. 2020;11:e02123-20. doi: 10.1128/mBio.02123-20
- Bugeda A, Garrigues S, Gandía M, Manzanares P, Marcos JF, Coca M. The antifungal protein AfpB induces regulated cell death in its parental fungus *Penicillium digitatum*. *mSphere*. 2020;5:e00595-20. doi: 10.1128/mSphere.00595-20
- Bulaj G. Formation of disulfide bonds in proteins and peptides. *Biotechnol Adv*. 2005;23:87-92. doi: 10.1016/j.biotechadv.2004.09.002
- Bussink HJ, Osmani SA. A mitogen-activated protein kinase (MPKA) is involved in polarized growth in the filamentous fungus, *Aspergillus nidulans*. *FEMS Microbiol Lett*. 1999;173:117-125. doi: 10.1111/j.1574-6968.1999.tb13492.x
- Camilloni C, Bonetti D, Morrone A, Giri R, Dobson CM, Brunori M, és mtsai. Towards a structural biology of the hydrophobic effect in protein folding. *Sci Rep*. 2016;6:28285. doi: 10.1038/srep28285
- Campitelli M, Zeineddine N, Samaha G, Maslak S. Combination antifungal therapy: A review of current data. *J Clin Med Res*. 2017;9:451-456. doi: 10.14740/jocmr2992w
- Campos-Olivas R, Bruix M, Santoro J, Lacadena J, Martinez del Pozo A, Gavilanes JG, és mtsai. NMR solution structure of the antifungal protein from *Aspergillus giganteus*: evidence for cysteine pairing isomerism. *Biochemistry*. 1995;34:3009-3021. doi: 10.1021/bi00009a032
- Carmo A, Rocha M, Pereirinha P, Tomé R, Costa E. Antifungals: From pharmacokinetics to clinical practice. *Antibiotics (Basel)*. 2023;12:884. doi: 10.3390/antibiotics12050884
- Carter CW Jr, LeFebvre BC, Cammer SA, Tropsha A, Edgell MH. Four-body potentials reveal protein-specific correlations to stability changes caused by hydrophobic core mutations. *J Mol Biol*. 2001;311:625-638. doi: 10.1006/jmbi.2001.4906
- Castillo L, Plaza V, Larrondo LF, Canessa P. Recent advances in the study of the plant pathogenic fungus *Botrytis cinerea* and its interaction with the environment. *Curr Protein Pept Sci*. 2017;976-989. doi: 10.2174/1389203717666160809160915
- Casu A, Camardo Leggieri M, Toscano P, Battilani P. Changing climate, shifting mycotoxins: A comprehensive review of climate change impact on mycotoxin contamination. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2024;23:e13323. doi: 10.1111/1541-4337.13323
- Cavalheiro M, Teixeira MC. *Candida* biofilms: Threats, challenges, and promising strategies. *Front Med (Lausanne)*. 2018;5:28. doi: 10.3389/fmed.2018.00028
- Ceroni A, Passerini A, Vullo A, Frasconi P. DISULFIND: a disulfide bonding state and cysteine connectivity prediction server. *Nucleic Acids Res*. 2006;34:W177-181. doi: 10.1093/nar/gkl266
- Cheung MS, García AE, Onuchic JN. 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. doi: 10.1073/pnas.022387699
- Ciociola T, Giovati L, Conti S, Magliani W, Santinoli C, Polonelli L. Natural and synthetic peptides with antifungal activity. *Future Med Chem*. 2016;8:1413-1433. doi: 10.4155/fmc-2016-0035
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved Standard – third edition. In: CLSI Document M27-A3, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA (2008a). ISBN 1-56238-666-2

- Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; Approved Standard – second edition. In: CLSI Document M38-A2, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA (2008b). ISBN 1-56238-668-9
- Coca M, Bortolotti C, Rufat M, Peñas G, Eritja R, Tharreau D, és mtsai. Transgenic rice plants expressing the antifungal AFP protein from *Aspergillus giganteus* show enhanced resistance to the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. Plant Mol Biol. 2004;54:245-259. doi: 10.1023/B:PLAN.0000028791.34706.80
- Colabardini AC, De Castro PA, De Gouvêa PF, Savoldi M, Malavazi I, Goldman MH, és mtsai. Involvement of the *Aspergillus nidulans* protein kinase C with farnesol tolerance is related to the unfolded protein response. Mol Microbiol. 2010;78:1259-1279. doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07403.x
- Corkley I, Fraaije B, Hawkins N. Fungicide resistance management: Maximizing the effective life of plant protection products. Plant Pathology. 2022;71:150-169. doi: 10.1111/ppa.13467
- Czajlik A, Holzknecht J, Galgóczy L, Tóth L, Poór P, Ördög A, és mtsai. Solution structure, dynamics, and new antifungal aspects of the cysteine-rich miniprotein PAFC. Int J Mol Sci. 2021;22:1183. doi: 10.3390/ijms22031183
- Davies CR, Wohlgemuth F, Young T, Violet J, Dickinson M, Sanders JW, és mtsai. Evolving challenges and strategies for fungal control in the food supply chain. Fungal Biol Rev. 2021;36:15-26. doi: 10.1016/j.fbr.2021.01.003
- 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.
- de Oliveira HC, Bezerra BT, Rodrigues ML. Antifungal development and the urgency of minimizing the impact of fungal diseases on public health. ACS Bio Med Chem Au. 2022;3:137-146. doi: 10.1021/acsbiochemau.2c00055
- de Ullivarri MF, Arbulu S, Garcia-Gutierrez E, Cotter PD. Antifungal peptides as therapeutic agents. Front Cell Infect Microbiol. 2020;10:105. doi: 10.3389/fcimb.2020.00105
- Denning DW. Antifungal drug resistance: an update. Eur J Hosp Pharm. 2022;29:109-112. doi: 10.1136/ejhpharm-2020-002604
- Denning DW. Global incidence and mortality of severe fungal disease. Lancet Infect Dis. 2024;24:e428-e438. doi: 10.1016/S1473-3099(23)00692-8
- Deo S, Turton KL, Kainth T, Kumar A, Wieden HJ. Strategies for improving antimicrobial peptide production. Biotechnol Adv. 2022;59:107968. doi: 10.1016/j.biotechadv.2022.107968
- Deresa EM, Diriba TF. Phytochemicals as alternative fungicides for controlling plant diseases: A comprehensive review of their efficacy, commercial representatives, advantages, challenges for adoption, and possible solutions. Heliyon. 2023;9:e13810. doi: 10.1016/j.heliyon.2023
- Do N, Weindl G, Grohmann L, Salwiczek M, Koksche B, Korting HC, és mtsai. Cationic membrane-active peptides - anticancer and antifungal activity as well as penetration into human skin. Exp Dermatol. 2014;23:326-331. doi: 10.1111/exd.12384
- Dongari-Bagtzoglou A, Kashleva H. *Candida albicans* triggers interleukin-8 secretion by oral epithelial cells. Microb Pathog. 2003;34:169-177. doi: 10.1016/s0882-4010(03)00004-4

- EFSA. Guidance on risk assessment of the application of nanoscience and nanotechnologies in the food and feed chain: part 1, human and animal health. EFSA J. 2018;16: 5327. 10.2903/j.efsa.2018.5327
- Eskola M, Kos G, Elliott CT, Hajšlová J, Mayar S, Krska R. Worldwide contamination of food-crops with mycotoxins: Validity of the widely cited 'FAO estimate' of 25. Crit Rev Food Sci Nutr. 2020;60:2773-2789. doi: 10.1080/10408398.2019.1658570
- European Environment Agency. How pesticides impact human health and ecosystems in Europe. 2023. ISBN: 978-92-9480-560-7 - ISSN: 2467-3196 - doi: 10.2800/98285. <https://www.eea.europa.eu/publications/how-pesticides-impact-human-health>
- 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, Hamada MS, Li N, Li GQ, Luo CX. Multiple fungicide resistance in *Botrytis cinerea* from greenhouse strawberries in Hubei province, China. Plant Dis. 2017;101:601-606. doi: 10.1094/PDIS-09-16-1227-RE
- Faway E, Cambier L, De Vuyst E, Evrard C, Thiry M, Lambert de Rouvroit C, és mtsai. Responses of reconstructed human epidermis to *Trichophyton rubrum* infection and impairment of infection by the inhibitor PD169316. J Invest Dermatol. 2019;139:2080-2089.e6. doi: 10.1016/j.jid.2019.03.1147
- Fisher MC, Gurr SJ, Cuomo CA, Blehert DS, Jin H, Stukenbrock EH, és mtsai. Threats posed by the fungal kingdom to humans, wildlife, and agriculture. mBio. 2020;11:e00449-20. doi: 10.1128/mBio.00449-20
- Fisher MC, Alastruey-Izquierdo A, Berman J, Bicanic T, Bignell EM, Bowyer P, és mtsai. Tackling the emerging threat of antifungal resistance to human health. Nat Rev Microbiol. 2022;20:557-571. doi: 10.1038/s41579-022-00720-1
- Fisher MC, Denning DW. The WHO fungal priority pathogens list as a game-changer. Nat Rev Microbiol. 2023;21:211-212. doi: 10.1038/s41579-023-00861-x
- Fink S, Burmester A, Hipler UC, Neumeister C, Götz MR, Wiegand C. Efficacy of antifungal agents against fungal spores: An *in vitro* study using microplate laser nephelometry and an artificially infected 3D skin model. Microbiologyopen. 2022;11:e1257. doi: 10.1002/mbo3.1257
- Fizil Á, Gáspári Z, Barna T, Marx F, Batta G. "Invisible" conformers of an antifungal disulfide protein revealed by constrained cold and heat unfolding, CEST-NMR experiments, and molecular dynamics calculations. Chemistry. 2015;21:5136-5144. doi: 10.1002/chem.201404879
- Fox EP, Singh-Babak SD, Hartooni N, Nobile CJ. Biofilms and antifungal resistance. In: Antifungals: From Genomics to Resistance and the Development of Novel Agents (Szerk.: Coste AT és Vandeputte P). Caister Academic Press, U.K. (2015): 71-90. <https://doi.org/10.21775/9781910190012.04>
- Fuentefria AM, Pippi B, Dalla Lana DF, Donato KK, de Andrade SF. Antifungals discovery: an insight into new strategies to combat antifungal resistance. Lett Appl Microbiol. 2018;66:2-13. doi: 10.1111/lam.12820
- Galgóczy L, Papp T, Lukács G, Leiter E, Pócsi I, Vágvolgyi 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

- 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
- 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, Bajadóz, Spain (2010): 550-559. ISBN-13: 978-84-614-6195-0
- 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. (2013a): 217-223. ISSN 2063-4803
- 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)*. 2013b;159:411-419. doi: 10.1099/mic.0.061119-0
- Galgóczy L, Borics A, Virágh M, Ficze H, Váradi G, Kele Z, és mtsai. 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
- 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
- Gandía M, Garrigues S, Hernanz-Koers M, Manzanares P, Marcos JF. Differential roles, crosstalk and response to the antifungal protein AfpB in the three mitogen-activated protein kinases (MAPK) pathways of the citrus postharvest pathogen *Penicillium digitatum*. *Fungal Genet Biol*. 2019;124:17-28. doi: 10.1016/j.fgb.2018.12.006
- Gandía M, Kakar A, Giner-Llorca M, Holzknacht 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. doi: 10.3390/jof7060449
- Gandía M, Moreno-Giménez E, Giner-Llorca M, Garrigues S, Ropero-Pérez C, Locascio A, és mtsai. Development of a FungalBraid *Penicillium expansum*-based expression system for the production of antifungal proteins in fungal biofactories. *Microb Biotechnol*. 2022;15:630-647. doi: 10.1111/1751-7915.14006.
- Garrigues S, Gandía M, Borics A, Marx F, Manzanares P, Marcos JF. Mapping and identification of antifungal peptides in the putative antifungal protein AfpB from the filamentous fungus *Penicillium digitatum*. *Front Microbiol*. 2017;8:592. doi: 10.3389/fmicb.2017.00592
- Garrigues S, Gandía M, Castillo L, Coca M, Marx F, Marcos JF, és mtsai. Three antifungal proteins from *Penicillium expansum*: Different patterns of production and antifungal activity. *Front Microbiol*. 2018;9:2370. doi: 10.3389/fmicb.2018.02370
- Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, 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. doi: 10.1385/1592598900

- 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. doi: 10.1016/s0168-1605(00)00367-6
- Gikas GD, Parlakidis P, Mavropoulos T, Vryzas Z. Particularities of fungicides and factors affecting their fate and removal efficacy: A review. *Sustainability* 2022;14:4056. <https://doi.org/10.3390/su14074056>
- Giner-Llorca M, Locascio A, Del Real JA, Marcos JF, Manzanares P. Novel findings about the mode of action of the antifungal protein PeAfpA against *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2023a;107:6811-6829. doi: 10.1007/s00253-023-12749-0
- Giner-Llorca M, Gallego del Sol F, Marcos JF, Marina A, Manzanares P. Rationally designed antifungal protein chimeras reveal new insights into structure-activity relationship. *Int J Biol Macromol.* 2023b;225:135-148. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2022.11.280
- Girgi M, Breese WA, Lörz H, Oldach KH. Rust and downy mildew resistance in pearl millet (*Pennisetum glaucum*) mediated by heterologous expression of the *afp* gene from *Aspergillus giganteus*. *Transgenic Res.* 2006;15:313-324. doi: 10.1007/s11248-006-0001-8
- Gonçalves B, Ferreira C, Alves CT, Henriques M, Azeredo J, Silva S. Vulvovaginal candidiasis: Epidemiology, microbiology and risk factors. *Crit Rev Microbiol.* 2016;42:905-927. doi: 10.3109/1040841X.2015.1091805
- Górska K, Blaszkowska J, Dzikowiec M. Neuroinfections caused by fungi. *Infection.* 2018;46:443-459. doi: 10.1007/s15010-018-1152-2
- Guest GM, Lin X, Momany M. *Aspergillus nidulans* RhoA is involved in polar growth, branching, and cell wall synthesis. *Fungal Genet Biol.* 2004;41:13-22. doi: 10.1016/j.fgb.2003.08.006
- Gun Lee D, Shin SY, Maeng CY, Jin ZZ, Kim KL, Hahn KS. Isolation and characterization of a novel antifungal peptide from *Aspergillus niger*. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;263:646-651. doi: 10.1006/bbrc.1999.1428
- Hagen S, Marx F, Ram AF, Meyer V. The antifungal protein AFP from *Aspergillus giganteus* inhibits chitin synthesis in sensitive fungi. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73:2128-2134. doi: 10.1128/AEM.02497-06
- Hajdu D, Huber A, Czajlik A, Tóth L, Kele Z, Kocsubé S, 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. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.02.016
- Hall FR. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 1999;41:95-98. doi: 10.1021/bk-1999-0734.ch008
- Harper LA, Paton S, Hall B, McKay S, Oliver RP, Lopez-Ruiz FJ. Fungicide resistance characterized across seven modes of action in *Botrytis cinerea* isolated from Australian vineyards. *Pest Manag Sci.* 2022;78:1326-1340. doi: 10.1002/ps.6749
- Hawkins NJ, Fraaije BA. Fitness penalties in the evolution of fungicide resistance. *Annu Rev Phytopathol.* 2018;56:339-360. doi: 10.1146/annurev-phyto-080417-050012
- Hegedüs N, Sigl C, Zadra I, Pócsi I, Marx F. The *paf* gene product modulates asexual development in *Penicillium chrysogenum*. *J Basic Microbiol.* 2011;51:253-262. doi: 10.1002/jobm.201000321
- Hegedüs N, Marx F. Antifungal proteins: More than antimicrobials? *Fungal Biol Rev.* 2013;26:132-145. doi: 10.1016/j.fbr.2012.07.002

- Hisashi M, Fuse S. Recent advances in the solid- and solution-phase synthesis of peptides and proteins using microflow technology. *Res Dev*. 2022;26:1751-1765. doi: 10.1021/acs.oprd.2c00074
- Holzknacht J, Kühbacher A, Papp C, Farkas A, Váradi G, Marcos JF, és mtsai. The *Penicillium chrysogenum* Q176 antimicrobial protein PAFC effectively inhibits the growth of the opportunistic human pathogen *Candida albicans*. *J Fungi (Basel)*. 2020;6:141. doi: 10.3390/jof6030141
- 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
- Houšť J, Spížek J, Havlíček V. Antifungal drugs. *Metabolites*. 2020;10:106. doi: 10.3390/metabo10030106
- Hoy SM. Oteseconazole: First approval. *Drugs*. 2022;82:1017-1023. doi: 10.1007/s40265-022-01734-y
- Huber A, Hajdu D, Bratschun-Khan D, Gáspári Z, Varbanov M, Philippot S, és mtsai. 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
- Huber A, Galgóczy L, Váradi G, Holzknacht J, Kakar A, Malanovic N, 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. doi: 10.1016/j.bbamem.2020.183246
- Ignasiak K, Maxwell A. *Galleria mellonella* (greater wax moth) larvae as a model for antibiotic susceptibility testing and acute toxicity trials. *BMC Res Notes*. 2017;10:428. doi: 10.1186/s13104-017-2757-8
- Ikuta KS, Meštrović T, Naghavi M. Global incidence and mortality of severe fungal disease. *Lancet Infect Dis*. 2024;24:e268. doi: 10.1016/S1473-3099(24)00102-6
- Imamura T, Yamamoto N, Tamura A, Murabayashi S, Hashimoto S, Shimada H, és mtsai. NMR based structure-activity relationship analysis of an antimicrobial peptide, thanatin, engineered by site-specific chemical modification: Activity improvement and spectrum alteration. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;369:609-615. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.02.057
- Ishii, H. New chemical fungicides in relation to risk for resistance development. *Trop Plant Pathol*. 2024;49:18-35. doi: 10.1007/s40858-023-00596-3
- Ivanov M, Ćirić A, Stojković D. Emerging antifungal targets and strategies. *Int J Mol Sci*. 2022;23:2756. doi: 10.3390/ijms23052756
- Javed F, Al-Askar M, Al-Hezaimi K. Cytokine profile in the gingival crevicular fluid of periodontitis patients with and without type 2 diabetes: a literature review. *J Periodontol*. 2012;83:156-161. doi: 10.1902/jop.2011.110207
- Jelenić J, Ilić J, Ćosić J, Vrandečić K, Velki M. 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, Bauer MA, Madeo F, Carmona-Gutierrez D. Fungal infections in humans: the silent crisis. *Microb Cell*. 2020;7:143-145. doi: 10.15698/mic2020.06.718
- Kaiserer L, Oberparleiter C, Weiler-Görz R, Burgstaller W, Leiter E, Marx F. Characterization of the *Penicillium chrysogenum* antifungal protein PAF. *Arch Microbiol*. 2003;180:204-210. doi: 10.1007/s00203-003-0578-8

- Katayama T, Uchida H, Ohta A, Horiuchi H. Involvement of protein kinase C in the suppression of apoptosis and in polarity establishment in *Aspergillus nidulans* under conditions of heat stress. PLoS One. 2012;7:e50503. doi: 10.1371/journal.pone.0050503
- Kim JH, Cheng LW, Chan KL, Tam CC, Mahoney N, Friedman M, és mtsai. Antifungal drug repurposing. Antibiotics (Basel). 2020;9:812. doi: 10.3390/antibiotics9110812
- Klüver E, Adermann K, Schulz A. Synthesis and structure-activity relationship of beta-defensins, multi-functional peptides of the immune system. J Pept Sci. 2006;12:243-257. doi: 10.1002/psc.749
- Kneale M, Bartholomew JS, Davies E, Denning DW. Global access to antifungal therapy and its variable cost. J Antimicrob Chemother. 2016;71:3599-3606. doi: 10.1093/jac/dkw325
- Konakbayeva D, Karlsson AJ. Strategies and opportunities for engineering antifungal peptides for therapeutic applications. Curr Opin Biotechnol. 2023;81:102926. doi: 10.1016/j.copbio.2023.102926
- Kovaleva V, Bukhteeva I, Kit OY, Nesmelova IV. Plant defensins from a structural perspective. Int J Mol Sci. 2020;21:5307. doi: 10.3390/ijms21155307
- Kovács B, Hegedűs N, Bálint M, Szabó Z, Emri T, Kiss G, és mtsai. *Penicillium* antifungal protein (PAF) is involved in the apoptotic and autophagic processes of the producer *Penicillium chrysogenum*. Acta Microbiol Immunol Hung. 2014;61:379-388. doi: 10.1556/AMicr.61.2014.3.10
- 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
- Kovács R, Holzknacht J, Hargitai Z, Papp C, Farkas A, Borics A, és mtsai. *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
- Kovács R, Nagy F, Tóth Z, Forgács L, Tóth L, Váradi G, 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. doi: 10.3390/ijms22020771
- Kubiczek D, Raber H, Gonzalez-García M, Morales-Vicente F, Staendker L, Otero-Gonzalez AJ, és mtsai. Derivates of the antifungal peptide Cm-p5 inhibit development of *Candida auris* biofilms *in vitro*. Antibiotics (Basel). 2020;9:363. doi: 10.3390/antibiotics9070363
- Kudryashova E, Seveau SM, Kudryashov DS. Targeting and inactivation of bacterial toxins by human defensins. Biol Chem. 2017;398:1069-1085. doi: 10.1515/hsz-2017-0106
- Kumar P, Kizhakkedathu JN, Straus SK. Antimicrobial peptides: Diversity, mechanism of action and strategies to improve the activity and biocompatibility *in vivo*. Biomolecules. 2018;8:4. doi: 10.3390/biom8010004
- Kühbacher A, Henkel H, Stevens P, Grumaz C, Finkelmeier D, Burger-Kentscher A, és mtsai. Central role for dermal fibroblasts in skin model protection against *Candida albicans*. J Infect Dis. 2017;215:1742-1752. doi: 10.1093/infdis/jix153
- Lacadena J, Martínez del Pozo A, Gasset M, Patiño B, Campos-Olivas R, Vázquez C, és mtsai. Characterization of the antifungal protein secreted by the mould *Aspergillus giganteus*. Arch Biochem Biophys. 1995;324:273-281. doi: 10.1006/abbi.1995.0040

- Lacerda AF, Vasconcelos EA, Pelegrini PB, Grossi de Sa MF. Antifungal defensins and their role in plant defense. *Front Microbiol.* 2014;5:116. doi: 10.3389/fmicb.2014.00116
- Lamberth C. Latest research trends in agrochemical fungicides: Any learnings for pharmaceutical antifungals? *ACS Med Chem Lett.* 2022;13:895-903. doi: 10.1021/acsmchemlett.2c00113
- Langfeldt A, Gold JAW, Chiller T. Emerging fungal infections: from the fields to the clinic, resistant *Aspergillus fumigatus* and dermatophyte species: a one health perspective on an urgent public health problem. *Curr Clin Microbiol Rep.* 2022;9:46-51. doi: 10.1007/s40588-022-00181-3
- Lass-Flörl C, Steixner S. The changing epidemiology of fungal infections. *Mol Aspects Med.* 2023;94:101215. doi: 10.1016/j.mam.2023.101215
- Lee A. Ibrexafungerp: First approval. *Drugs.* 2021;81:1445-1450. doi: 10.1007/s40265-021-01571-5
- Leiter E, Szappanos H, Oberparleiter C, Kaiserer L, Csernoch L, Pusztahelyi T, és mtsai. Antifungal protein PAF severely affects the integrity of the plasma membrane of *Aspergillus nidulans* and induces an apoptosis-like phenotype. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49:2445-2453. doi: 10.1128/AAC.49.6.2445-2453.2005
- Leiter É, Gáll T, Csernoch L, Pócsi I. Biofungicide utilizations of antifungal proteins of filamentous ascomycetes: current and foreseeable future developments. *Biocontrol (Dordr).* 2017;62:125-138. doi: 10.1007/s10526-016-9781-9
- Lepak AJ, Andes DR. Antifungal pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2014;5:a019653. doi: 10.1101/cshperspect.a019653
- Li P, Huang Y, Fu C, Jiang SX, Peng W, Jia Y, és mtsai. Eco-friendly biomolecule-nanomaterial hybrids as next-generation agrochemicals for topical delivery. *EcoMat.* 2021a;3:e12132. doi: 10.1002/eom2.12132
- Li T, Li L, Du F, Sun L, Shi J, Long M, és mtsai. Activity and mechanism of action of antifungal peptides from microorganisms: A review. *Molecules.* 2021b;26:3438. doi: 10.3390/molecules26113438
- Lian J, Han H, Zhao J, Li C. *In-vitro* and in-planta *Botrytis cinerea* inoculation assays for tomato. *Bio Protoc.* 2018;8:e2810. doi: 10.21769/BioProtoc.2810
- Lima AM, Azevedo MIG, Sousa LM, Oliveira NS, Andrade CR, Freitas CDT, és mtsai. Plant antimicrobial peptides: An overview about classification, toxicity and clinical applications. *Int J Biol Macromol.* 2022;214:10-21. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2022.06.043
- Liu D, Garrigues S, de Vries RP. Heterologous protein production in filamentous fungi. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2023;107:5019-5033. doi: 10.1007/s00253-023-12660-8
- Lobo Vicente J, Ganzleben C, Gasol R, Marnane I, Gilles L, Buckers 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. doi: 10.1016/j.ijheh.2023.114111
- Lockhart SR, Chowdhary A, Gold JAW. The rapid emergence of antifungal-resistant human-pathogenic fungi. *Nat Rev Microbiol.* 2023;21:818-832. doi: 10.1038/s41579-023-00960-9
- López-García B, Moreno AB, San Segundo B, De los Ríos V, Manning JM, Gavilanes JG, és mtsai. Production of the biotechnologically relevant AFP from *Aspergillus giganteus* in the yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif.* 2010;70:206-210. doi: 10.1016/j.pep.2009.11.002
- Lovell SC, Davis IW, Arendall WB 3rd, de Bakker PI, Word JM, Prisant MG, és mtsai. Structure validation by Calpha geometry: phi,psi and Cbeta deviation. *Proteins.* 2003;50:437-450. doi: 10.1002/prot.10286

- Lucht JM. Public acceptance of plant biotechnology and GM crops. *Viruses*. 2015;7:4254-4281. doi: 10.3390/v7082819
- Marchaim D, Lemanek L, Bheemreddy S, Kaye KS, Sobel JD. Fluconazole-resistant *Candida albicans* vulvovaginitis. *Obstet Gynecol*. 2012;120:1407-1414. doi: 10.1097/aog.0b013e31827307b2
- Marchand PA. EU chemical plant protection products in 2023: Current state and perspectives. *Agrochemicals* 2023a; 2:106-117. doi: 10.3390/agrochemicals2010008
- Marchand PA. Evolution of plant protection active substances in Europe: the disappearance of chemicals in favour of biocontrol agents. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2023b;30:1-17. doi: 10.1007/s11356-022-24057-7
- Martinez-Rossi NM, Peres NTA, Bitencourt TA, Martins MP, Rossi A. State-of-the-art dermatophyte infections: Epidemiology aspects, pathophysiology, and resistance mechanisms. *J Fungi (Basel)*. 2021;7:629. doi: 10.3390/jof7080629
- Martínez-Culebras PV, Gandía M, Garrigues S, Marcos JF, Manzanares P. Antifungal peptides and proteins to control toxigenic fungi and mycotoxin biosynthesis. *Int J Mol Sci*. 2021a;22:13261. doi: 10.3390/ijms222413261
- Martínez-Culebras PV, Gandía M, Boronat A, Marcos JF, Manzanares P. Differential susceptibility of mycotoxin-producing fungi to distinct antifungal proteins (AFPs). *Food Microbiol*. 2021b;97:103760. doi: 10.1016/j.fm.2021.103760
- Martínez-Ruiz A, Martínez del Pozo A, Lacadena J, Mancheño JM, Oñaderra M, Gavilanes JG. Characterization of a natural larger form of the antifungal protein (AFP) from *Aspergillus giganteus*. *Biochim Biophys Acta*. 1997;1340:81-87. doi: 10.1016/s0167-4838(97)00038-1
- Marx F, Haas H, Reindl M, Stöffler G, Lottspeich F, Redl B. 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. doi: 10.1016/0378-1119(95)00701-6
- 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. doi: 10.1007/s00253-004-1600-z
- Mattar EH, Almeshdar HA, Yacoub HA, Uversky VN, Redwan EM. Antimicrobial potentials and structural disorder of human and animal defensins. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2016;28:95-111. doi: 10.1016/j.cytogfr.2015.11.002
- Mazzei T, Novelli A. Pharmacological properties of antifungal drugs with a focus on anidulafungin. *Drugs*. 2009;69 Suppl 1:79-90. doi: 10.2165/11315550-000000000-00000
- Mercer DK, O'Neil DA. Innate inspiration: Antifungal peptides and other immunotherapeutics from the host immune response. *Front Immunol*. 2020;11:2177. doi: 10.3389/fimmu.2020.02177
- Merk H, Amran-Gealia T, Finkelmeier D, Kohl C, Pichota I, Stern N, és mtsai. Human-based immune responsive *in vitro* infection models for validation of novel TLR4 antagonists identified by computational discovery. *Microorganisms*. 2022;10:243. doi: 10.3390/microorganisms10020243
- Meyer V. A small protein that fights fungi: AFP as a new promising antifungal agent of biotechnological value. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2008;78:17-28. doi: 10.1007/s00253-007-1291-3

- Meyer V, Jung S. Antifungal peptides of the AFP family revisited: Are these cannibal toxins? *Microorganisms*. 2018;6:50. doi: 10.3390/microorganisms6020050
- Moreno AB, Del Pozo AM, Borja M, Segundo BS. Activity of the antifungal protein from *Aspergillus giganteus* against *Botrytis cinerea*. *Phytopathology*. 2003;93:1344-1353. doi: 10.1094/PHYTO.2003.93.11.1344
- Moreno AB, Peñas G, Rufat M, Bravo JM, Estopà M, Messeguer J, és mtsai. Pathogen-induced production of the antifungal AFP protein from *Aspergillus giganteus* confers resistance to the blast fungus *Magnaporthe grisea* in transgenic rice. *Mol Plant Microbe Interact*. 2005;18:960-972. doi: 10.1094/MPMI-18-0960
- Munson M, Balasubramanian S, Fleming KG, Nagi AD, O'Brien R, Sturtevant JM, és mtsai. What makes a protein a protein? Hydrophobic core designs that specify stability and structural properties. *Protein Sci*. 1996;5:1584-1593. doi: 10.1002/pro.5560050813
- Muzny CA, Schwebke JR. Biofilms: An underappreciated mechanism of treatment failure and recurrence in vaginal infections. *Clin Infect Dis*. 2015;61:601-606. doi: 10.1093/cid/civ353
- Neupane R, Boddu SHS, Renukuntla J, Babu RJ, Tiwari AK. Alternatives to biological skin in permeation studies: Current trends and possibilities. *Pharmaceutics*. 2020;12:152. doi: 10.3390/pharmaceutics12020152
- Ng SM, Yap YY, Cheong JW, Ng FM, Lau QY, Barkham T, és mtsai. Antifungal peptides: a potential new class of antifungals for treating vulvovaginal candidiasis caused by fluconazole-resistant *Candida albicans*. *J Pept Sci*. 2017;23:215-221. doi: 10.1002/psc.2970
- Nicola AM, Albuquerque P, Paes HC, Fernandes L, Costa FF, Kioshima ES és mtsai. Antifungal drugs: New insights in research & development. *Pharmacol Ther*. 2019;195:21-38. doi: 10.1016/j.pharmthera.2018.10.008
- Nnadi NE, Carter DA. Climate change and the emergence of fungal pathogens. *PLoS Pathog*. 2021;17:e1009503. doi: 10.1371/journal.ppat.1009503
- Nordberg H, Cantor M, Dusheyko S, Hua S, Poliakov A, Shabalov I, és mtsai. The genome portal of the Department of Energy Joint Genome Institute: 2014 updates. *Nucleic Acids Res*. 2014;42:D26-31. doi: 10.1093/nar/gkt1069
- O' Connor PM, O' Shea EF, Cotter PD, Hill C, Ross RP. The potency of the broad spectrum bacteriocin, bactofencin A, against staphylococci is highly dependent on primary structure, N-terminal charge and disulphide formation. *Sci Rep*. 2018;8:11833. doi: 10.1038/s41598-018-30271-6
- O' Leary JM, Radcliffe CM, Willis AC, Dwek RA, Rudd PM, Downing AK. 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. doi: 10.1016/j.pep.2004.08.010
- Oldach KH, Becker D, Lörz H. Heterologous expression of genes mediating enhanced fungal resistance in transgenic wheat. *Mol Plant Microbe Interact*. 2001;14:832-838. doi: 10.1094/MPMI.2001.14.7.832
- Olsen JG, Flensburg C, Olsen O, Bricogne G, Henriksen A. Solving the structure of the bubble protein using the anomalous sulfur signal from single-crystal in-house Cu K α diffraction data only. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2004;60:250-255. doi: 10.1107/S0907444903025927

- Oshiro KGN, Rodrigues G, Monges BED, Cardoso MH, Franco OL. Bioactive peptides against fungal biofilms. *Front Microbiol.* 2019;10:2169. doi: 10.3389/fmicb.2019.02169
- Paeye N, Jung S, Schäpe P, Müller-Hagen D, Ouedraogo JP, Heiderich C, és mtsai. A transcriptome meta-analysis proposes novel biological roles for the antifungal protein AnAFP in *Aspergillus niger*. *PLoS One.* 2016;11:e0165755. doi: 10.1371/journal.pone.0165755
- Palicz Z, Jenes A, Gáll T, Miszti-Blasius K, Kollár S, Kovács I, és mtsai. *In vivo* application of a small molecular weight antifungal protein of *Penicillium chrysogenum* (PAF). *Toxicol Appl Pharmacol.* 2013;269:8-16. doi: 10.1016/j.taap.2013.02.014
- Palicz Z, Gáll T, Leiter É, Kollár S, Kovács I, Miszti-Blasius K, és mtsai. Application of a low molecular weight antifungal protein from *Penicillium chrysogenum* (PAF) to treat pulmonary aspergillosis in mice. *Emerg Microbes Infect.* 2016;5:e114. doi: 10.1038/emi.2016.116
- Palmieri D, Ianiri G, Del Grosso C, Barone G, De Curtis F, Castoria R, és mtsai. Advances and perspectives in the use of biocontrol agents against fungal plant diseases. *Horticulturae* 2022;8:577. doi: 10.3390/horticulturae8070577
- Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR, Clancy CJ, Marr KA, Ostrosky-Zeichner L, és mtsai. Clinical practice guideline for the management of candidiasis: 2016 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 2016;62:e1-50. doi: 10.1093/cid/civ933
- Pathadka S, Yan VKC, Neoh CF, Al-Badriyeh D, Kong DCM, Slavin MA, és mtsai. Global consumption trend of antifungal agents in humans from 2008 to 2018: Data from 65 middle- and high-income countries. *Drugs.* 2022;82:1193-1205. doi: 10.1007/s40265-022-01751-x
- Pathakumari B, Liang G, Liu W. Immune defence to invasive fungal infections: A comprehensive review. *Biomed Pharmacother.* 2020;130:110550. doi: 10.1016/j.biopha.2020.110550
- Pavela O, Juhász T, Tóth L, Czajlik A, Batta G, Galgóczy L, és mtsai. Mapping of the lipid-binding regions of the antifungal protein NFAP2 by exploiting model membranes. *J Chem Inf Model.* 2024;64:6557-6569. doi: 10.1021/acs.jcim.4c00229
- Pál T, Abraham B, Sonnevend A, Jumaa P, Conlon JM. Brevinin-1BYa: a naturally occurring peptide from frog skin with broad-spectrum antibacterial and antifungal properties. *Int J Antimicrob Agents.* 2006;27:525-529. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2006.01.010
- Perlin DS, Rautemaa-Richardson R, Alastruey-Izquierdo A. The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. *Lancet Infect Dis.* 2017;17:e383-e392. doi: 10.1016/S1473-3099(17)30316-X
- Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, és mtsai. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem.* 2004;25:1605-1612. doi: 10.1002/jcc.20084
- Pfaller MA, Messer SA, Georgopapadakou N, Martell LA, Besterman JM, Diekema DJ. Activity of MGCD290, a Hos2 histone deacetylase inhibitor, in combination with azole antifungals against opportunistic fungal pathogens. *J Clin Microbiol.* 2009;47:3797-3804. doi: 10.1128/JCM.00618-09
- Pfaller MA, Diekema DJ, Turnidge JD, Castanheira M, Jones RN. Twenty years of the SENTRY antifungal surveillance program: Results for *Candida* species from 1997-2016. *Open Forum Infect Dis.* 2019;6(Suppl 1):S79-S94. doi: 10.1093/ofid/ofy358

- Pfuhler S, Pirow R, Downs TR, Haase A, Hewitt N, Luch A, és mtsai. Validation of the 3D reconstructed human skin Comet assay, an animal-free alternative for following-up positive results from standard *in vitro* genotoxicity assays. *Mutagenesis*. 2021;36:19-35. doi: 10.1093/mutage/geaa009
- Pillai SK, Moellering RC Jr, Eliopoulos GM. Antimicrobial combinations. In: *Antibiotics in laboratory medicine* (Szerk: Lorian V). Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, USA (2005): 365-344.
- Pimienta DA, Cruz Mosquera FE, Palacios Velasco I, Giraldo Rodas M, Oñate-Garzón J, Liscano Y. Specific focus on antifungal peptides against azole resistant *Aspergillus fumigatus*: Current status, challenges, and future perspectives. *J Fungi*. 2022;9:42. doi: 10.3390/jof9010042
- Puumala E, Fallah S, Robbins N, Cowen LE. Advancements and challenges in antifungal therapeutic development. *Clin Microbiol Rev*. 2024;37:e0014223. doi: 10.1128/cmr.00142-23
- Rautenbach M, Troskie AM, Vosloo JA. Antifungal peptides: To be or not to be membrane active. *Biochimie*. 2016;130:132-145. doi: 10.1016/j.biochi.2016.05.013
- Reddy GKK, Padmavathi AR, Nanchaiah YV. Fungal infections: Pathogenesis, antifungals and alternate treatment approaches. *Curr Res Microb Sci*. 2022;3:100137. doi: 10.1016/j.crmicr.2022.100137
- Riera F, Caeiro JP, Sotomayor CE. Antifungal stewardship in low- and middle-income countries. *Curr Treat Options Infect Dis*. 2019;11:292-299. doi: 10.1007/s40506-019-00197-2
- Robbins N, Wright GD, Cowen LE. Antifungal drugs: The current armamentarium and development of new agents. *Microbiol Spectr*. 2016;4. doi: 10.1128/microbiolspec.FUNK-0002-2016
- Robertson R, Wentworth J. Understanding insect decline: data and driver. UK Parliament Post (Parliamentary Office of Science and Technology). 2020. <https://researchbriefings.files.parliament.uk/documents/POST-PB-0036/POST-PB-0036.pdf>
- Rodrigues ML, Nosanchuk JD. Fungal diseases as neglected pathogens: A wake-up call to public health officials. *PLoS Negl Trop Dis*. 2020;14:e0007964. doi: 10.1371/journal.pntd.0007964
- Rodríguez-Castaño GP, Rosenau F, Ständer L, Firacative C. Antimicrobial peptides: Avant-garde antifungal agents to fight against medically important *Candida* species. *Pharmaceutics*. 2023;15:789. doi: 10.3390/pharmaceutics15030789
- Romera D, Aguilera-Correa JJ, Gadea I, Viñuela-Sandoval L, García-Rodríguez J, Esteban J. *Candida auris*: a comparison between planktonic and biofilm susceptibility to antifungal drugs. *J Med Microbiol*. 2019;68:1353-1358. doi: 10.1099/jmm.0.001036
- Ronen R, Sharon H, Levinsky E, Romano J, Shadkhan Y, Osherov N. The *Aspergillus nidulans pkcA* gene is involved in polarized growth, morphogenesis and maintenance of cell wall integrity. *Curr Genet*. 2007;51:321-329. doi: 10.1007/s00294-007-0129-y
- Ropero-Pérez C, Bolós B, Giner-Llorca M, Locascio A, Garrigues S, Gandía M, és mtsai. Transcriptomic profile of *Penicillium digitatum* reveals novel aspects of the mode of action of the antifungal protein AfpB. *Microbiol Spectr*. 2023;11:e0484622. doi: 10.1128/spectrum.04846-22
- Ropero-Pérez C, Moreno-Giménez E, Marcos JF, Manzanares P, Gandía M. Studies on the biological role of the antifungal protein PeAfpA from *Penicillium expansum* by functional gene characterization and transcriptomic profiling. *Int J Biol Macromol*. 2024;266:131236. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2024.131236

- Rosa S, Pesaresi P, Mizzotti C, Bulone V, Mezzetti B, Baraldi E, és mtsai. Game-changing alternatives to conventional fungicides: small RNAs and short peptides. *Trends Biotechnol.* 2022;40:320-337. doi: 10.1016/j.tibtech.2021.07.003
- Rueda C, Puig-Asensio M, Guinea J, Almirante B, Cuenca-Estrella M, Zaragoza O, és mtsai. Evaluation of the possible influence of trailing and paradoxical effects on the clinical outcome of patients with candidemia. *Clin Microbiol Infect.* 2017;23:49.e1-49.e8. doi: 10.1016/j.cmi.2016.09.016
- Rupp S, Weber RW, Rieger D, Detzel P, Hahn M. Spread of *Botrytis cinerea* strains with multiple fungicide resistance in German horticulture. *Front Microbiol.* 2017;3:2075. doi: 10.3389/fmicb.2016.02075
- Sagaram US, Pandurangi R, Kaur J, Smith TJ, Shah DM. Structure-activity determinants in antifungal plant defensins MsDef1 and MtDef4 with different modes of action against *Fusarium graminearum*. *PLoS One.* 2011;6:e18550. doi: 10.1371/journal.pone.0018550
- Sahl HG, Pag U, Bonness S, Wagner S, Antcheva N, Tossi A. Mammalian defensins: structures and mechanism of antibiotic activity. *J Leukoc Biol.* 2005;77:466-475. doi: 10.1189/jlb.0804452
- Saleh I, Al-Thani R. Fungal food spoilage of supermarkets' displayed fruits. *Vet World.* 2019;12:1877-1883. doi: 10.14202/vetworld.2019.1877-188
- Sali A, Potterton L, Yuan F, van Vlijmen H, Karplus M. Evaluation of comparative protein modeling by MODELLER. *Proteins.* 1995;23:318-326. doi: 10.1002/prot.340230306
- Sayers EW, Bolton EE, Brister JR, Canese K, Chan J, Comeau DC, és mtsai. Database resources of the national center for biotechnology information. *Nucleic Acids Res.* 2022;50:D20-D26. doi: 10.1093/nar/gkab1112
- Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1813:878-888. doi: 10.1016/j.bbamcr.2011.01.034
- Schmaltz S, Silva MA, Ninaus RG, Guedes JVC, Zabet GL, Tres MV, és mtsai. Biomolecules in modern and sustainable agriculture. *3 Biotech.* 2023;13:70. doi: 10.1007/s13205-023-03486-2
- Schmidt C. Fungal diseases are spreading undetected. *Nature.* 2024; doi: 10.1038/d41586-024-00751-z
- Semighini CP, Hornby JM, Dumitru R, Nickerson KW, Harris SD. Farnesol-induced apoptosis in *Aspergillus nidulans* reveals a possible mechanism for antagonistic interactions between fungi. *Mol Microbiol.* 2006;59:753-764. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04976.x
- Shaw KJ, Ibrahim AS. Fosmanogepix: A review of the first-in-class broad spectrum agent for the treatment of invasive fungal infections. *J Fungi (Basel).* 2020;6:239. doi: 10.3390/jof6040239
- Sherry L, Kean R, McKloud E, O'Donnell LE, Metcalfe R, Jones BL, és mtsai. Biofilms formed by isolates from recurrent vulvovaginal candidiasis patients are heterogeneous and insensitive to fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61:e01065-17. doi: 10.1128/AAC.01065-17
- Shi X, Cordero T, Garrigues S, Marcos JF, Daròs JA, Coca M. Efficient production of antifungal proteins in plants using a new transient expression vector derived from tobacco mosaic virus. *Plant Biotechnol J.* 2019;17:1069-1080. doi: 10.1111/pbi.13038
- Shimizu K, Keller NP. Genetic involvement of a cAMP-dependent protein kinase in a G protein signaling pathway regulating morphological and chemical transitions in *Aspergillus nidulans*. *Genetics.* 2001;157:591-600. doi: 10.1093/genetics/157.2.591

- Singh BK, Delgado-Baquerizo M, Egidi E, Guirado E, Leach JE, Liu H, és mtsai. Climate change impacts on plant pathogens, food security and paths forward. *Nat Rev Microbiol.* 2023;21:640-656. doi: 10.1038/s41579-023-00900-7
- Singh Y, Nair AM, Verma PK. Surviving the odds: From perception to survival of fungal phytopathogens under host-generated oxidative burst. *Plant Commun.* 2021;2:100142. doi: 10.1016/j.xplc.2021.100142
- Smith DJ, Gold JAW, Benedict K, Wu K, Lyman M, Jordan A, és mtsai. Public health research priorities for fungal diseases: A multidisciplinary approach to save lives. *J Fungi (Basel).* 2023;9:820. doi: 10.3390/jof9080820
- Sobel JD. Vulvovaginal candidosis. *Lancet.* 2007;369:1961-1971. doi: 10.1016/S0140-6736(07)60917-9
- Sobel JD. Factors involved in patient choice of oral or vaginal treatment for vulvovaginal candidiasis. Patient Prefer Adherence. 2013;8:31-34. doi: 10.2147/PPA.S38984
- 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. doi: 10.1186/s12934-016-0586-4
- Sonderegger C, Váradi G, Galgóczy L, Kocsubé S, Posch W, Borics A, 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. doi: 10.3389/fmicb.2018.01655
- Sousa F, Ferreira D, Reis S, Costa P. Current insights on antifungal therapy: Novel nanotechnology approaches for drug delivery systems and new drugs from natural sources. *Pharmaceuticals (Basel).* 2020;13:248. doi: 10.3390/ph13090248
- Spencer AC, Brubaker KR, Garneau-Tsodikova S. Systemic fungal infections: A pharmacist/researcher perspective. *Fung Biol Rev.* 2023;44:100293. doi: 10.1016/j.fbr.2022.11.001
- Steinberg G, Gurr SJ. Fungi, fungicide discovery and global food security. *Fungal Genet Biol.* 2020;144:103476. doi: 10.1016/j.fgb.2020.103476
- Struyfs C, Cammue BPA, Thevissen K. Membrane-interacting antifungal peptides. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:649875. doi: 10.3389/fcell.2021.649875
- Stukenbrock E, Gurr S. Address the growing urgency of fungal disease in crops. *Nature.* 2023;617:31-34. doi: 10.1038/d41586-023-01465-4
- Sun N, Xie Y, Sheng C, Cao Y, Zhang W, Chen H, és mtsai. *In vivo* pharmacokinetics and *in vitro* antifungal activity of iodiconazole, a new triazole, determined by microdialysis sampling. *Int J Antimicrob Agents.* 2013;41:229-235. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2012.10.020
- Syed YY. Rezafungin: First approval. *Drugs.* 2023;83:833-840. doi: 10.1007/s40265-023-01891-8
- Szappanos H, Szigeti GP, Pál B, Rusznák Z, Szucs G, Rajnavölgyi E, és mtsai. The *Penicillium chrysogenum*-derived antifungal peptide shows no toxic effects on mammalian cells in the intended therapeutic concentration. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2005;371:122-132. doi: 10.1007/s00210-004-1013-7
- Tagliabue G. The EU legislation on "GMOs" between nonsense and protectionism: An ongoing Schumpeterian chain of public choices. *GM Crops Food.* 2017;8:57-73. doi: 10.1080/21645698.2016.1270488

- Taheri-Talesh N, Horio T, Araujo-Bazán L, Dou X, Espeso EA, Peñalva MA, és mtsai. The tip growth apparatus of *Aspergillus nidulans*. Mol Biol Cell. 2008;19:1439-1449. doi: 10.1091/mbc.e07-05-0464
- Tang R, Tan H, Dai Y, Li L, Huang Y, Yao H, és mtsai. Application of antimicrobial peptides in plant protection: making use of the overlooked merits. Front Plant Sci. 2023;14:1139539. doi: 10.3389/fpls.2023.1139539
- Tannenbaum J, Bennett BT. Russell and Burch's 3Rs then and now: the need for clarity in definition and purpose. J Am Assoc Lab Anim Sci. 2015;54:120-132.
- Taudorf EH, Jemec GBE, Hay RJ, Saunte DML. Cutaneous candidiasis - an evidence-based review of topical and systemic treatments to inform clinical practice. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2019;33:1863-1873. doi: 10.1111/jdv.15782
- Taylor K, Barran PE, Dorin JR. Structure-activity relationships in beta-defensin peptides. Biopolymers. 2008;90:1-7. doi: 10.1002/bip.20900
- Theis T, Wedde M, Meyer V, Stahl U. The antifungal protein from *Aspergillus giganteus* causes membrane permeabilization. Antimicrob Agents Chemother. 2003;47:588-593. doi: 10.1128/AAC.47.2.588-593.2003
- Theis T, Marx F, Salvenmoser W, Stahl U, Meyer V. New insights into the target site and mode of action of the antifungal protein of *Aspergillus giganteus*. Res Microbiol. 2005;156:47-56. doi: 10.1016/j.resmic.2004.08.006
- Thery T, Lynch KM, Arendt EK. Natural antifungal peptides/proteins as model for novel food preservatives. Compr Rev Food Sci Food Saf. 2019;18:1327-1360. doi: 10.1111/1541-4337.12480
- Thind TS. Changing trends in discovery of new fungicides: a perspective. Indian Phytopathology 2021;74: 875-883. doi: 10.1007/s42360-021-00411-6
- Tillotson J, Tillotson GS. The regulatory pathway for antifungal drugs: A US Perspective. Clin Infect Dis. 2015;61 Suppl 6:S678-683. doi: 10.1093/cid/civ819
- Tleuova AB, Wielogorska E, Talluri VSSLP, Štěpánek F, Elliott CT, Grigoriev DO. Recent advances and remaining barriers to producing novel formulations of fungicides for safe and sustainable agriculture. J Control Release. 2020;326:468-481. doi: 10.1016/j.jconrel.2020.07.035
- Torres R, Barreto-Santamaría A, Arévalo-Pinzón G, Firacative C, Gómez BL, Escandón P, és mtsai. In vitro antifungal activity of three synthetic peptides against *Candida auris* and other *Candida* species of medical importance. Antibiotics (Basel). 2023;12:1234. doi: 10.3390/antibiotics12081234
- 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. doi: 10.1186/s13568-016-0250-8
- 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. doi: 10.3389/fmicb.2018.00393
- 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. 2020a;11:820. doi: 10.3389/fmicb.2020.00820

- Tóth L, Boros É, Poór P, Ördög A, Kele Z, Váradi G, 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. doi: 10.1111/1751-7915.13559
- 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. doi: 10.1007/s10526-022-10132-y
- Torres MDT, Sothiselvam S, Lu TK, de la Fuente-Nunez C. Peptide design principles for antimicrobial applications. *J Mol Biol.* 2019;431:3547-3567. doi: 10.1016/j.jmb.2018.12.015
- UniProt Consortium. UniProt: the universal protein knowledgebase in 2023. *Nucleic Acids Res.* 2023;51:D523-D531. doi: 10.1093/nar/gkac1052
- Van der Fels-Klerx HJ, Liu C, Battilani P. Modelling climate change impacts on mycotoxin contamination. *World Mycotoxin J.* 2016;9:717-726 doi: 10.3920/WMJ2016.2066
- Van Dijck P. Nutrient sensing G protein-coupled receptors: interesting targets for antifungals? *Med Mycol.* 2009;47:671-680. doi: 10.3109/13693780802713349
- Vande Zande P, Zhou X, Selmecki A. The dynamic fungal genome: Polyploidy, aneuploidy and copy number variation in response to stress. *Annu Rev Microbiol.* 2023;77:341-361. doi: 10.1146/annurev-micro-041320-112443
- Vanreppelen G, Wuyts J, Van Dijck P, Vandecruys P. Sources of Antifungal Drugs. *J Fungi (Basel).* 2023;9:171. doi: 10.3390/jof9020171
- Vanzolini T, Magnani M. Old and new strategies in therapy and diagnosis against fungal infections. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2024;108:147. doi: 10.1007/s00253-023-12884-8
- Vazquez JA, Sobel JD. Mucosal candidiasis. *Infect Dis Clin North Am.* 2002;16:793-820, v. doi: 10.1016/s0891-5520(02)00042-9
- 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
- Váradi G, Kele Z, Czajlik A, Borics A, Bende G, Papp C, és mtsai. Hard nut to crack: Solving the disulfide linkage pattern of the *Neosartorya (Aspergillus) fischeri* antifungal protein 2. *Protein Sci.* 2023a;32:e4692. doi: 10.1002/pro.4692
- Váradi G, Batta G, Galgóczy L, Hajdu D, Fizil Á, Czajlik A, és mtsai. Confirmation of the disulfide connectivity and strategies for chemical synthesis of the four-disulfide-bond-stabilized *Aspergillus giganteus* antifungal protein, AFP. *J Nat Prod.* 2023b;86:782-790. doi: 10.1021/acs.jnatprod.2c00954
- Váradi G, Bende G, Borics A, Dán K, Rákhely G, Tóth GK, 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. doi: 10.1021/acsomega.3c09377
- Vila L, Lacadena V, Fontanet P, Martinez del Pozo A, San Segundo B. A protein from the mold *Aspergillus giganteus* is a potent inhibitor of fungal plant pathogens. *Mol Plant Microbe Interact.* 2001;14:1327-1331. doi: 10.1094/MPMI.2001.14.11.1327
- Virágh M, Vörös D, Kele Z, Kovács L, Fizil Á, Lakatos G, és mtsai. Production of a defensin-like antifungal protein NFAP from *Neosartorya fischeri* in *Pichia pastoris* and its antifungal activity against filamentous

- fungus isolates from human infections. *Protein Expr Purif.* 2014;94:79-84. doi: 10.1016/j.pep.2013.11.003
- Virágh M, Marton A, Vizler C, Tóth L, Vágvolgyi C, Marx F, és mtsai. Insight into the antifungal mechanism of *Neosartorya fischeri* antifungal protein. *Protein Cell.* 2015;6:518-528. doi: 10.1007/s13238-015-0167-z
- Wagener J, Loiko V. Recent Insights into the paradoxical effect of echinocandins. *J Fungi (Basel).* 2017;4:5. doi: 10.3390/jof4010005
- Wall G, Lopez-Ribot JL. Current antimycotics, new prospects, and future approaches to antifungal therapy. *Antibiotics (Basel).* 2020a;9:445. doi: 10.3390/antibiotics9080445
- Wall G, Lopez-Ribot JL. Screening repurposing libraries for identification of drugs with novel antifungal activity. *Antimicrob Agents Chemother.* 2020b;64:e00924-20. doi: 10.1128/AAC.00924-20
- Wang G, Li X, Wang Z. APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(D1):D1087-1093. doi: 10.1093/nar/gkv1278
- Waterhouse AM, Procter JB, Martin DM, Clamp M, Barton GJ. Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics.* 2009;25:1189-1191. doi: 10.1093/bioinformatics/btp033
- Weber RWS, Petridis A. Fungicide resistance in *Botrytis* spp. and regional strategies for its management in Northern European strawberry production. *BioTech (Basel).* 2023;12:64. doi: 10.3390/biotech12040064
- Wiederhold NP. Review of the novel investigational antifungal olorofim. *J Fungi (Basel).* 2020;6:122. doi: 10.3390/jof6030122
- Williamson B, Tudzynski B, Tudzynski P, van Kan JA. *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Mol Plant Pathol.* 2007;8:561-580. doi: 10.1111/j.1364-3703.2007.00417.x.
- Wirth F, Ishida K. Antifungal drugs: An updated review of central nervous system pharmacokinetics. *Mycoses.* 2020;63:1047-1059. doi: 10.1111/myc.13157
- Wnendt S, Ulbrich N, Stahl U. Molecular cloning, sequence analysis and expression of the gene encoding an antifungal-protein from *Aspergillus giganteus*. *Curr Genet.* 1994;25:519-523. doi: 10.1007/BF00351672.
- 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.
- Xu D, Zhang Y. Improving the physical realism and structural accuracy of protein models by a two-step atomic-level energy minimization. *Biophys J.* 2011;101:2525-2534. doi: 10.1016/j.bpj.2011.10.024
- Xu R, Tang J, Hadianamrei R, Liu S, Lv S, You R, és mtsai. Antifungal activity of designed α -helical antimicrobial peptides. *Biomater Sci.* 2023;11:2845-2859. doi: 10.1039/d2bm01797k
- Yang YL, Xiang ZJ, Yang JH, Wang WJ, Xu ZC, Xiang RL. Adverse effects associated with currently commonly used antifungal agents: A network meta-analysis and systematic review. *Front Pharmacol.* 2021;12:697330. doi: 10.3389/fphar.2021.697330

- Yin Y, Miao J, Shao W, Liu X, Zhao Y, Ma Z. Fungicide resistance: Progress in understanding mechanism, monitoring, and management. *Phytopathology*. 2023;113:707-718. doi: 10.1094/PHYTO-10-22-0370-KD
- Yount NY, Yeaman MR. Structural congruence among membrane-active host defense polypeptides of diverse phylogeny. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1758:1373-1386. doi: 10.1016/j.bbamem.2006.03.027
- Zhang Q, Liu F, Zeng M, Mao Y, Song Z. Drug repurposing strategies in the development of potential antifungal agents. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2021;105:5259-5279. doi: 10.1007/s00253-021-11407-7
- Zhang Y-M, Ye D-X, Liu Y, Zhang X-Y, ZhouY-L, Zhang L, és mtsai. Peptides, new tools for plant protection in eco-agriculture. *Advanced Agrochem*. 2023;2:58-78 doi: 10.1016/j.aac.2023.01.003
- Zhu P, Li Y, Guo T, Liu S, Tancer RJ, Hu C, és mtsai. New antifungal strategies: Drug combination and co-delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 2023;198:114874. doi: 10.1016/j.addr.2023.114874
- Zubrod JP, Bundschuh M, Arts G, Brühl CA, Imfeld G, Knäbel A, és mtsai. Fungicides: An overlooked pesticide class? *Environ Sci Technol*. 2019;53:3347-3365. doi: 10.1021/acs.est.8b04392

13. Mellékletek

1. Melléklet. A *Neosartorya fischeri* antifungális protein (NFAP) gombaellenes hatásmechanizmusának felderítése során használt *Aspergillus nidulans* törzsek.

Fajnév	Az izolátum kódja/törzsgyűjteményi azonosító	Az izolálás adatai/egyéb adatok
<i>Aspergillus nidulans</i>	FGSC A4	genotípus: <i>Glasgow wild type</i>
<i>Aspergillus nidulans</i>	FGSC 116	genotípus: <i>yA2</i>
<i>Aspergillus nidulans</i>	FGSC 1035	genotípus: <i>yA2fadAG203R</i> ; Ronen és mtsai. (2007)
<i>Aspergillus nidulans</i>	R153	genotípus: <i>wA2;pyroA4</i> ; Ronen és mtsai. (2007)
<i>Aspergillus nidulans</i>	<i>alcA-pkcA</i>	genotípus: <i>wA2; pyroA4; pyrG89::pyr4alcA(p)::pkcAΔp</i> ; Ronen és mtsai. (2007)
<i>Aspergillus nidulans</i>	GR5	genotípus: <i>pyrG89; wA3; pyroA4</i> ; Guest és mtsai. (2004)
<i>Aspergillus nidulans</i>	RhoA ^{G14V}	<i>A773+pGG2 (rhoA^{G14})</i> és <i>pRG3AMA1</i> ; Guest és mtsai. (2004)
<i>Aspergillus nidulans</i>	<i>AmpkA</i>	genotípus: <i>AmpkA</i> ; Bussink és Osmani (1999)
<i>Aspergillus nidulans</i>	RKIS1	genotípus: <i>papaA1; yA2</i> ; Shimizu és Keller (2001)
<i>Aspergillus nidulans</i>	<i>ΔpkA</i>	genotípus: <i>papaA1; yA2; ΔpkA::argB; ΔargB::trpC; trpC801; veA1</i> ; Shimizu és Keller (2001)
<i>Aspergillus nidulans</i>	Actin GFP	Taheri-Talesh és mtsai. (2008)

GFP: zöld fluoreszcens fehérje (*green fluorescent protein*). Törzsgyűjtemények: FGSC: Fungal Genetics Stock Center, Kansas, MO, USA. Virágh és mtsai. (2015) alapján.

2. Melléklet. *Aspergillus nidulans* törzsek növekedése *in vitro* mikrodilúciós érzékenységi tesztekben különböző koncentrációjú *Neosartorya fischeri* antifungális protein (NFAP) jelenlétében 48 óra, 30°C (*alcA-PkcA*, R153) vagy 37°C-on történt statikus inkubáció után komplett tápközegben.

NFAP / törzs	200 µg/ml	100 µg/ml	50 µg/ml	Típus
RhoA ^{G14V}	48±15,2%	57±4,5%	86±15,5%	mutáns
<i>AmpkA</i>	108±9,1%***	105±6,7%***	103±0,9%	mutáns
GR5	47±7,5%	58±5,4 %	83±11,9%	a Rho ^{G14V} és a <i>AmpkA</i> szülői törzse
<i>alcA-pkcA</i> ^a	48±10,6%***	57±0,6%	64±12,5%***	mutáns
<i>alcA-pkcA</i> ^b	74±7,6%	77±0,5%	99±0,2%	mutáns
R153	72±2,8%	83±4,4%	102±1,8%	az <i>alcA-PkcA</i> szülői törzse
<i>ΔpkA</i>	56±6,1%***	69±5,3%***	83±11,5%**	mutáns
RKIS1	40±2,7%	48±1,6%	66±4,0%	a <i>ΔpkA</i> szülői törzse
FGSC 1035	52±1,9%*	78±0,2%***	101±0,4%***	mutáns
FGSC 116	42±6,7%	59±1,9%	75±2,3%	az FGSC 1035 szülői törzse

A kezeletlen kontroll törzs növekedését tekintettük 100%-nak és az egyes cellákban a kontrollhoz viszonyított növekedési százalékokat tüntettük fel. *,**,***: $p<0,05$, $p<0,005$, $p<0,0001$ - szignifikáns növekedéscsökkenés (egyszempontos varianciaanalízis, Bonferroni-féle többszörös összehasonlítás) a kezeletlen kontrollhoz (100% növekedés) viszonyítva. a: *A. nidulans alcA-pkcA* törzs glükóz jelenlétében. b: *A. nidulans alcA-PkcA* törzs glicerol jelenlétében. A táblázat három független kísérletből (kísérletenként $n=3$) származó eredmények átlagértékét tünteti fel szórással együtt. Virágh és mtsai. (2015) alapján.

3. Melléklet. *Aspergillus nidulans* FGSC A4 és Δ *pkaA* törzsek érzékenysége különböző koncentrációjú *Neosartorya fischeri* antifungális protein (NFAP) és NFAP+5 mM 8-Br-cAMP/20 mM koffein kombinációk jelenlétében 48 óráig, 37 °C-on történt statikus inkubáció után komplett tápközegeben.

NFAP / egyéb hatóanyagok	0 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml	200 µg/ml
FGSC A4				
NFAP	100%	91±6,0%	67±6,7%	52±3,2%
NFAP+5 mM 8-Br-cAMP	0±1,6%	58±4,2%***	57±3,8%***	41±3,2%***
NFAP+20 mM koffein	71±2,1%	74±3,7%	61±2,6%***	108±1,5%***
Δ<i>pkaA</i>				
NFAP	100%	83±11,5%	69±5,3%	56±6,1%
NFAP+20 mM koffein	63±6,5%	123±7,9%***	195±30,6%***	196±3,0%***

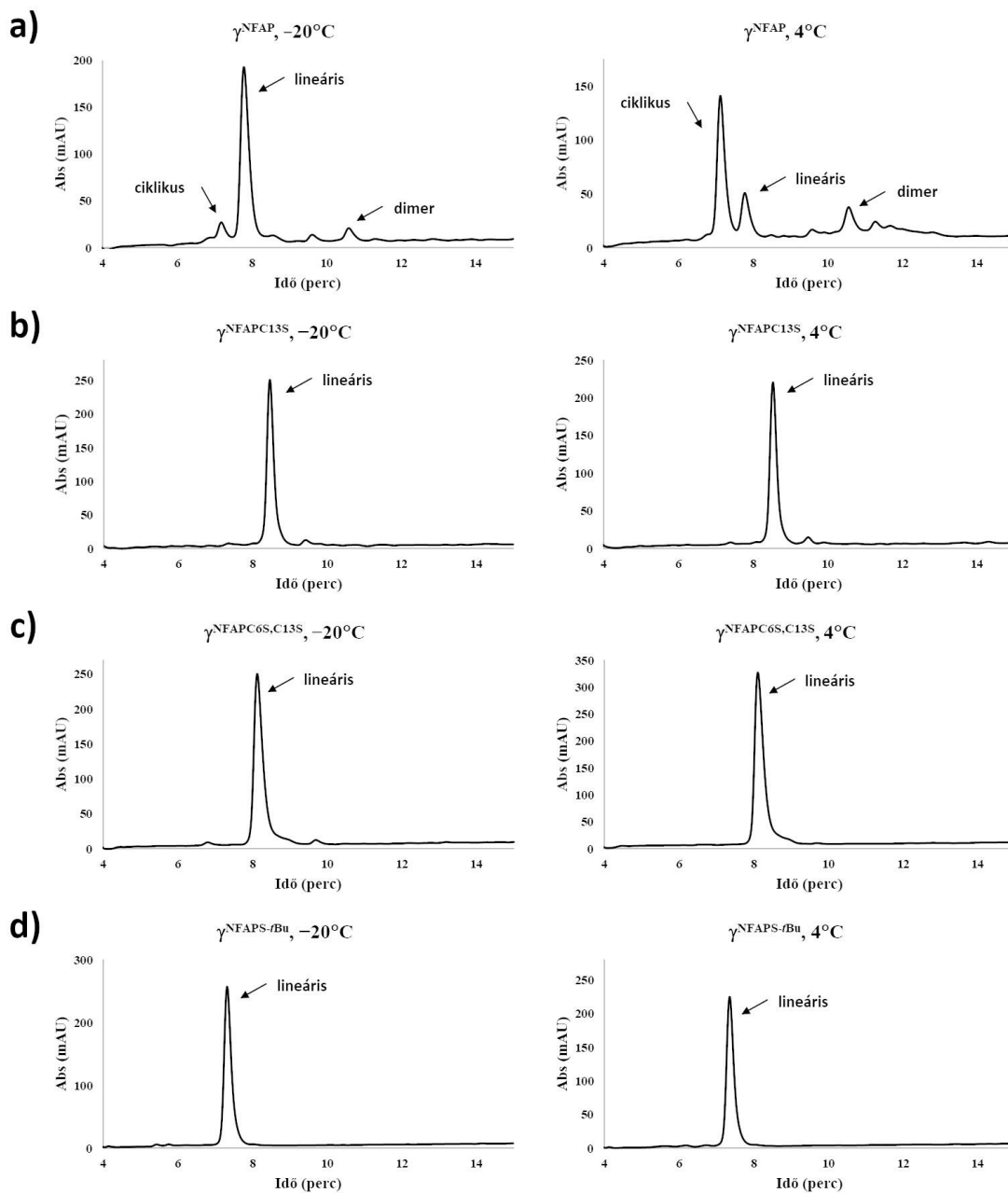
A kezeletlen kontroll törzs növekedését tekintettük 100%-nak és az egyes cellákban a kontrollhoz viszonyított növekedési százalékokat tüntettük fel. ***: $p < 0,0001$ - szignifikáns növekedéscsökkenés (egyszempontos varianciaanalízis, Bonferroni-féle többszörös összehasonlítás) a kezeletlen kontrollhoz (100% növekedés) viszonyítva. A táblázat három független kísérletből (kísérletenként $n=3$) származó eredmények átlagértékét tünteti fel szórással együtt. Virágh és mtsai. (2015) alapján.

4. Melléklet. Különböző szignalizációs útvonalakban sérült *Aspergillus nidulans* törzsek növekedése koffein és calcofluor fehér (CFW, *calcofluor white*) jelenlétében *in vitro* mikrodilúciós érzékenységi tesztekben, 48 óra, 30°C (*alcA*-PkcA, R153) vagy 37°C-on (*RhoA*^{G14V}, Δ *mpkA*, GR5) történt statikus inkubáció után komplett tápközegeben.

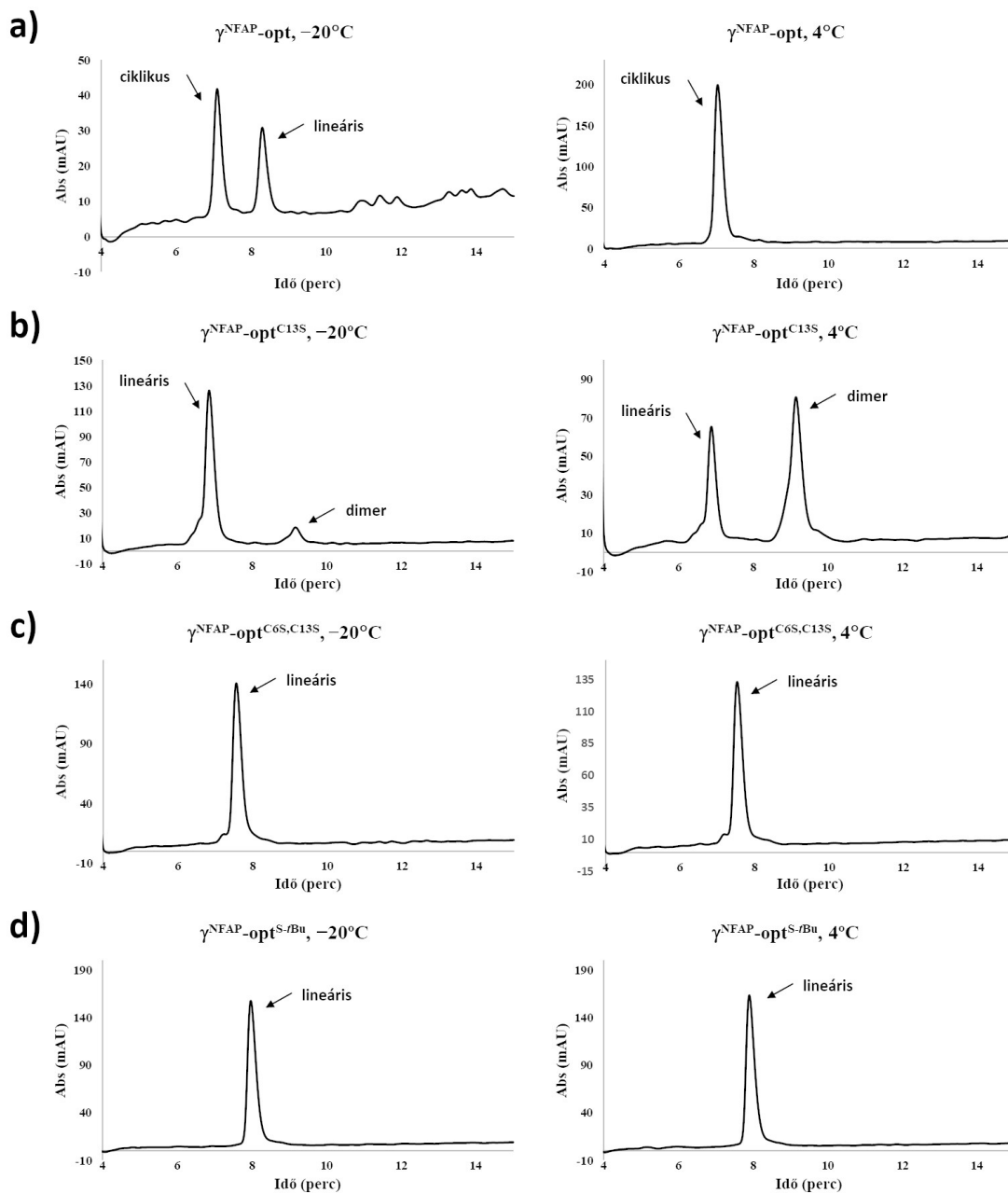
Hatóanyagok / Törzs	Koffein		CFW		Típus
	10 mM	20 mM	10 µg/ml	20 µg/ml	
<i>RhoA</i> ^{G14V}	78±1,2%***	60±8,4%*	92±7,1% ^{nsz}	55±7,7% ^{nsz}	mutáns
Δ <i>mpkA</i>	17±3,9%***	15±2,6%***	76±2,5%***	49±4,0%**	mutáns
GR5	59±1,1%	48±2,7%	97±2,1%	60±3,3%	az <i>RhoA</i> ^{G14V} és a Δ <i>mpkA</i> szülői törzse
<i>alcA</i> -PkcA	29±0,3%***	21±4,4%***	44±5,9%***	22±5,2%***	mutáns
R153	87±2,9%	79±14,4%	95±3,0%	74±2,6%	az <i>alcA</i> -PkcA szülői törzse

A kezeletlen kontroll törzs növekedését tekintettük 100%-nak és az egyes cellákban a kontrollhoz viszonyított növekedési százalékokat tüntettük fel. *, **, ***: $p < 0,05$, $p < 0,005$, $p < 0,0001$ - szignifikáns növekedéscsökkenés (egyszempontos varianciaanalízis, Bonferroni-féle többszörös összehasonlítás) a kezeletlen kontrollhoz (100% növekedés) viszonyítva. A táblázat három független kísérletből (kísérletenként $n=3$) származó eredmények átlagértékét tünteti fel szórással együtt. Virágh és mtsai. (2017) alapján.

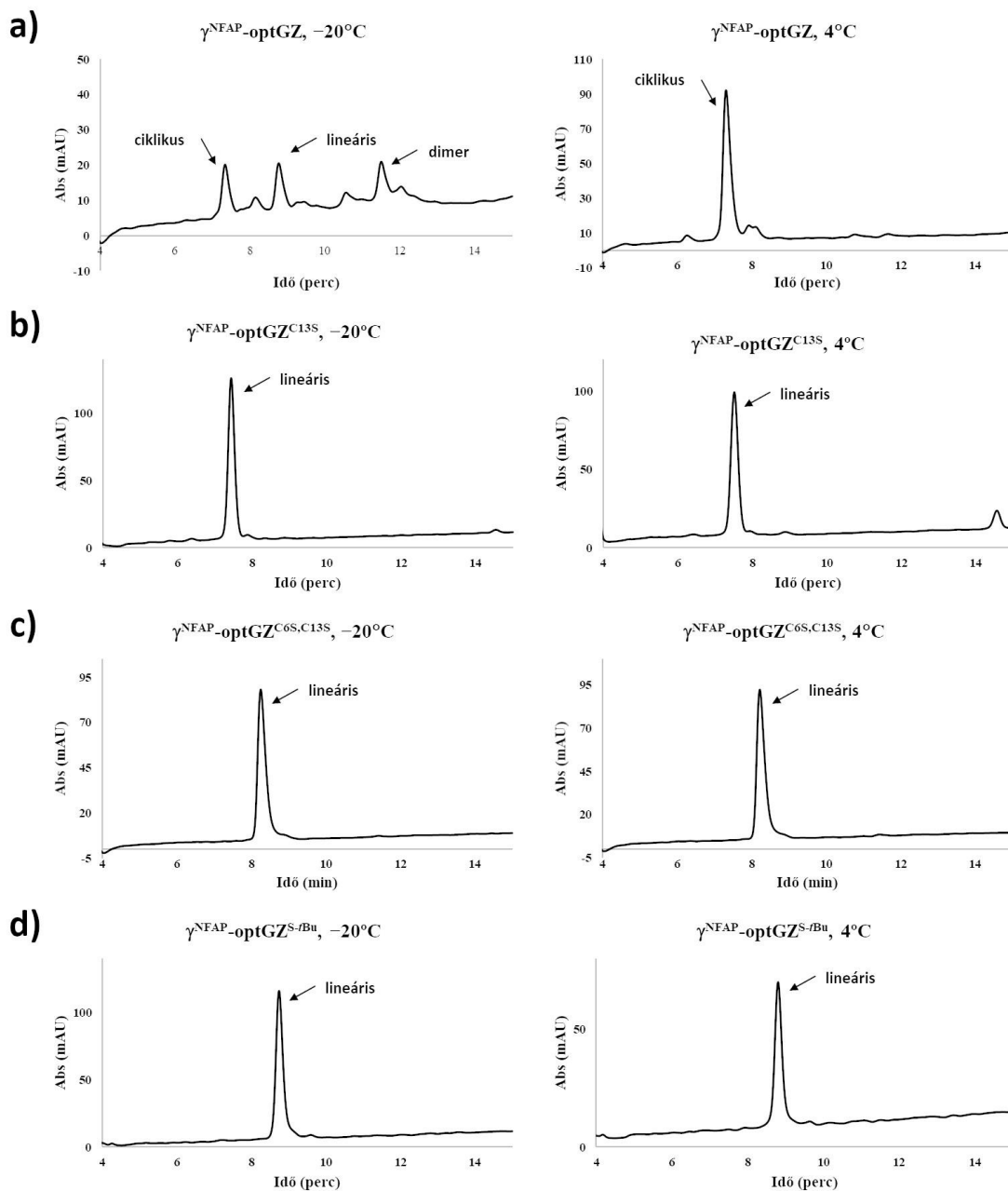
5. Melléklet. A **a)** γ^{NFAP} peptid és **b-d)** cisztein módosított változatainak fordított fázisú nagy teljesítményű folyadékkromatográfiás (RP-HPLC, *reversed-phase high-performance liquid chromatography*) elúciós profiljai -20°C-on és 7 napig 4°C-on történő tárolás után.



6. Melléklet. A **a)** $\gamma^{\text{NFAP-opt}}$ peptid és **b-d)** cisztein módosított változatainak fordított fázisú nagy teljesítményű folyadékkromatográfiás (RP-HPLC, *reversed-phase high-performance liquid chromatography*) elúciós profiljai -20°C -on és 7 napig 4°C -on történő tárolás után.



7. Melléklet. A **a)** γ^{NFAP} -optGZ peptid és **b-d)** cisztein módosított változatainak fordított fázisú nagy teljesítményű folyadékkromatográfiás (RP-HPLC, *reversed-phase high-performance liquid chromatography*) elúciós profiljai -20°C -on és 7 napig 4°C -on történő tárolás után.



8. Melléklet. A a) γ^{NFAP} , b) $\gamma^{\text{NFAP-opt}}$ és a c) $\gamma^{\text{NFAP-optGZ}}$ peptidek és cisztein módosított változataiknak elektronikus cirkuláris dikroizmus (ECD) spektroszkópia spektrumai -20°C -on és 7 napig 4°C -on történő tárolás után.

