

BÍRÁLAT

Dr. Galgóczy László Norbert

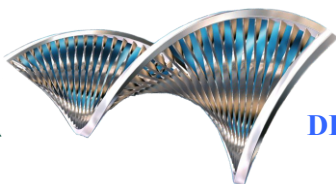
„Új gombaellenes stratégiák: *Neosartorya (Aspergillus) fischeri*-eredetű antifungális fehérjék és alkalmazási lehetőségeik” c. MTA Doktori értekezéséről

A dolgozatban Galgóczy László a *Neosartorya* (mai nevén: *Aspergillus*) *fischeri* fonalas gomba NRRL 181 jelű izolátuma által termelt két antifungális fehérje, a NFAP és a NFAP2 illetve ezek peptid-származékainak vizsgálatáról szóló eredményeket foglalja össze. Nem lehetett egyszerű feladat a rengeteg elvégzett kísérletet, adatot és elemzést belezsúfolni 143 oldalba (a teljes értekezés 186 számozott oldalból áll), ennek megfelelően a dolgozat szinte minden sora alapos odafigyelést igénylő olvasmány. Szerencsére a stílusa – Galgóczy László előadásaihoz hasonlóan – gördülékeny és jól követhető; elírásokat, gépelési hibákat is csak elvétve tartalmaz.

A témaválasztás fontos és időszerű a két évtizedet meghaladó kutatói tevékenység bármely időszakát tekintve. A gyógyszer-rezisztens gombák által okozott végzetes kimenetelű mikózisok száma jelentősen (visszafogott becslések szerint is a duplájára) nőtt az elmúlt két évtizedben, elsősorban az immunszuppresszált betegek körében. A gombák által okozott fertőzések azonban nem csak az egészségügy, hanem a mezőgazdaság számára is komoly feladatot jelentenek: az utóbbi években – nem függetlenül a gyorsan melegező éghajlattól – folyamatosan emelkedik a növénypatogén fajok által okozott szántóföldi és raktári kártételek esetszáma és értéke. Becslések szerint az éves globális mezőgazdasági termés akár ötöde is a gombák martalékává válhat!

Formailag a dolgozat az MTA doktori értekezések hagyományos felépítését követi. A kétoldalnyi „Rövidítések jegyzékét” az „Előszó” követi, melyben a téma- és címválasztást magyarázza el az olvasónak (utóbbi, érzésem szerint, kissé nehézkesen). A rövid „Bevezetés” a kutatás indokoltságáról szól, sok érdekes és naprakész adattal a gombák klinikai illetve mezőgazdasági kártételéről. Az „Irodalmi áttekintés” is ezt a kettős felépítést követi: klinikum illetve növényvédelem. Mindkét területen áttekinti az antifungális terápia illetve védekezés történetiségét, jelenét, kihívásait és lehetőségeit, végül részletesen bemutatja a dolgozat főszereplőit, vagyis a fonalas tömlősgombák Eurotiomycetes osztályának fajai által termelt antifungális proteinek.

Az „Anyagok és módszerek” fejezetnek minden tudományos dolgozat esetében az a célja, hogy a kísérleteket a nem laikus, de nem feltétlenül szakértő olvasó reprodukálni tudja. Ez a feltétel csak az eredeti közleményeket párhuzamosan olvasva teljesül a dolgozatban, de



tekintve az alkalmazott módszerek rendkívül szerteágazó jellegét és nagy számát, a megoldást elfogadhatónak tartom.

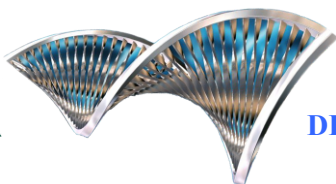
A „Célkitűzések” fejezet azokat a fő lépéseket tartalmazza, melyeket egy potenciálisan gyakorlati jelentőségű új biológiai hatóanyag fejlesztése kapcsán minden esetben el kell végezni. Jelen esetben ez a biztonságos (GRAS) fehérje-túltermelő rendszer kidolgozását, az antifungális spektrum vizsgálatát, toxicitás-vizsgálatot, a hatásmód illetve a kémiai szerkezet felderítését, a szerkezet és a hatásmód kapcsolatának megértését, valamint a gyakorlati (klinikai és mezőgazdasági) alkalmazhatóság bizonyítását jelenti. A dolgozat (és a bemutatott kutatás) legfőbb erénye, hogy ténylegesen végig vezeti az olvasót ezen az úton a felfedezéstől a gyakorlati alkalmazásig.

A „Célkitűzések” fejezetnek van egy másik – az értekezés felépítése szempontjából fontosabb – szerepe is. Galgóczy László a nyolc db célkitűzést egyfajta „elő-tézispont”-ként definiálta, és a formális téziseket ezekhez igazította, vagyis mindegyik pontot publikált eredményekkel támasztotta alá. Bírálatom további részében ezeket a célkitűzés-tézispontokat veszem górcső alá.

Az első Célkitűzés illetve Tézispont a *Neosartorya fischeri* Antifungális Proteinek (NFAP illetve NFAP2) izolálása és túltermelése biztonságos expressziós rendszerekben. A célkitűzés – mint a dolgozat ezután következő részei bizonyítják – megvalósult, így a tézispont is elfogadható.

Kérdéseim: a 68. oldalon azt írja, hogy „többféle tápoldat és tenyésztési körülmény tesztelése után” sikerült kis mennyiségű NFAP-t izolálni a natív törzsből (NRRL 181). Melyek voltak a termelés szempontjából legfontosabb tenyésztési körülmények? Milyen szén- és nitrogénforrást használtak, volt-e specifikus induktor? Milyen időprofil szerint termelődik natívan az NFAP? Az elsődlegesen előállított 1,25 mg/L fehérje a szakirodalom szerint – más fajokhoz és antifungális fehérjékhez képest – mennyire számít soknak vagy kevésnek? A szakirodalom ismeretében vannak-e közös vonásai a különböző gombafajokban az antifungális fehérjék natív termelésének? Végezetül: a fonalas gombák természetes élettere az élő vagy elhalt növényi biomassza (vagyis szilárd közeg, nem folyadék). Próbálták-e ezeket a natív termelő fajokat szilárd fázisú fermentációval tenyészteni AP termelés céljából?

A második Célkitűzés ill. Tézispont a *Neosartorya fischeri* Antifungális Proteinek hatásspektrumának, más antifungális szerekkel való kölcsönhatásainak vizsgálata volt. A terjedelmes 11. és 12. táblázatok alapján a vizsgálatokba nagyszámú gombafajt, egyes fajok esetén pedig több törzset is bevontak, az eredményeket megfelelő statisztikai módszerekkel értékelték ki, így ez a célkitűzés is teljesítettnek tekinthető.



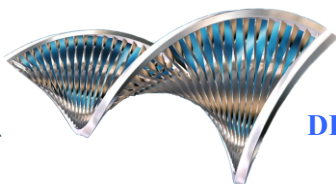
Kérdéseim: mivel az élesztőkkel illetve fonalas gombákkal szemben eltérő a hatékonyság, a dimorf gombák (pl. *Candida albicans*) esetében a morfológiailag eltérő (kerek illetve fonalas) formák is eltérően reagáltak? Továbbá, volt-e hatékonyság-különbség a teszt-tenyészetek kora (= növekedési szakasza) függvényében? Másként reagál-e a fiatal, gyorsan növekvő illetve az idős, stacioner állapotú teszt-tenyészet?

A harmadik Célkitűzés ill. Tézispont a *Neosartorya fischeri* antifungális proteinek hatásmódjának a felderítése. Mivel az NFAP a fonalagombákkal, az NFAP2 pedig inkább az élesztőkkel szemben mutatott gombaellenes aktivitást, az előbbit az *Aspergillus nidulans*-on, az utóbbit a *Candida albicans*-on tanulmányozták. Az NFAP hatásmódjára fel tudtak írni egy meglehetősen részletes (bár nem hiánytalan) útvonalat, az NFAP2 esetében a hatásmódra inkább csak indirekt bizonyítékok állnak jelenleg rendelkezésre; ezzel együtt ezt a tézispontot is elfogadom.

Az NFAP vakuoláris transzportfolyamattal jut be a sejtbe, majd a vakuólumokból kiszabadulva egy ma még ismeretlen célponton keresztül apoptózist vált ki, ami reaktív oxigénformák (ROS) felhalmozódásával és a sejtmembrán sérülésével jár együtt. Ezen túl egy gombaszpecifikus receptorhoz kapcsolódva egy jelátviteli útvonalat is bekapcsol a fehérje, amin keresztül gátolja a polarizált hifanövekedést, illetve szintén apoptózist indukál. A kiváló minőségű felvételekkel illusztrált eredmények jelentős részét nagyszerűen egymásra épülő mikroszkópi-festési technikákkal érték el.

Kérdéseim: mivel a fungális vakuólumok savas kémhatásúak (aminek szerepe van egyes sejtalkotók lebontásában) nem lehet ennek a savasságnak hatása az AFP-k stabilitására és ezen keresztül aktivitására, ha tényleg eltöltenek valamennyi időt bennük? Milyen az AFP-k kémhatás függése? Továbbá, a vakuolizáció mértéke függ a tenyészet korától; tápanyag-limitált idősebb, stacioner gombatenyészetekben a vakuólumok megnőnek, összeolvadnak, és így a sejttérfogat jelentős hányadát tehetik ki. Észleltek-e változást a teszt-tenyészetek AFP-vel szembeni érzékenységében a vakuolizáció mértéke függvényében?

A negyedik Célkitűzés ill. Tézispont a *Neosartorya fischeri* antifungális proteinek szerkezete és hatásmódja közti összefüggésnek a megismerése. Ehhez elengedhetetlen volt az AFP-k oldatbeli szerkezetének megismerése magmágneses rezonancia-spektroszkópia (NMR) segítségével. Az NFAP nagy hasonlóságot mutat az Eurotiomycetes-eredetű AFP-csoportba tartozó PAF (Penicillium Antifungális Fehérje) szerkezetéhez, míg az NFAP2 – éppen ellenkezőleg – eltér tőlük. Számos szerkezeti mutáns fehérjét hoztak létre, amelyek segítségével azonosították a gombaellenes hatásért felelős illetve a sejtmembránhoz kötődni képes régiókat. Véleményem szerint ez a legerősebb tézispont (és természetesen elfogadható).



Kérdésem: van-e adat arról, hogy a természetben az antifungális proteinek általában és ezen belül konkrétan az NFAP-k mennyire variábilis fehérjék? Léteznek-e „AF-izomformák”? Ha igen, akkor ezekhez a szerkezeti különbségeken túl eltérő funkció/aktivitás is tartozik?

Az ötödik Célkitűzés ill. Tézispont antifungális hatású peptidszármazékok tervezése a *Neosartorya fischeri* AP-k megismert szerkezeti elemei alapján. Tudatosan alkalmazott aminosav-cserékkel – szilárd fázisú peptidszintézis eredményeként – a fehérjék fizikokémiai tulajdonságai előnyösen változtathatók, a gombaellenes hatékonyság fokozható, a hatás-spektrum szélesíthető. A doktori dolgozatban László az NFAP-nek négy, az NFAP2-nek két szintetikus származékát mutatta be, alapos fizikokémiai és biológiai hatástanulmányok mellett; ezért ezt a tézispontot is teljesítettnek tekintem.

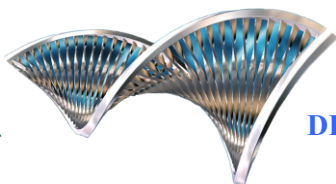
Az NFAP és az NFAP2 natív „gamma-core” régióit lefedő szintetikus, lineáris peptid-származékok nem mutatnak antifungális hatást, szemben a „klasszikus” PAF-fal (*Penicillium Antifungális Fehérje*). Amikor aminosav-cserékkel megnövelték a fehérje pozitív összöltését, az antifungális hatás megjelent, azonban – érdekes módon – nem dózisfüggő módon: egy bizonyos koncentráció fölött teljes növekedés-gátlást okozott, alatta viszont semmilyen hatás nem volt megfigyelhető.

Kérdéseim: (1) Próbálták hipotézist alkotni a fenti jelenségre? (2) A „gamma-core” régiót lefedő *Neosartorya* peptid-származékok gombaellenes hatása nem igényel rendezett szerkezetet (110. oldal); korábban viszont arról írt (105. oldal), hogy az NFAP2 „gamma-core” régiójának szerkezet-kialakító és megfelelő feltekeredést elősegítő szerepe van. Az NFAP2 esetében nincs ellentmondás a két eredmény között?

A hatodik Célkitűzés ill. Tézispont a *Neosartorya fischeri* antifungális peptidek és szintetikus peptid-származékok toxicitásának vizsgálata csírázó növényeken (*Medicago truncatula*) és állatokon: vörösvértesteken, emlőssejteken, szövetmodellen. Összefoglalóan: az antifungális fehérjéknek nincs káros hatása a MIC-értékek koncentráció tartományában a vizsgált teszt-szervezeteken. Az eredmények alapján ez a tézispont is teljesítettnek tekinthető.

Kérdéseim: a keratinociták és a dermális fibroblaszt sejtek életképességét csak NFAP2 jelenlétében vizsgálták, mivel az NFAP2 alkalmazását elsősorban felszíni gombafertőzések kezelésében képzelik el. Jelenti-e azt, hogy az NFAP-val (melynél ezeket a teszteket nem végezték el) nem lesz javasolt felszíni gombafertőzéseket kezelni? Ha igen, akkor miért?

A hetedik Célkitűzés ill. Tézispont a *Neosartorya fischeri* NFAP és származékai gyakorlati alkalmazhatóságának bizonyítása a növény- és terményvédelemben. Ez a peptid *in vitro* elsősorban a növénypatogén fonalgombák ellen volt hatékony, ezért a vizsgálatokat valós körülmények között is elvégezték. A vizsgált teszt-gombafajok a *Botrytis cinerea* – a



BIOMÉRNÖKI TANSZÉK
DEPARTMENT OF BIOCHEMICAL ENGINEERING

4032 Debrecen, Egyetem tér 1., Kémiai Épület / Chemistry Building
Tel: +36-52-512-900/62488
BioChemEng@science.unideb.hu ♦ <http://BioChemEng.unideb.hu>

szürkerothadás kórokozója – illetve a raktári kártevő *Cladosporium herbarum* voltak. Paradicsomnövényen (*Botrytis*) illetve -termésen (*Cladosporium*) végzett kísérletek alapján a terményvédelmi kísérletek teljes mértékben megakadályozták a *Cladosporium* fertőzést, míg a *B. cinerea* fertőzés tünetei mérséklődtek. Ezzel ez a tézispont is teljesítettnek tekinthető, azzal a megszorítással, hogy az eredmények egyenlőre „csak” azt mutatják: az antifungális fehérjék képesek megakadályozni a fertőzést. Ehhez kapcsolódik a kérdésem: nem tervezik vizsgálni a hatást már fertőzött növény illetve termés esetében is?

A nyolcadik Célkitűzés illetve Tézispont a *Neosartorya fischeri* NFAP2 alkalmazhatósága felületi humán gombás fertőzések kezelésében. Háromdimenziós bőrmodelleken végrehajtott fertőzési kísérletekben a peptid megakadályozta a *Candida albicans* kolonizációját és mélyebb szöveti rétegekbe jutását; egérmodellben pedig csökkentette a *C. albicans* élősejtszámot, és gátolta a hifális formába történő átalakulást. Mindezek alapján ezt a tézispontot is elfogadom.

A mezőgazdasági alkalmazhatóság kapcsán szeretném végül megkérdezni: vannak-e elképzelések az NFAP nagyléptékű előállításának technikai lehetőségeiről, illetve történtek-e már bármilyen hozzávetőleges becslések ennek költségeiről? A szabadföldi alkalmazás során milyen módon tartják elképzelhetőnek a termék kijuttatását?

Összefoglalóan: Galgóczy László MTA Doktori értekezése rendkívül magas szakmai színvonalú, jól felépített és igényesen elkészített munka, melynek minden tézise meggyőző, és rangos folyóiratokban publikált tudományos bizonyítékokra épül. Szeretném kiemelni a munka letisztult, kompakt jellegét: a több mint 20 éves kutatás során végig két fehérjével foglalkozik, a bioinformatikai adatbázisok elemzésétől kezdve az izoláláson és jellemzésen át a kémiai módosításokig, végül pedig a gyakorlati alkalmazásokkal befejezve. Az értekezést nyilvános vitára messzemenőig alkalmasnak tartom, és sikeres védelem esetén javaslom az MTA Doktora cím odaítélését.

Debrecen, 2025. május 30.

K. L. L.



Prof. Karaffa Levente
Az MTA doktora