

## A dolgozat témaköréhez kapcsolódó közlemények

1. **Galgóczy, L.**, Papp, T., Pócsi, I., Leiter, É., Marx, F., Papp, T. and Vágvolgyi, Cs. (2005) Sensitivity of different Zygomycetes to the *Penicillium chrysogenum* antifungal protein (PAF). J. Basic Microbiol. 45 (1), 136-141.
2. **Galgóczy L.**, Papp T., Lukács Gy., Leiter É., Pócsi I. and Vágvolgyi Cs. (2007) Interactions between statins and *Penicillium chrysogenum* antifungal protein (PAF) to inhibit the germination of sporangiospores of different sensitive *Zygomycetes*. FEMS Microbiol. Lett. 270, 109-115.

DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

## Kis molekulatömegű antimikrobiális fehérjék és kódló génjeik vizsgálata

**Galgóczy László**



Témavezető: Dr. Vágvolgyi Csaba, tanszékvezető egyetemi docens

Szegedi Tudományegyetem  
Természettudományi és Informatikai Kar  
Mikrobiológiai Tanszék

Szeged  
2007

## Heterológ expressziós rendszer kidolgozása

Heterológ expressziós rendszerben a pPICZ $\alpha$ A plazmid felhasználásával sikerült az F8AP-t egy biológiailag biztonságosan alkalmazható és iparilag könnyen kezelhető élesztőgombával, a *Pichia pastoris*-szal metanol által indukált módon megtermeltetnünk. A fermentléből tisztított, extracelluláris fehérje megőrizte biológiai aktivitását.

és mtsai., 2005), míg antifungális hatással rendelkezőt öt gombafajból mutattak ki: *Aspergillus giganteus*, AFP; *A. niger*, ANAFP; *A. clavatus*, ACLA; *Penicillium chrysogenum*, PAF és *P. nalgiovense*, NAF. A *Gibberella zeae* (GAMA) esetében egy ortológ gén jelenlétére következtetnek a genomikus adatbázisok alapján (Marx, 2004). Az ACLA egy 2007-ben, a National Center for Biotechnology Information (NCBI) génadatbázisában publikált, az AFP-hez nagymértékben hasonló fehérje, habár tanulmány a jelen dolgozat elkészítéséig nem jelent meg róla. Az antifungális aktivitással rendelkező proteinek nukleotid- és aminosavsorrendje nagymértékben eltér (kivéve a PAF és a NAF esetében, ahol a hasonlóság 100%-os), de konzervált régiók minden esetben megfigyelhetők. Ilyen a ciszteinmolekulák elhelyezkedése és az azokat határoló aminosavak kisebb-nagyobb mértékű egyezése. Általános jellemző még a lizinmolekulák nagy száma (az argininhez viszonyítva), ami következtében a molekula bázikussá válik (Marx és mtsai., 1995; Marx, 2004).

Munkánk során egyrészt vizsgáltuk egy korábban azonosított antifungális fehérje fajspecifitását és kölcsönhatását más antimikotikumokkal, másrészt új, antimikrobiális aktivitással rendelkező fehérjéket és kódoló géneiket azonosítottuk és jellemeztük. Eredményeink jelentős mértékben bővítik a kis molekulatömegű antifungális fehérjékkel kapcsolatos ismereteinket és új távlatokat nyitnak a lehetséges alkalmazásuk előtt.

## Célkitűzések

Az eddigi vizsgálatok alapján a *Penicillium chrysogenum* által termelt PAF potenciális antifungális szer. Alátámasztja ezt az emlősökből származó endotél-, ideg- és vázizomsejtek inszenzitivitása, a gyulladáskeltő reakciók hiánya *in vitro* körülmények között PAF-kezelés hatására, és a

cDNS szintézisével a tényleges intronhatárokat bizonyítottuk az F8-izolátumnál.

Az *abp1-2* gén jelenlétét sikerült igazolnunk az általunk vizsgált 6 fajba tartozó 12 R-izolátumban. A homológia mértéke minden esetben 100%-os volt a DNS-szekvencia alapján az *abp1*-hez és *abp2*-höz viszonyítva.

Az A-izolátumok vizsgálatával, egy az evolúció során mutációval funkcióját veszített *afp/anafp*-homológ gén jelenlétét figyeltük meg az A6-izolátum esetében. A feltételezett szignálszekvenciában egy aminosavnyi különbséget hordozó, de az érett AFP-vel megegyező fehérje jelenlétét mutattuk ki a DNS-szekvencia alapján várható aminosavösszetétellel az A2-izolátumnál.

Kísérleteink eredményeként megállapíthatjuk, hogy a defenzinszerű antimikrobiális hatással rendelkező fehérjék jelenléte gyakori a fonalgombák körében, mint eddig feltételezték.

### Új antimikrobiális peptidok termelésének optimalizálása

Az antifungális hatással bíró fehérjék termeltetésére az általunk optimalizált tápközeg (antifungális protein indukáló tápoldat) és tenyésztési körülmények alkalmazásával vizsgáltuk az F-izolátumok fermentleveinek gombaellenes aktivitását két érzékeny faj (*Trichoderma longibrachiatum*, *Mortierella elongata*) bevonásával. 10-ből 8 fermentlé aktívnak mutatkozott (F2, F3/a, F4, F6/a, F7, F8, F9, F10) melyek közül a leghatékonyabban, az F8-izolátum által termelttel dolgoztunk tovább.

Kísérleteink alapján kijelenthetjük, hogy az általunk alkalmazott tápközeg alkalmas az F-izolátumok kis molekulatömegű antifungális proteinjeinek a hatékony termeltetésére.

### Alkalmazott módszerek

1. *In vitro* antifungális szer érzékenység vizsgálati technikák
2. *In vitro* antifungális szerek kölcsönhatásának vizsgálatára alkalmas technikák
3. DNS- és RNS-technikák
4. Polimeráz láncreakció (PCR)
5. Inverz PCR
6. DNS-szekvenálás
7. Fehérjetermeltetési- és tisztítási technikák
8. Fehérje-gélelektroforézis
9. Izoelektromosan fókuszáló fehérje-gélelektroforézis
10. *In silico* vizsgálati módszerek
11. Heterológ expresszió (*EasySelect<sup>TM</sup> Pichia Expression Kit*, Invitrogen)

### Eredmények

#### A PAF hatása néhány gyakorlati jelentőségű gombacsoport tagjaira

Vizsgálataink során 21 járomspórás gombafajból 13 (*Absidia corymbifera*, *Micromucor ramanniana*, *Mortierella elongata*, *M. nanthalensis*, *M. wolfii*, *Mycotypha africana*, *Rhizomucor miehei*, *R. pusillus*, *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus*, *R. oryzae*, *Thamnostylum piriforme*, *Umbellopsis isabellina*, *Zygorhynchus macrocarpus*) érzékenynek mutatkozott 50 µg/ml PAF-kezelés hatására. Minden esetben mind a hifafonalak növekedése, mind a sporangiospórák csírázása gátlódott, de alkalmazott táptalajtípustól függően eltérő mértékben. A legnagyobb aktivitásokat minimál táptalaj alkalmazásával mértük. Ugyanakkora

## Bevezetés

A mikrobiális fertőzések száma jelentősen emelkedett az utóbbi évtizedekben. Ennek okát elsősorban a legyengült immunrendszerű betegek növekvő számában, az immunszuppresszív terápia elterjedésében és a széles spektrumú antibiotikumok nem megfelelő használatában kell keresnünk. Különösen nagy mértékű növekedés következett be az opportunista gombafertőzések esetszámában. A gombák okozta fertőzések kezelése nehézkes, mivel a rendelkezésre álló terápiás szerek száma alacsony, szűk spektrumúak, számos mellékhatással rendelkeznek és a gazda szervezetét jelentős mértékben károsítják (Ribes és mtsai., 2000).

A növényvédelemnek is komoly gondot jelent a különböző gombafertőzések leküzdése. Célja a természetlag megtartása, illetve annak növelése hatékony antifungális szerek alkalmazásával. Egy ilyen szerrel szemben támasztott legfontosabb követelmények a következők: ne károsítsa a környezetet; ne okozzon növény, állat, ember egészségügyi problémát és fontos szempont az olcsón, nagy mennyiségben való előállíthatóság is.

Mindezekből következően szükség van új, hatékony antimikrobiális szerek kifejlesztésére. A fenti szempontoknak kiválóan megfelelnek az utóbbi két évtizedben intenzíven kutatott, a fonalgombák által termelt extracelluláris defenzinszerű fehérjék, amelyek hatékonyan gátolják egyes mikroorganizmusok növekedését, illetve más fajba tartozó gombák spóráinak csírázását. Közös jellemzőjük az extracelluláris kiválasztódás, a kis molekulatömeg (5,8-6,6 kDa), a bázikus karakter, a ciszteinmolekulák viszonylag nagy száma és ebből következően több intramolekuláris diszulfid-híd jelenléte. Mindezen tulajdonságok jelentősen hozzájárulnak a molekulák nagymértékű stabilitásához eltérő hőmérsékleti és pH értékeknél (Marx, 2004). Ilyen antibakteriális fehérjét eddig egy *Rhizopus microsporus* (ABP1-2; Kobayashi és mtsai., 1992; Yamada

## Összefoglalás

Eredményeink összefoglalásaként megállapíthatjuk, hogy:

1. Jelentős mértékben sikerült bővítenünk a PAF-érzékeny fajokról rendelkezésre álló információt, számos opportunistá humánpatogénként nyilvántartott, klinikai mintából származó izolátum esetében is igazoltuk a PAF-érzékenységet.
2. Az állandó koncentrációjú PAF számos eltérő sztatinkombinációval szinergista vagy additív kölcsönhatásba lépett, abban az esetben, ha a járomspórás gombafaj érzékenynek mutatkozott korábbi tesztjeink alapján az egyik szerrel szemben. Új eredményként könyveljük el számos, általunk vizsgált sztatinkészítmény antifungális hatását.
3. A PAF képes a flukonazollal hatékonyan együttműködni, azok dermatofita-ellenes terápiás koncentrációit lecsökkenteni.
4. A defenzinszerű antimikrobiális hatással rendelkező fehérjék jelenléte gyakoribb a fonalgombák körében, mint eddig feltételezték.
5. A fonalgomba-eredetű, defenzinszerű antifungális hatással rendelkező fehérjék csoportját számos ígéretes jelölttel sikerült gazdagítanunk.
6. Sikerült igazolnunk egy antifungális tulajdonsággal rendelkező, PAF-homológ, kis tömegű fehérje jelenlétét az F8-izolátumban, ami a tisztítás után is megőrizte biológiai aktivitását.
7. Az F8AP gént tartalmazó pPICZ $\alpha$ A plazmid transzformálásával sikerült aktív, működőképes fehérjét termeltetni.

molekula nagymértékű stabilitása. Ugyanakkor több olyan gombacsoport van (pl. járomspórás gombák, *Candida*, *Malassezia*, *Trichoderma/Hypocrea* és a dermatofita fajok) ahol hatását csak érintőlegesen vizsgálták. Más, klinikumban már használatos, illetve antifungális hatással bíró nemantifungális szerekkel való kölcsönhatását mindmáig nem vizsgálták.

A GAMA egy, a *Gibberella zeae* (anamorfja: *Fusarium gramineum*) genomjában megtalálható szekvenciából leszármaztatott hipotetikus antifungális protein, melynek jelenléte csak *in silico* bizonyított (GenBank: BK004091, protein ID: XP 384921.1), klónozásáról még nem számoltak be. Munkahipotézisünk szerint más fajok és fajcsoportok is termelnek a defenzinekhez hasonló antimikrobiális fehérjéket, melyek az eddigi feltételezéssel szemben szélesebb körben elterjedtek a fonalgombák csoportjában.

Mindezek alapján a következő célokat fogalmaztuk meg:

1. A *P. chrysogenum* által termelt antifungális fehérje (PAF) hatásának vizsgálata néhány gyakorlati szempontból jelentős gombacsoport tagjára.
2. A PAF és különböző sztatinek kölcsönhatásának vizsgálata járomspórás gombák növekedésének gátlására.
3. A PAF és a flukonazol kölcsönhatásának vizsgálata dermatofita fajok növekedésének gátlására.
4. Új, antimikrobiális fehérjéket kódoló gének azonosítása különböző mikroszkopikus fonalgomba-izolátumból.
5. Új antimikrobiális peptidok termelésének optimalizálása.
6. Egy új, kis molekulatömegű antimikrobiális fehérje tisztításának a kidolgozása, antimikrobiális spektrumának és hatásának vizsgálata.
7. Heterológ expressziós rendszer létrehozása egy új, hatékony antimikrobiális fehérje termelésére.

## Új, kis molekulatömegű antimikrobiális fehérje izolálása

Az F8-izolátumból sikerült izolálnunk egy ~6,35 kDa tömegű fehérjét, ami antifungális hatással rendelkezett, és F8-izolátum antifungális proteinek, F8AP-nak neveztük el. Az 50 µg/ml koncentrációjú oldata által kiváltott morfológiai változások összeegyeztethetőek a PAF hatásával: a spórák csírázása gátlódik; a hifák rövidek, többszörösen elágazódóak, végük duzzadt, abnormális növekedésűek. 18 járomspórás- és 15 tömlősgomba (4 fonalas és 11 élesztő) bevonásával vizsgáltuk a fajspecifitását, ami hasonló volt a korábban PAF által mutathoz. Eltérést a *Candida* fajok vizsgálata során kaptunk: A *C. inconspicua*, *C. lipolytica*, *C. lusitaniae*, *C. norvegica* és a *C. parapsilosis* kismértékben érzékenyek bizonyult F8AP-kezelés hatására. A különbség adódhat az eltérő kísérleti körülményekből illetve az alkalmazott tápközegből, így ennek az eredménynek a tényleges igazolása további vizsgálatokat igényel. A *Trichoderma/Hypocrea* fajok esetén nem figyeltünk meg a gátlási zóna területén bekövetkező, későbbi hifaburjánzást, mint azt a PAF esetében tapasztaltuk. Új, eddig le nem írt hatást észleltünk *Mortierella elongata* esetén, ahol a hifanövekedés nem, de a sporangiolumok képződése gátlódott.

*In silico* módszerek alkalmazásával meghatároztuk a F8AP előre várható fizikai és kémiai tulajdonságait. Ezek alapján egy 55 aminosav hosszúságú, két doménből álló; 6357,16 Da tömegű és bázikus (pI= 9,26) proteint feltételezünk, amit 3 diszulfid-híd stabilizál. Az F8AP háromdimenziós modellje alapján várható harmadlagos és negyedleges szerkezete a defenzinekéhez hasonló: 2 β-redő, 2 α-hélix; a 2 β-redő egy α-hélixszel összekapcsolva.

koncentrációjú PAF-kezelés hatására a *Trichoderma viride* kivételével az általunk vizsgált összes *Trichoderma/Hypocrea* faj szintén szenzitívnek mutatkozott, azonban a *T. harzianum* és *T. inhamatum* esetén erős táptalaj-függő hifanövekedés-gátlást észleltünk. Ennél a nemzetségnél az alkalmazott tápközegtől függő inkubációs idő után intenzív hifaburjánzást tapasztaltunk a korábbi gátlási zóna területén. A vizsgálatainkba bevont összes dermatofita faj (*Trichophyton mentagrophytes*, *T. rubrum*, *T. tonsurans*, *Microsporum canis* és *M. gypseum*) érzékenynek mutatkozott, de ennél jóval nagyobb PAF-koncentrációt kellett alkalmaznunk (100 µg/ml). A 200 µg/ml PAF ebben az esetben fungicid hatással bírt. A korábbi szakirodalomban leírt eredmény alapján, ahol a *Candida albicans* érzéketlennek mutatkozott PAF-kezelésre, egy izolátumot sem találtunk szenzitívnek a *Candida* fajok (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. inconspicua*, *C. krusei*, *C. lipolytica*, *C. lusitaniae*, *C. norvegica*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. pulcherrima*, *C. zeylanoides*) és a *Malassezia pachydermatis* esetében.

Kísérleteinkkel jelentős mértékben sikerült bővítenünk a PAF-érzékeny fajokról rendelkezésre álló információt, számos opportunistá humánpatogénként nyilvántartott, klinikai mintából származó izolátum esetében is igazoltuk a PAF-érzékenységet.

#### **A PAF és különböző sztatínok kölcsönhatásának vizsgálata**

Az állandó koncentrációjú PAF (50 µg/ml) számos eltérő sztatínkombinációval szinergista vagy additív kölcsönhatásba lépett, abban az esetben, ha a járomspórás gombafaj érzékenynek mutatkozott korábbi tesztjeink alapján az egyik szerrel szemben. A szintetikus sztatínkészítmények (atorvasztatin, rozuvasztatin) önmagukban alkalmazva erősebb antifungális hatással rendelkeztek, mint a természetes eredetűek

(lovasztatin, szimvasztatin), és már 1-2 µg/ml koncentrációjukkal PAF kombinációban jelentős mértékben sikerült visszaszorítani a gombák növekedését *Mycotypha africana* és *Syncephalastrum racemosum* esetében.

Új eredményként könyveljük el számos, általunk vizsgált sztatínkészítmény antifungális hatását.

#### **A PAF és a flukonazol kölcsönhatásának vizsgálata**

Dermatofita fajok esetében az eltérő flukonazol és az állandó koncentrációjú PAF (100 µg/ml) a legtöbb esetben (32-2 µg/ml flukonazol) szinergista vagy additív módon hatott (*Trichophyton mentagrophytes*, *T. tonsurans*, *Microsporum gypseum*). 2 gomba esetében (*T. rubrum*, *M. canis*) a 32 µg/ml flukonazol fungisztikus hatását sikerült fungiciddé tenni PAF kombinációban. Számos esetben a hatékony flukonazol-koncentráció PAF alkalmazásával jelentős mértékben csökkenthető volt. Kísérleteink igazolták, hogy a PAF képes antifungális hatással rendelkező szerekkel hatékonyan együttműködni, azok terápiás koncentrációit lecsökkenteni.

#### **Új antimikrobiális fehérjéket kódoló gének azonosítása**

10 fajba tartozó 15 F-izolátum vizsgálata során PCR-technika alkalmazásával a genomi adatbázisban szereplő *gama* gén homológjait sikerült meghatároznunk. Teljes homológiát figyeltünk meg az F3/a-izolátumból meghatározott gén által kódolt fehérje és az *in silico* meghatározott GAMA között. Ha nem vesszük figyelembe a feltételezett szignálszekvenciákat, akkor az F3/b-, F6/a-b-, F9-, F4-, F8- és az F10-izolátum is 100% megegyezést mutat aminosavsorrendje alapján. 3 ettől eltérő, de nagymértékben hasonló fehérje jelenlétére sikerült következtelnünk az F7-, F2- és F5/a-d-, illetve az F1-izolátumok esetében.

