

GALGÓCZI LÁSZLÓ:

Fonals tömlősgomba-eredetű antifungális fehérjék és alkalmazási lehetőségeik

Összefoglalás

A századfordulón aggasztó méreteket öltött az antifungális (gombaellenes) szerekkel szemben rezisztenciát mutató gombák által okozott fertőzések és kártételek esetszáma a klinikumban és az agráriumban egyaránt. Világosan látszott az, hogy az eddig alkalmazásban lévő gyógyszereken és növényvédőszeren alapuló antifungális stratégiák folyamatosan veszítenek hatékonyságukból. Ezért a tudományos élet figyelme új, az eddigiektől alapvetően eltérő gombaellenes szerek és kezelési módszerek kidolgozása felé irányult. Egyik alternatív lehetőségnek a természetben széleskörben előforduló antifungális proteinek és peptidek alkalmazása mutatkozott. Az 1990-es évek végére bebizonyosodott az, hogy ilyen jellegű fehérjéket és peptideket nemcsak az állati szervezetek és a növények képesek termelni, hanem a gombák is. Ekkora a szakirodalom három, többé-kevésbé jól jellemzett képviselőjükről számolt be, de gombaellenes hatásmódjukról és lehetséges gyakorlati alkalmazásukról nem vagy alig állt rendelkezésre információ. Ebbe a nemzetközi-szintű munkába kapcsolódott be közel húsz éve a Szegedi Tudományegyetem Természettudományi és Informatikai Karának Mikrobiológiai, majd Biotechnológiai Tanszéke. A következő oldalakon ennek a munkának az eredményeibe nyerhet bepillantást az olvasó.

Kulcsszavak: antifungális fehérjék; fonals tömlősgomba; gyógyászat; mikrobiológia; növényvédelem

Antifungális válság egy posztantibiotikus korszak hajnalán

A mikroszkopikus gombák okozta mikózisok (gombák által okozott humán és állati fertőzések) számát igencsak alábecsülték az utóbbi évtizedekben a rutinszerűen alkalmazható fajazonosítási technikák és a nem rendszeres epidemiológiai felmérések hiányának következtében. A molekuláris fajazonosítási technikák bevezetése és a fejlődő országok rendszeressé váló epidemiológiai vizsgálata az utóbbi években azonban rávilágított arra a tényre, hogy a Föld lakosságának mintegy egynegyede szenved valamilyen gomba által okozott fertőzéstől, így ezek jelentik a negyedik leggyakoribb humán megbetegedést a különböző eredetű fejfájások és fogbetegségek után. Egészséges immunrendszerrel rendelkező, immunkompetens egyénekben a gombák elsősorban nem életveszélyes, viszont gyakran visszatérő, nehezen kezelhető, a kültakaró és a nyálkahártya felszínét érintő mikózisokat okoznak. Ezek a fertőzések a legenyégt immunrendszerrel rendelkező, immunszuppresszált betegekben az egész szervezetet érintő, magas halálozási arányszámmal együtt járó, ún. invazív mikózisokká alakulhatnak. Becslések alapján több mint másfél millió ember hal meg évente gombák okozta fertőzések következtében, ami bőven meghaladja a tuberkulózisban és a maláriában elhunytak számát. A mikózisok terápiáját nehezíti az, hogy (ellentétben a baktériumok okozta fertőzések kezelésére használható széleskörű gyógyászati eszköztárral) nem áll rendelkezésünkre megfelelő számú, a klinikumban biztonságosan alkalmazható antifungális (gombaellenes) szer, továbbá ezek gyakran súlyos mellékhatásokat okozhatnak és végérvényesen károsíthatják a páciens egyes szerveit hosszan tartó terápia során. Ennek okát abban kell keresnünk, hogy a gomba- és az emlőssejt között meglévő nagymértékű fiziológiai hasonlóság miatt igen nehéz olyan antifungális hatású vegyületeket találni, amelyek csak a gombára jellemző specifikus célpontokat támadnak, és ennek következtében nem okoznak káros mellékhatásokat az emberi szervezetben. A mikózisok sikeres kezelésének további

hátráltató tényezője az, hogy a terápiás célra alkalmazott számos eltérő típusú és hatásmódú gyógyszerrel szemben a gombák egyre inkább rezisztenssé válnak. Ezt nagymértékben elősegíti az antifungális gyógyszerek profilaktikus (a betegség megelőzésére irányuló) használata és a mezőgazdaságban növényvédőszerként történő alkalmazása; továbbá a gombák széleskörű genetikai eszköztára, amik segítségével képesek a gombaellenes vegyületek károsító hatásait leküzdeni (Galgóczy és mtsai. 2019a).

A gombák által okozott fertőzések megakadályozása és kezelése, azonban nem csak az egészségügy, hanem a mezőgazdaság számára is hatalmas kihívást jelent. A kémiai-alapú növényvédőszerrel szemben rezisztenciát mutató növénypatogén gombák által okozott fertőzések és kártételek esetszáma folyamatos növekedést mutat Európa-szerte az utóbbi években. Ennek egyik oka a klímaváltozás, aminek következtében olyan növényi kórokozó gombafajok terjedhetnek el azokon a mezőgazdasági területeken, ahol azok eddig ismeretlenek voltak elsősorban új, az őket terjesztő invazív gyomnövények megjelenése miatt. A folyamathoz hozzájárulhat, és nagymértékben gyorsíthatja a globális kereskedelem kiszélesedése és egyre intenzívebbé válása, hisz ennek révén számos, más földrészen megjelenő rezisztens növénypatogén gombatorzs juthat el új mezőgazdasági területekre. A növénypatogén gombák által okozott kártételek közvetlenül a haszonnövény szántóföldi elhalásában, vagy a termény raktári körülmények közötti károsodásában nyilvánulnak meg, amik évről-évre euromilliárdos nagyságrendű veszteséget okoznak az agrárszektorban (Galgóczy és mtsai. 2019a).

A fentebb említett tények azt jelzik, hogy a jelenleg alkalmazásban lévő antifungális gyógyszerek és növényvédőszerrel folyamatosan veszítenek a hatékonyságukból és szükségessé teszik alapvetően új, az eddigiektől eltérő hatásmechanizmussal rendelkező, a gombára specifikus, ezáltal mellékhatások

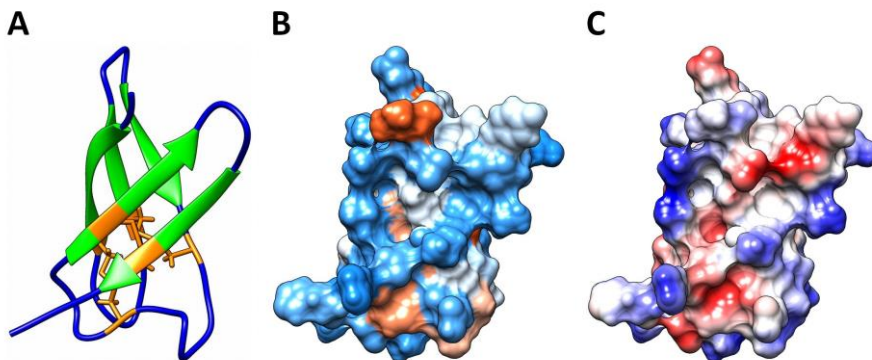
kialakulása nélkül, a gazdaszervezetre nézve biztonságosan alkalmazható antifungális gyógyszereken és növényvédőszeren alapuló stratégiák kidolgozását a gombák okozta fertőzések megelőzésére vagy kezelésére.

Tömlősgomba-eredetű antifungális proteinek

A természetben széleskörben előforduló antifungális hatású fehérjék és peptidok ígéretes gyógyszerjelölt- vagy növényvédőszerjelölt-molekulákként jöhetnek szóba. Az 1990-es évek második felétől néhány, nagyon hasonló szerkezettel rendelkező, kis molekulatömegű, ciszteinben gazdag extracelluláris (a sejtből a környezetbe kijutó), kationos (pozitív töltést mutató) antifungális proteint azonosítottak fonalas tömlősgombákból, elsősorban az *Aspergillus* és *Penicillium* nemzetségekbe tartozó fajokból. Ezek a fehérjék hatékonyan gátolják számos humán- vagy növénypatogénként ismert gomba izolátum növekedését (Sonderegger és mtsai. 2018).

Leszármazás alapján a fonalas tömlősgomba-eredetű antifungális fehérjék (AFP) négy nagy csoportba sorolhatók és az egyes csoportok gombaellenes hatása eltérő lehet. Annak ellenére, hogy aminosav sorrendjük nagymértékben különbözik, mégis minden fehérje szerkezetében megfigyelhető egy vagy két evolúciósan konzervált, ún. γ -core motívum, ami fontos szerepet játszik a gombaellenes hatás kifejtésében. A γ -core motívumot a GXC-X₃₋₉-C aminosavak alkotják (ahol az X bármilyen aminosav lehet), és a fehérje valamelyik hurok régiójában helyezkedik el. Érdeemes megemlíteni, hogy a γ -core motívum jelenléte az élővilágban általánosan elterjedt, ugyanis a növényi- és állati-eredetű antimikrobiális hatással rendelkező fehérjékben és peptidokban egyaránt megtalálható. Érdekes az, hogy egy gomba izolátum több antifungális protein csoport egy, vagy akár több tagjának a termelésére is képes (Sonderegger és mtsai. 2018). Az eltérések ellenére a fonalas tömlősgomba-eredetű antifungális fe-

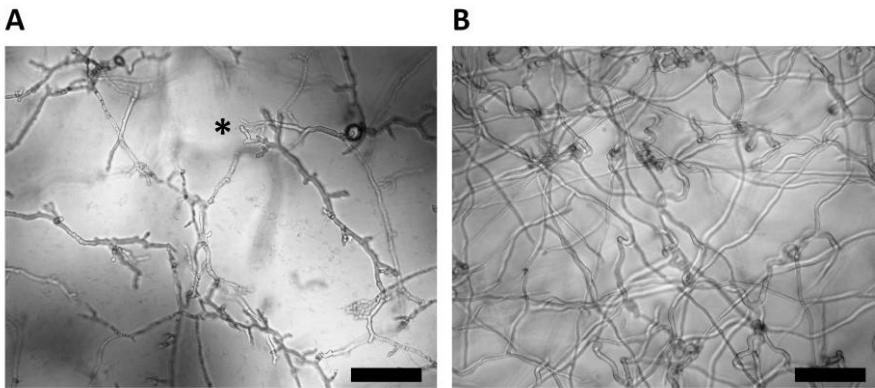
hérjék közös jellemzője a β -redők által alkotott, kompakt, β -hordó-szerű fehérjeszerkezet, amit hat vagy nyolc cisztein molekula között létrejövő három vagy négy kénhíd stabilizál (1. ábra, A). A molekul szerkezet stabilitásához még nagymértékben hozzájárul a hidrofób aminosavak által alkotott, a molekula közepén elhelyezkedő, ún. központi hidrofób mag. Ezek következtében a fehérjék nemcsak hogy ellenállóvá válnak a szélsőséges környezeti körülményekkel (magas vagy alacsony pH, extrém magas hőmérséklet) és fehérjéket bontó enzimek hatásaival szemben, hanem gombaellenes aktivitásukat az ezeknek történő kitettség után is megőrzik. Ugyanis a hatékonyság szempontjából lényeges harmadlagos szerkezetüket nagyon hamar képesek visszanyerni a káros körülmények megszűnését követően (Galgóczy és mtsai. 2017). Az antifungális fehérjék felszínén hidrofil és hidrofób területek váltakozva helyezkednek el (1. ábra, B), ami jó oldhatóságot biztosít számukra különféle oldószerekben. Ehhez hasonlóan pozitív, semleges és negatív töltöttségű területek szintén váltakozó elhelyezkedését figyelhetjük meg a fehérjék felszínén (1. ábra, C). Az ilyen jellegű töltöttségi felszín nagyban elősegíti a fehérje gomba sejtmembránhoz tapadását (Huber és mtsai. 2018; Hajdu és mtsai. 2019; Czajlik és mtsai. 2021).



1. ábra: A *Neosartorya (Aspergillus) fischeri* által termelt NFAP magmágneses rezonancia spektroszkópiával meghatározott oldatbeli szerkezete (Hajdu és mtsai. 2019), mint példa a fonalas tömlősgomba-eredetű antifungális proteinek kompakt, β -hordó-szerű harmadlagos szerkezére. Az NFAP (A) harmadlagos szerkezete, (B) hidrofóbicitás felszíne, (C) töltöttségi felszíne. Az (A) ábrán a β -redőket zöld, a hurokrégiókat kék, míg a ciszteinek között létrejött kénhidákat narancssárga szín jelöli. A (B) ábrán a hidrophil részek kézzel, a hidrophób részek narancssárgával jelöltek. A (C) ábrán a negatíván töltött részek pirossal, míg a pozitíven töltött részek kézzel jelöltek.

Tömlősgomba-eredetű antifungális proteinek hatásmódja

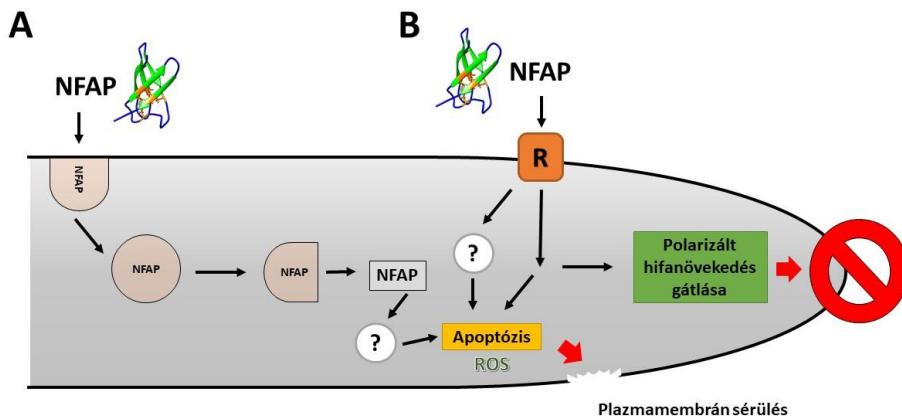
A fonalas tömlősgomba-eredetű antifungális proteinek egy lehetséges hatásmódjába az 1. ábrán látható, a *Neosartorya (Aspergillus) fischeri* által termelt NFAP-nek, egy rá érzékeny általánosan használt laboratóriumi modellgombán (*Aspergillus nidulans*) kifejtett hatásának a tanulmányozásán keresztül nyerhetünk bepillantást. Az *Aspergillus nidulans* csökkent mértékű spóracsírázási képességet mutat NFAP jelenlétében. Ha a hifák (gombafonalak) létre is jönnek a spórákból, azok elhalnak vagy rövidek és többszörösen elágazóak lesznek, ellentétben az egészséges, hosszú, elágazásmentes hifáktól (2. ábra) (Kovács és mtsai. 2011; Galgóczy és mtsai. 2012; Virágh és mtsai. 2015).



2. ábra: (A) *Aspergillus nidulans* hifák morfológiája NFAP jelenlétben az (B) egészséges hifákkal összehasonlításban. A „*” az NFAP jelenlétében bekövetkező morfológiai változást (rövid, többszörösen elágazó hifa) jelzi. A fekete négyzet 50 μm távolságot jelöl.

Pásztázó elektronmikroszkópos és fluoreszcens festési eljárásokon alapuló vizsgálatok alapján a jelenség háttérében a sejtfalat felépítő kitin fonalak elrendeződésének a megváltozása állhat. Ugyanis, már rövid időtartamú NFAP-kezelés hatására a hifa apikális (csúcsi) részén elhelyezkedő, egészséges gyűrű-szerű aktin (ami a kitin megfelelő helyre történő juttatásáért felel a fejlődő hifában) mintázat rendezetlenné válik és ezzel párhuzamosan a kitin a szabályos sapka-szerű mintázat helyébe a hifa csúcs alatti részén rendezetlenül jelenik meg. Mindez azt jelzi, hogy az NFAP közvetlen vagy közvetett módon befolyásolja a növekvő hifa csúcsi részének az aktin mintázatát, így a kitin eloszlást is, ami az egészséges polarizált (egyirányú) növekedés megzavarását és rövid, többszörösen elágazó hifák létrejöttét vonja maga után. Az ilyen hifákban a metabolikus folyamatok megszűnése és nagy mennyiségű reaktív oxigén gyökök felhalmozódása által kiváltott apoptózis (programozott sejthalál) figyelhető meg. Egy közvetett immunfluoreszcens festési eljárás azt jelezte, hogy az NFAP, a rövid idejű kezelés hatására bekövetkező apoptotikus folyamatok létrejöttéhez a sejt külső rétegében helyezkedik el. Innen egy energia-

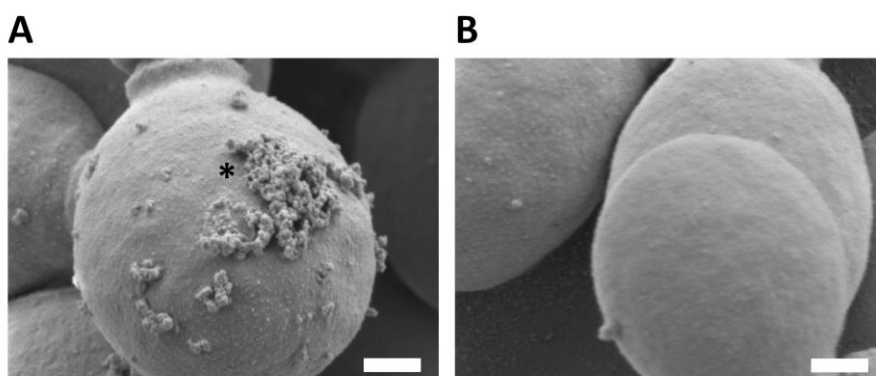
függő vakuoláris transzportfolyamattal jut be a sejtbe, és a vakuólumokból kiszabadulva ismeretlen célponton keresztül apoptózist vált ki, amit a plazmamembrán sérülése és a sejt szétesése követ. Az NFAP vélhetően egy gomba specifikus receptorhoz is kötődik és egy olyan jelátviteli útvonalat kapcsol be, amin keresztül gátolja a polarizált hifanövekedést és apoptózist hoz létre. Mindemellett egy másik, egy ettől független jelátviteli útvonal aktiválásával egy eddig ismeretlen célponton keresztül szintén apoptózist indukál (3. ábra) (Galgóczy és mtsai. 2012; Virágh és mtsai. 2015; Hajdu és mtsai. 2019)



3. ábra: Az NFAP feltételezett hatásmechanizmusa *Aspergillus nidulans*-ban. (A) Az NFAP vakuoláris transzportfolyamattal bejut a sejtbe, majd a vakuólumokból kiszabadulva egy ismeretlen célponton (?) keresztül apoptózist vált ki, ami reaktív oxigén gyökök (ROS) felhalmozódásával és a plazmamembrán sérülésével jár együtt. (B) Az NFAP vélhetően egy gomba specifikus receptorhoz (R) kötődve egy olyan jelátviteli útvonalat kapcsol be, amin keresztül gátolja a polarizált hifanövekedést és apoptózist is létrehoz. Mindezek mellett egy másik, egy ettől független jelátviteli útvonal aktiválásával egy eddig ismeretlen célponton (?) keresztül szintén apoptózist indukál.

Eddigi vizsgálatok alapján egy másik *Neosartorya (Aspergillus) fischeri* által termelt antifungális proteinnek, az NFAP2-nek a gombaellenes hatásmechanizmusa ennél jóval egyszerűbb. Az NFAP2 nem csökkenti élesztőgomba

sejtek (*Saccharomyces cerevisiae* és *Candida albicans*) metabolikus aktivitását és nem vált ki apoptózist rövid időtartamon belül, viszont nagymértékben roncsolja a plazmamembránt. Pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálatok alapján a plazmamembrán roncsolása egy pórusképző folyamaton keresztül valósul meg. A létrejövő pórusokon keresztül a sejt tartalom a külvilágba kerül, amit a sejt pusztulása követ (4. ábra) (Tóth és mtsai. 2016; Kovács és mtsai. 2019).



4. ábra: Az (A) NFAP2 pórusképző hatása *Candida albicans* sejten az (B) egészséges sejtekkel összehasonlításban. A „*” a pórusok létrejöttét jelöli, amin keresztül a sejt tartalom a külvilágba kerül. A fehér négyzet 100 nm távolságot jelöl.

Tömlősgomba-eredetű antifungális proteinek lehetséges alkalmazása

A tömlősgomba-eredetű antifungális fehérjék gyógyászati és növényvédelmi célra történő gazdaságos alkalmazását hátráltatta az, hogy a fehérje termelődése szempontjából figyelembe vehető környezeti körülmények optimalizációja ellenére is a gomba csak kis mennyiségben választja ki őket a környezetébe. Ennek a problémának a megoldására ma már rendelkezésünkre állnak fermentálható, élelmiszer- és gyógyszeripari szempontból biztonságosnak

nyilvánított, az antifungális proteinek nagy mennyiségben termelő genetikailag módosított *Pichia pastoris* (Virágh és mtsai. 2014) és *Penicillium chrysogenum* (Sonderegger és mtsai. 2016) gombatörzsek.

Gyógyászat

A tömlősgomba-eredetű antifungális proteinek terápiás hatékonyságának a vizsgálata és gyógyszerként történő alkalmazásának megkezdése előtt többek között elengedhetetlen annak a felderítése, hogy rendelkeznek-e bármiféle károsító hatással az emberi sejtekre nézve. Ennek a legegyszerűbb módja az, hogy ún. citotoxicitási tesztek hajtanak végre velük különböző humán sejtvonalakon. Eddigi eredmények alapján a legtöbb antifungális protein (köztük a korábban említett NFAP és NFAP2) nem károsítja a humán keratinocitákat, dermális fibroblasztokat, monocitákat és bélhámsejteket; továbbá nem okoznak eritrolízist (a vörösvértestek feloldódása) még a gombaellenes hatékonyság szempontjából szükséges fehérjekoncentráció többszörösénél sem (Kovács és mtsai. 2019; Tóth és mtsai. 2020a,b). Az ígéretes citotoxicitási és gombákon végrehajtott érzékenységi tesztek eredményei alapján az NFAP2 és számos más fonalas tömlősgomba-eredetű antifungális protein biztonságosan és hatékonyan alkalmazható lehet gombaellenes gyógyszer-rezisztens *Candida* élesztőgombafajok által okozott mikózisok kezelésére (Tóth és mtsai. 2018; Galgóczy és mtsai. 2019b; Kovács és mtsai. 2019; 2021). Azonban számítógépes modellezések azt mutatták, hogy az NFAP2 nagymértékben kötődhet a humán szérumalbuminhoz, ami a gombaellenes hatás kiváltása szempontjából lényeges gyógyászati tulajdonságait károsan befolyásolhatja. Ezek miatt az NFAP2 invazív gombafertőzések kezelésére történő intravénás alkalmazása kizárt. Ennek ellenére az NFAP2 alkalmas antifungális szer lehet élesztőgombák okozta felszíni mikózisok kezelésére biofilmellenes hatása következtében (Kovács és mtsai. 2019; 2021). Biofilmképzés során a gombasejtek letapadnak

egy felszínre (pl. nyálkahártya) és ott egybefüggő bevonatot képeznek, gyakran egy általuk termelt extracelluláris polimer anyagba ágyazódva. Biofilm formában a gombasejtek nagyobb ellenállóképességet mutatnak a gombaellenes gyógyszerekkel szemben. A fonalas tömlősgomba-eredetű antifungális proteinek biofilmellenes hatékonysága bebizonyosodott egy flukonazol-rezisztens *Candida albicans* gombatörzs által okozott vulvovaginitis kezelése során egy egérmodell rendszerben, ott ahol a klinikumban általánosan használt gyógyszer hatástalannak bizonyult. A vulvovaginitis a külső női nemi szervnek és/vagy a hüvelynek a gyulladását jelenti. Ezt a betegséget a *Candida albicans* is képes kiváltani, és a fertőzés kezelésére általában flukonazol alkalmaznak. A flukonazol-rezisztens *Candida albicans* törzsek elterjedésével a fertőzés sikeres kezelése egyre nagyobb kihívássá vált. A flukonazol-rezisztens *Candida albicans* törzs által okozott egér vulvovaginitis modellben a flukonazzal ellentétben az NFAP2 a nyálkahártya felszínén közvetlenül alkalmazva jelentősen csökkentette az élő gombasejtek számát. Érdekes módon flukonazzal kombinálva pedig még hatékonyabbnak bizonyult, ami felveti annak a lehetőségét, hogy valamilyen módon képes a gombasejt flukonazzal szemben mutatott védekezőképességét csökkenteni. Szövetteni vizsgálatok bizonyították, hogy az NFAP2 jelenlétében nem alakult ki *Candida albicans* biofilm a hüvely nyálkahártyájának felszínén. Mindemellett érdemes megjegyezni, hogy az NFAP2 alkalmazása nem okozott súlyos patológiai elváltozásokat az érintett szervekben. Ezekkel az eredményekkel bizonyítást nyert egy fonalgomba-eredetű antifungális protein gyógyászati hatékonysága élesztőgomba által okozott felszíni mikózis biztonságos kezelésében (Kovács és mtsai. 2019).

Mezőgazdaság

A fonalas tömlősgomba-eredetű antifungális proteinek, azonban nem csak a humánpatogén élesztőgombák, hanem a növénypatogén fonalgombák (pl.

Aspergillus, *Botrytis*, *Cladosporium* és *Fusarium* nemzetségekre tartozó fajok) ellen is hatásosnak bizonyultak érzékenységi tesztekben (Czajlik és mtsai. 2021; Tóth és mtsai. 2020a,b; Gandía és mtsai. 2021). Ez a megfigyelés felvette biofungicidként (természetes eredetű gombaölő készítmény) történő lehetséges alkalmazásukat a növény- és termésvédelemben. Ennek a lehetőségnek az egyik alapfeltétele az, hogy ne befolyásolják károsan a növény fejlődését és ne legyenek toxikusak a növényi sejtekre nézve. Növények fejlődésére gyakorolt hatásukat *Medicago truncatula* lucerna csíranövény toxicitás modellben lehet vizsgálni. Eddigi megfigyelések alapján a fonalas tömlősgomba-eredetű antifungális proteinek nem befolyásolják a fejlődő növény morfológiáját, és nem okoznak változást a főgyökér hosszában és a mellékgyökerek számában. Növényi sejten mutatott lehetséges sejtmembrán károsító hatásuk vizsgálata során egyik antifungális protein sem roncsolta a paradicsomnövény levelét, ugyanis jelenlétükben a növényi sejtmembrán ép maradt (Czajlik és mtsai. 2021; Tóth és mtsai. 2020a,b). Növényvédelmi modellkísérletek eredményei alapján a fonalas tömlősgomba-eredetű antifungális proteinek hatékonyan gátolják a *Botrytis cinerea* (szürkepenész) által okozott fertőzés kialakulását paradicsomnövény levelén és megakadályozzák a gomba által képzett biofilm kialakulását (Tóth és mtsai. 2020a,b; 2022). Raktári körülmények között képesek megvédeni a betakarított termést a raktári gombakártevőivel szemben. Így például a paradicsomtermést a *Cladosporium herbarum*-mal (korompenész) (Tóth és mtsai. 2020b), a narancs és alma gyümölcsöket pedig a *Penicillium digitatum*-mal, *Penicillium italicum*-mal és a *Penicillium expansum*-mal (kékpenész) szemben (Gandía és mtsai. 2021).

Megválaszolatlan kérdések

A fentebb ismertetett eredmények alapján a fonalas tömlősgomba-eredetű antifungális proteinek kiváló alapot nyújthatnak új gombaellenes stratégiák kifejlesztésére a gyógyászatban és mezőgazdaságban egyaránt. Azonban számos, az alkalmazásukat befolyásoló kérdés még a mai napig tisztázatlan. Ilyen például, az hogy nem rendelkezünk még kellő és megfelelő ismeretekkel a farmakokinetikai és farmakodinamikai tulajdonságaikról; vagyis arról hogy hogyan és miként viselkednek az emberi szervezetben, ha gyógyszerként alkalmazzuk őket. Másik ilyen fontos kérdés az, hogy milyen hatással lehetnek a környezetre, ha növényvédőszerként szeretnénk alkalmazni őket. Továbbá még az sem tisztázott, hogy a gombák képesek-e az antifungális proteinekkel szemben rezisztenciát kialakítani, illetve milyen gomba specifikus molekuláris célpontjaik vannak ezeknek a fehérjéknek, amiken keresztül kifejtik a gombaellenes hatásukat. A Szegedi Tudományegyetem Természettudományi és Informatikai Karának Biológiai Intézetében az elkövetkező években ezekre a kérdésekre keressük a válaszokat.

Köszönetnyilvánítás

A munka a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal – NKFIH, FK 134343 pályázat támogatásával készült.

Irodalom

Czajlik A, Holzknecht 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 Jan 25;22(3):1183.

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 Feb;159(Pt 2):411-419.

- 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 May 16;7(1):1963.
- Galgóczy L, Marx F. Do antimicrobial proteins contribute to overcoming the hidden antifungal crisis at the dawn of a post-antibiotic era? *Microorganisms.* 2019a;7(1):16.
- 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.* 2019b May;59(5):360-370.
- Gandía M, Kakar A, Giner-Llorca M, Holzknrecht 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 Jun 4;7(6):449.
- 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 May 15;129:511-522.
- 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 Jan 29;8(1):1751.
- Kovács L, Virágh M, Takó M, Papp T, Vágvolgyi C, Galgóczy L. Isolation and characterization of *Neosartorya fischeri* antifungal protein (NFAP). *Peptides.* 2011 Aug;32(8):1724-31.
- Kovács R, Holzknrecht 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 Jan 29;63(2):e01777-18.
- 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 Jan 14;22(2):771.
- 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 Nov 11;15(1):192.
- 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 Jul 20;9:1655.
- 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 Dec;6(1):75.
- 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 Mar 7;9:393.
- Tóth L, Boros É, Poór P, Ördög A, Kele Z, Váradi G, Holzknacht 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.* 2020a Sep;13(5):1403-1414.
- 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.* 2020b May 13;11:820.
- 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(2):249-262.
- Virágh M, Vörös D, Kele Z, Kovács L, Fizil Á, Lakatos G, Maróti G, Batta G, Vágvölgyi 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 Feb;94:79-84.
- Virágh M, Marton A, Vizler C, Tóth L, Vágvölgyi C, Marx F, Galgóczy L. Insight into the antifungal mechanism of *Neosartorya fischeri* antifungal protein. *Protein Cell.* 2015 Jul;6(7):518-28.

