

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**A *PENICILLIUM* ANTIFUNGÁLIS FEHÉRJE  
SZERKEZETÉNEK, DINAMIKÁJÁNAK,  
HŐMÉRSÉKLETI KITEKEREDÉSÉNEK ÉS REJTETT  
KONFORMÁCIÓINAK VIZSGÁLATA**

Fizil Ádám

témavezető:

Prof. Dr. Batta Gyula



DEBRECENI EGYETEM  
Kémiai Tudományok Doktori Iskola

*Debrecen, 2018.*

# I. Az értekezés előzményei és célkitűzései

A fonalas gombák okozta fertőzések elhárítása a humán gyógyászatban, a mezőgazdaságban és az élelmiszeriparban is egyre nagyobb kihívást jelent. Ennek egyik fő oka a leggyakrabban használt antimikotikumokkal szemben kialakuló rezisztencia, illetve az a tény, hogy a fonalas gombák az eukarióta élőlények közé sorolhatók, ezért sejtfelépítésüket, és bioszintetikus útvonalait tekintve sokkal jobban hasonlítanak az emlősökre, mint a prokarióta mikroorganizmusok, például baktériumok. Új antifungális hatóanyagok fejlesztése azért nagy kihívás, mert igen nehéz olyan célmolekulát találni amelynek gátlása révén a gombasejtek növekedését megakadályozhatjuk, ám emlős sejtekben ugyanez a célmolekula nem, vagy más formában található meg, ezért a hatóanyag hatásos, ugyanakkor kellőképpen specifikus és nem toxikus<sup>1</sup>. Egészséges védekezőrendszerrel rendelkező egyénekben létfontosságú szerveket megtámadó gombás fertőzés vagy szisztémás mikózis szinte soha nem fordul elő. Az immunszuppresszív terápiák, illetve az immunhiányos állapottal járó betegségek megjelenésével azonban az emberben előforduló gombás fertőzések száma az utóbbi évtizedekben drámaian növekedett. Ennek következtében az új, hatásos, de biztonságos antifungális hatóanyagok fejlesztése iránt is megnőtt az igény<sup>2</sup>. Ezért az utóbbi évtizedekben intenzív kutatás folyt az ilyen molekulák fejlesztésének irányában. Az egyik ígéretes kutatási irány az ún. antimikrobiális peptidek (AMP-k) azon csoportjának feltárása, melyek specifikusan gátolják a patogén gomba fajok növekedését. Mivel méretükben (50-60 aminosav, 5-7 kDa) a peptidek és fehérjék mérettartományának határán helyezkednek el, a szakirodalom ezeket a molekulákat antifungális peptidekként is emlegeti, azonban a fehérjék tulajdonságaira emlékeztető jól definiált harmadlagos szerkezetük miatt az „antifungális fehérje” kifejezéssel találkozhatunk gyakrabban. Az antifungális fehérjék csoportjába sorolható<sup>3</sup> az általunk vizsgált *Penicillium* antifungális fehérje (PAF), ami az ezidáig izolált vagy szintetizált és biokémiaiailag is jellemzett legalább tíz antifungális fehérje<sup>4-13</sup> közül az egyik legintenzívebben kutatott.

A PAF fehérje kutatása két évtizedre nyúlik vissza. A *paf* gént és a fehérje izolálását 1995-ben írta le egy osztrák kutatócsoport<sup>5</sup>. Ez a csoport és a később a kutatáshoz kapcsolódott partnerek azóta is rendszeresen közölnek újabb eredményeket; évente átlagosan egy publikáció jelenik meg a PAF fehérje biokémiai<sup>14,15,5,16</sup>, fiziológiai<sup>17-26</sup> vagy szerkezeti<sup>14,27,28</sup> vonatkozásában. Kutatócsoportunk 2007-ben csatlakozott ehhez a kutatáshoz. Két éven belül megszületett a két csoport első közös publikációja<sup>14</sup>, melyben elsőként közölték a PAF oldatfázisú térszerkezetét, és ezzel számos új kutatási irány nyílt meg. A térszerkezet pontos ismerete – például a fehérje célzott módosításai révén – biokémiaiailag megalapozottabb kísérletek tervezésére és kivitelezésére ad lehetőséget, melyek a szerkezet-funkció összefüggések feltárására irányulnak. A PAF fehérjét más fehérjékhez viszonyított kis molekulatömege (6,3 kDa), jól definiált harmadlagos szerkezete, és igen jó vízoldhatósága kiváló modellté teszi spektroszkópiai módszerfejlesztésre és fehérje-feltekeredés modellezésére is<sup>28,29</sup>.

Alapszakos hallgatóként a kutatás ezen pontján csatlakoztam a kutatócsoporthoz. Miután szakdolgozatomat és diplomamunkámat is ebben a témában készítettem el, a téma és az alkalmazott szerkezeti biológiai és biotechnológiai módszerek ismeretében világos célkitűzésekkel kezdetem el

doktori munkám kidolgozását. Célkitűzéseimet az alábbi három pontban foglaltam össze.

1. A PAF 2009-ben közölt<sup>14</sup> oldatfázisú térszerkezeti modell esetében a diszulfidhidak kapcsolódási sorrendje tisztázatlan maradt; az akkor rendelkezésre álló kísérleti adatokból ezt nem lehetett teljes biztonsággal meghatározni. Munkám első célkitűzése a ciszteinek kapcsolódási sorrendjének megállapítása és ezt követően a – diszulfidhidak mint szerkezetet meghatározó korlátok, illetve újabb és pontosabb módszerekkel nyert távolsághatárolatok figyelembe vételével – egy pontosabb térszerkezeti modell meghatározása volt.

2. Az oldatfázisú szerkezet ps-ns időskálán történő mozgási tulajdonságait már korábban leírták <sup>15</sup>N-relaxációs adatok Lipari-Szabó analízisének segítségével<sup>14</sup>. A mért S<sup>2</sup> rend paraméterek szerint merev molekulaszervezet feltételezhető a ps-ns időskálán, ami a három diszulfid kötéssel és a β-redős másodlagos szerkezettel értelmezhető. Ezzel azonban ellentmondásban állt, hogy hőmérséklettől függő előkísérleteink eredményei arra utaltak, hogy más időskálákon ez a relatíve merevnek gondolt szerkezet valószínűleg sokkal nagyobb fluktuációkat mutat: az NMR jelek térfogati integrál értékeinek drámai csökkenése magas és alacsony hőmérsékleteken a fehérje rejtett konformációinak oldatbeli jelenlétére utalt. Munkám második célkitűzése az volt, hogy magyarázatot adjak a hőmérséklettől függő kísérletekből származó térfogat-integrál értékek szerkezet-specifikus változásaira, és ezen keresztül jellemezzem az NMR módszer számára láthatatlan konformációs állapotokat, azok szerkezetét és a részleges letekeredés termodinamikáját tekintve. Kvantitatív NMR mérések segítségével azt kívántam meghatározni, hogy a fehérje natív állapotában az oldat vajon milyen arányban tartalmazza a konvencionális NMR módszerekkel megfigyelhető és a közvetlenül nem-megfigyelhető állapotokat. Ezen kívül vizsgálni szándékoztam a hőmérsékleti stressz hatására történő – de a diszulfid hidak által korlátozott – letekeredési folyamat mechanizmusát.

3. Partnerünkkel együttműködésben a PAF számos olyan változatát állítottuk elő a fehérjét kódoló gén célzott mutációjával, amelyekkel a fehérje egyes régióinak működésben és a térszerkezet kialakításában betöltött szerepét kívántuk vizsgálni. Az egy aminosav cserével létrehozott változatok között találtunk olyat is, mely – előzetes vizsgálataink alapján – az eredetivel azonos térszerkezettel rendelkezik, de antimikrobiális aktivitása gyakorlatilag megszűnt. Ezért célul tűztük ki e változat szerkezetének dinamikájának és hőmérsékletváltozás hatására történő kitekeredésének jellemzését, és az eredeti fehérjével való összehasonlítását. Vizsgálatainkkal azt szándékoztunk felderíteni, hogy mely szerkezeti és dinamikai paraméterek megváltozása hozható összefüggésbe az antifungális hatás megszűnésével.

## II. Vizsgált anyagok és alkalmazott módszerek

### A PAF fehérje és módosított változatainak előállítása

Ahogy más biológiai úton előállított molekulákat, a PAF-ot is élő sejtek termelik. Ezeket a sejteket szabályozott módon – laborléptékben lombikban – szaporítjuk, tartjuk életben és a körülmények optimalizálásával minél nagyobb mennyiségű termék termeltetésére készítetünk (a termelő törzset és a technológiát együttesen nevezzük expressziós rendszernek). Munkám során a PAF és változatainak biotechnológiai módszerekkel történő előállítására háromféle rendszert használtam. A kutatás kezdetén *Penicillium chrysogenum* Q176 (ATCC 10002) törzset használtuk, a korábbiakban leírt fermentációs és kromatográfiás lépések szerint<sup>14</sup>.

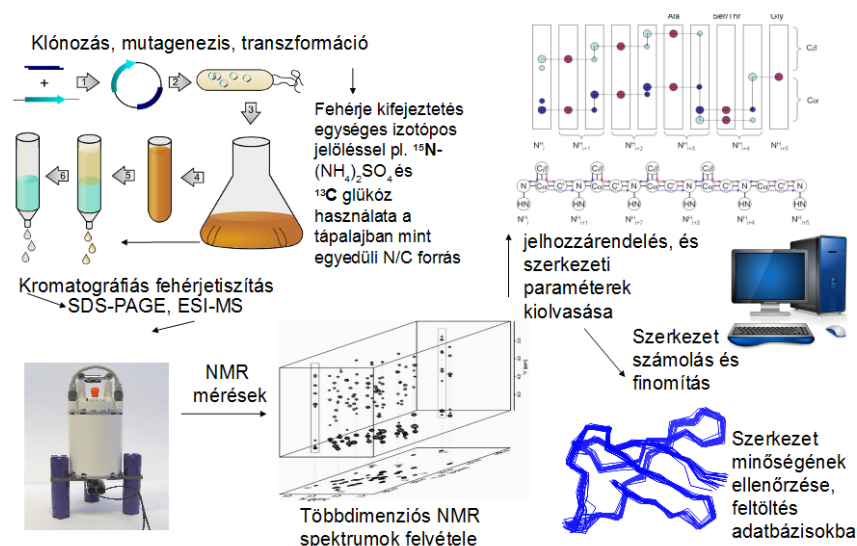
Kísérleteink előrehaladtával felmerült az igény egy a *Penicillium* rendszernél nagyobb fehérjekihozatalra képes expressziós rendszerre, mely egyszerre alkalmas a fehérjét kódoló gén célzott módosítására, és a tápközeg összetételének megfelelő módosítása révén a termelt fehérje tetszőleges (<sup>15</sup>N és/vagy <sup>13</sup>C) stabil izotópos dúsítására. Erre a feladatra az egyik megoldás a *Pichia pastoris* élesztő rendszerben való termeltetés volt, melyről már korábban kimutatták, hogy az eredetivel azonos szerkezetű PAF termelésére alkalmas.<sup>14</sup> Ezzel a módszerrel az alábbi aminosavcserét tartalmazó változatok készültek el: PAF<sup>C7S</sup>, PAF<sup>C14S</sup>, PAF<sup>C28S</sup>, PAF<sup>C7S-C36S</sup>, PAF<sup>C28S-C54S</sup>.

Még később partnereink biotechnológiai fejlesztései révén a *Pichia* rendszernél is nagyobb kihozatalt értük el egy olyan genetikailag módosított *Penicillium chrysogenum* törzsszel, melyből az eredeti *paf* gént génkiütéssel eltávolították<sup>32</sup>, ezáltal elkerülték a natív és módosított termék együttes termelődését, enélkül ugyanis jelentős elválasztástechnikai problémába ütköztünk volna. Ez a PAF variánsokat túltermelni képes törzs az ún. *Δpaf Penicillium C3*, mellyel a korábbi rendszereknél jóval magasabb fehérje-kihozatal (>10mg/L) érhető el, és a *Pichia* rendszernél technológiailag is könnyebben kezelhető (pl. a rövidebb kultivációs idő, egyszerűbb tisztítás). A PAF<sup>D19S</sup> változatot és a hőmérséklettől függő mérésekhez használt <sup>15</sup>N-jelzett és <sup>15</sup>N-<sup>13</sup>C-jelzett fehérjeminták egy részét is ezzel a törzsszel állítottuk elő<sup>32</sup> a disszertációban részletezett technológiai lépésekkel.

A kémiai szintézissel előállított PAF fehérjét és köztitermékeit Dr. Váradi Györgyi (Szegedi Tudományegyetem, Orvosi Vegytani Intézet) szintetizálta natív kémiai ligáció és oxidatív feltekerés módszerek kombinációjával. A PAF fehérjében közvetlenül nem megfigyelhető konformációk mennyiségi meghatározásához<sup>28</sup> referencia vegyületként szükségem volt olyan rövid peptidre, amelynek nincs harmadlagos szerkezete és melyben legalább az egyik amid nitrogén <sup>15</sup>N-re cserélt. Erre a célra az Arg-(<sup>15</sup>N)-Ala-Gln-Ile tetrapeptidet használtuk, amit szintén Dr. Váradi Györgyi szintetizált <sup>15</sup>N-Alanin felhasználásával.

## Az alkalmazott szerkeztvizsgáló módszerek

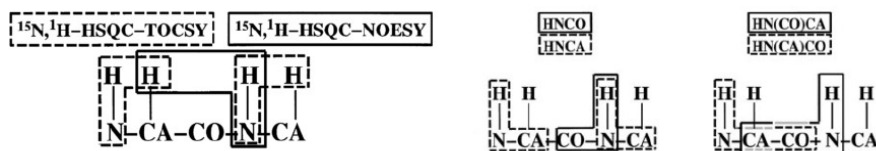
Munkám során a vizsgált molekulák szerkezetét a mágneses magrezonancia (NMR) spektroszkópia eszköztárával vizsgáltam. Az NMR spektroszkópia napjainkra a modern biológia elengedhetetlen eszközévé vált. A gyors technológiai fejlődés révén mára a biológiában kulcsszerepet betöltő makromolekulák (pl. fehérjék és nukleinsavak) atomi felbontású vizsgálatához is elegendő érzékenységet és spektrális felbontást érhetünk el. A modern spektrométerek vezérlésében számos olyan, az NMR kísérleteket irányító program érhető el, mellyel  $^{15}\text{N}$  vagy  $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{C}$  (vagy akár ennél összetettebb) izotópjelzéssel preparált minta birtokában atomi felbontású szerkezeti információkat nyerhetünk a fehérjékről. A lehetőségek messze túlmutatnak a molekulaszerkezet térbeli koordinátáinak meghatározásán: a megfelelő NMR módszer segítségével igen széles időskálán nyerhetünk bőséges információt a makromolekulák mozgásairól és cserefolyamairól is. Munkám során NMR technikák széles palettáját használtam, amit analitikai és számítási módszerekkel egészítettem ki. A fehérjék szerkeztvizsgálatának általános folyamatát az alábbi **1. ábrán** szemléltetem.



1. Ábra: A biotechnológiai úton előállított fehérjék szerkeztvizsgálatának főbb lépései az ún. "biomolekuláris NMR" metodikával.

## De novo fehérjeszerkezt meghatározás

Az atomi felbontású szerkeztvizsgálat céljából kétféle izotópjelölési módszert alkalmaztunk: a fehérje egységes  $^{15}\text{N}$ , illetve  $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{C}$  jelzését. Ennek megfelelően az NMR főlánc jelhozzárendeléshez is kétféle stratégiát alkalmaztam, amit a 2. ábrán szemléltetek. Mindkét izotópjelölési stratégia esetében a csaknem teljes  $^1\text{H}$  jelhozzárendelés és az igen jó spektrális feloldás eredményeként a 3D NOESY spektrumok keresztcúcsainak azonosítására és intenzitásának meghatározására sikeres módszerek mutatkoztak az automatizált ún. ATNOS-CANDID módszer.



2. Ábra: Az alkalmazott kétféle fehérje főlánc jelhozzárendelésének stratégiája. Baloldalt:  $^{15}\text{N}$ - dúsított, jobboldalt:  $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{C}$  dúsított fehérje jellemző főlánc kísérletei. Szaggatott vonal az aminosav egységen belüli, folyamos vonal az egységek közötti korrelációt jelöli.

Ezt a CYANA 2.1 *simulated annealing* alapú molekuladinamikai algoritmussal kombinálva, a szerkezetmeghatározást szolgáló számításokkal egyszerűen végeztem. A szerkezetszámolás során felmerülő hibák keresése érdekében az iterációs ciklusok során kimenetként létrejövő hibaüzeneteket és a H-H távolságokat listázó fájlokat a végső szerkezettel összevetve manuális elemzéssel értelmeztem. Ezen kívül szisztematikusan – egyes H-H atompárok figyelmen kívül hagyásával – is ellenőriztem a számítások robusztusságát. A végső szerkezetet a főlánc  $^{13}\text{C}$  kémiai eltolódásokból számított torziós szög jellegű kényszerfeltételekkel finomítottam, amihez a TALOS<sup>+35</sup> módszert használtam.

## A hőmérsékleti kitekeredés modellezése

A PAF hőmérsékleti kitekeredése során létrejövő, közvetlenül nem megfigyelhető konformációs állapotokat hőmérséklettől függő  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC mérések sorozatával vizsgáltam: a keresztcsúcsok térfogati integrálját hőmérsékletfüggésének széles hőmérsékleti tartományban (-20 - +80°C) való elemzésen keresztül jellemeztem. A közvetlenül megfigyelhető és nem megfigyelhető frakciók arányát figyelembe véve a teljes rendszert aminosav egységként termodinamikailag jellemeztem a Gibbs-Helmholtz egyenletek (illetve azok, egy átmeneti állapottal kiterjesztett változata) alapján.

## Fehérje-dinamikai és cserefolyamatok vizsgálata

A ps-ns időskálán történő molekuláris mozgásokat a kísérleti úton aminosav-egységként meghatározott  $T_1$ ,  $T_2$   $^{15}\text{N}$ -relaxációs idők és heteronukleáris NOE-k modell-mentes (Lipari-Szabó) értékelésével a 2. modell segítségével jellemeztem.

A PAF és a PAF<sup>D19S</sup> oldatbeli szerkezetében kis populációjú, de jelentősen eltérő szerkezetet mutató, közvetlenül nem megfigyelhető konformációit CEST-NMR (Chemical exchange saturation transfer, azaz kémiai csere telítés-átvitel) módszerrel mutattuk ki, illetve az adatokat egy, a szakirodalomban leírt<sup>37</sup> módszer szerint illesztve (Chemex) végeztünk kinetikai és mennyiségi meghatározást.

A PAF<sup>D19S</sup> változat esetében a megváltoztatott oldallánc oldószernek való kitettségét CLEANEX<sup>38</sup> módszerrel határoztuk meg.

## Műszerek, mérési körülmények és szoftverek

Az NMR mérések zömét a Debreceni Egyetemen egy 500 MHz protonfrekvenciával jellemezhető, TXI protondetektálású, 5 mm-es háromsatornás z-gradienses mérőfejjel felszerelt Bruker Avance II típusú (Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten, Németország) NMR spektrométeren végeztem. A hőmérséklettől függő kísérletsorozathoz ugyanezt a spektrométert BBI szélessávú

protondetektálású mérőfejjel használtuk. A NOESY típusú kísérleteket az ELTE-n egy Bruker Avance II-700 spektrométeren is megismételtük, amihez Dr. Bodor Andrea nyújtott segítséget.

A szerkezet meghatározáshoz minden NMR mérés pH=6,0-n, 10 mM nátrium-foszfát puffer és 40 mM NaCl jelenlétében történt, 298K hőmérsékleten. A hőmérséklettől függő kísérleteket is ugyanebben a közegben végeztük.

Az NMR adatok gyűjtését Topspin 2.1, a spektrumok feldolgozását *Topspin* 3.0 szoftverrel végeztem. A szekvenciaspecifikus jelhozzárendelést és a csúcslisták előállítását a *CARA* 2.8.1 szoftverrel végeztem. A titrálások esetében a kémiai eltolódás változások követéséhez a *CCPN Analysis* programcsomag 2.2 verzióját használtam. A NOE keresztcúcsok csúcslistázásához, jelhozzárendeléséhez és a szerkezetszámoláshoz *ATNOS-CANDID*<sup>39</sup> algoritmusokkal kombinálva a *Cyana* 2.1 programot használtam. A dinamikai adatokat a Bruker Dynamics Center segítségével értékeltem. A diéderes szög jellegű kényszerfeltételeket a *TALOS+*<sup>35</sup> algoritmus segítségével határoztam meg. A molekulaszervezetek ábrázolásához és ábrakészítéshez a *PyMOL™ Molecular Graphics System*, 1.7.0.0. szoftvert használtam. A hőmérséklet hatására történő letekeredés modellezéséhez Matlab 7.7 környezetben írt saját programokat használtunk.

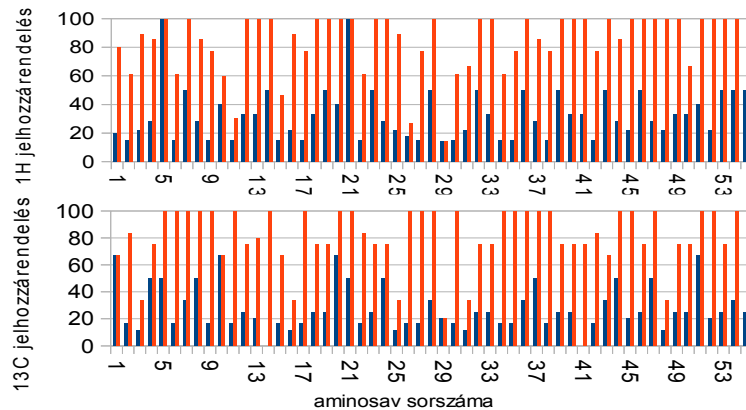
### III. Az értekezés tudományos eredményei

A disszertációmban részleteiben kifejtett tudományos eredményeket hat tézispontban alább foglalom össze.

#### 1. A NMR spektrumok analízisével megadtam a <sup>13</sup>C-<sup>15</sup>N jelzett PAF teljes <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N-<sup>13</sup>C NMR jelhozzárendelését.

A <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N-<sup>13</sup>C jelhozzárendelést a korábbi eredmények figyelembevétele nélkül, azoktól függetlenül oldottam meg. A teljes kémiai eltolódás listát az adatok validálása után hozzáférhetővé tettem a „Biological Magnetic Resonance Data Bank” (<http://www.bmrb.wisc.edu/>) adatbázisba (BMRB azonosító:19657).

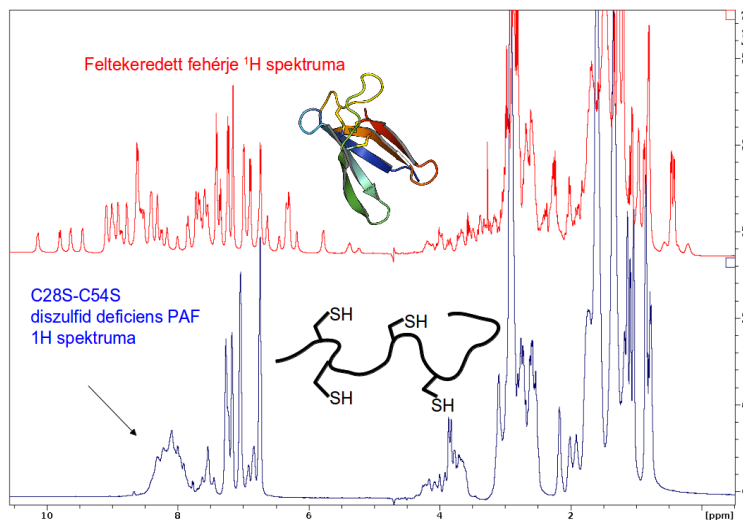
Az új jelhozzárendelés eredményeként a főlánc <sup>1</sup>H-k ( $H^N$ ,  $H_\alpha$ ) jelhozzárendelése 97,3%-os, az oldalláncoké 82,2%-os. Az összes szén vagy nitrogénatomhoz egy kötéssel kapcsolódó hidrogént figyelembe véve a korábbi 69,3%-os <sup>1</sup>H hozzárendelés 87,5%-ra növekedett. Továbbá a <sup>15</sup>N- és <sup>13</sup>C-feloldott NOESY kísérletek kombinációjával a 2D NOESY spektrumon korábban nem feloldható jelek is egyértelműen azonosíthatóvá válhatnak, ami a potenciálisan hibás NOE hozzárendelések számát csökkentheti. Az új jelhozzárendelést a régebbivel összevetve a korábbi adatsorban csupán néhány cisztein  $C_\alpha$  atom esetében találtam téves hozzárendelést, ezek a cserék azonban a korábbi szerkezetmodellezést nem befolyásolhatták, mert ahhoz <sup>13</sup>C kémiai eltolódás adatokat nem használtak fel.



3. Ábra: A PAF  $^1\text{H}$  (felül) és  $^{13}\text{C}$  (alul) NMR jelhozzárendelésének aminosav egységenként való értékelése. Kék oszlopokkal a korábban közölt<sup>14</sup>, pirossal az újabb jelhozzárendelést<sup>28</sup> jelöltem.

## 2. Bizonyítottam, hogy a PAF aminosav szekvenciájában mind a hat cisztein jelenléte elengedhetetlen a fehérje harmadlagos szerkezetének kialakulásához.

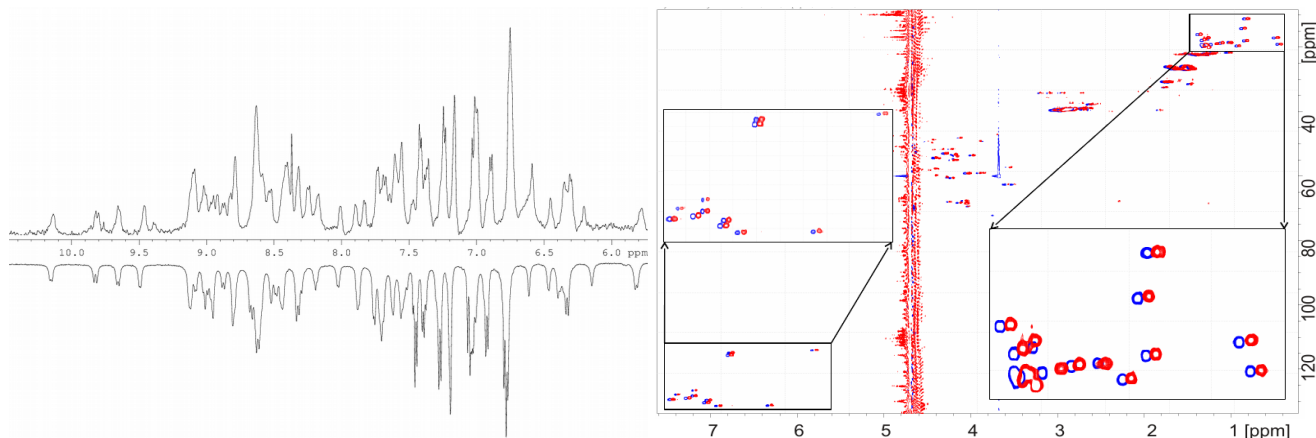
Pontmutációk létrehozásával olyan ciszteinben szegényített PAF változatokat állítottam elő rekombináns fehérjeexpressziós technika segítségével, melyekben a ciszteineket egyenként, vagy páronként szerinre cseréltük. Ezt követően a módosított fehérjéket NMR spektroszkópiával vizsgáltam. Az ilyen módon létrehozott fehérjeváltozatok egyike sem tekeredett fel, ami arra utal, hogy a PAF esetében a harmadlagos szerkezet kialakulásához mind a hat cisztein jelenléte elengedhetetlen.



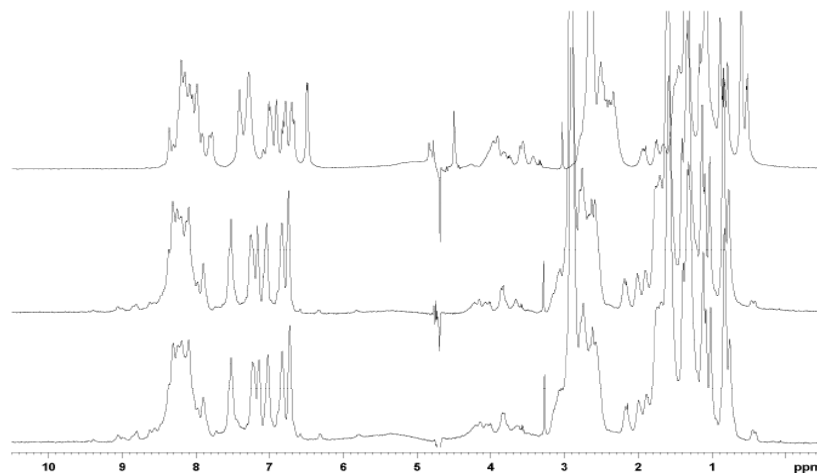
4. ábra: Fent: a natív PAF  $^1\text{H}$  NMR spektruma és harmadlagos szerkezete. Lent: A harmadlagos szerkezettel nem rendelkező PAF formákat jól reprezentáló PAF<sup>C28S-C54S</sup>  $^1\text{H}$  NMR spektruma és feltételezett „szerkezetének” sematikus ábrázolása.

### 3. NMR módszerekkel igazoltam, hogy a szintetikusan előállított PAF térszerkezete azonos a mikrobiális úton termelt PAF szerkezetével.

A csekély mennyiségű – legfeljebb 1 mg – rendelkezésre álló szintézis termékek jellemzése a biotechnológiai úton előállított PAF  $^1\text{H}$  NMR spektrumának összehasonlításával történt. A helyesen feltekeredett forma teljes egyezőségét  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  HSQC mérésel is igazoltuk.



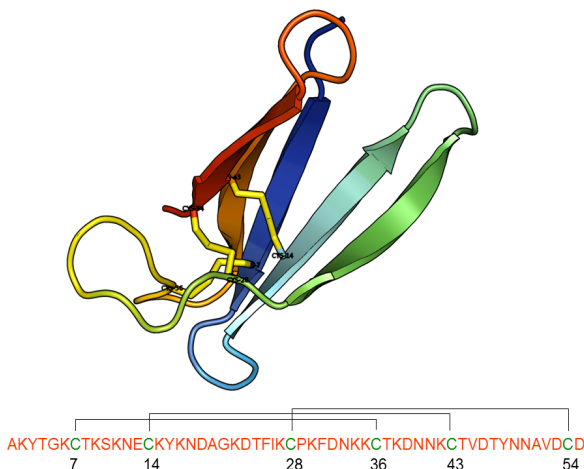
5. **Ábra:** A mikrobiális úton és kémiai szintézissel előállított PAF spektrumai. Baloldalt felül: szintetikus, alul a Penicillium törzsszel termeltetett PAF  $^1\text{H}$  NMR spektrumának amid és aromás  $^1\text{H}$  régiója. Jobb oldalt:  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  korrelációs spektrumok egymásra vetítve (kék: Penicillium által termelt, piros: szintetikus PAF).



6. **Ábra:** A lineáris PAF spontán oxidatív feltekeredésének követése. A három reprezentatív  $^1\text{H}$ -NMR spektrumon fentről lefelé: felül: a lineáris PAF Ar atmoszféra alatt. A 8,5 – 6,5 ppm régióban látható jelek egyértelműen szerkezet nélküli fehérjére utalnak. Középen: ugyanez a minta egy hét elteltével. A feltekeredett formára jellemző 45. valin metil jelek kezdenek láthatóvá válni 0,5 ppm-nél. Alul: a minta beoldása után 9 héttel, melyből 8 hetet szobahőmérsékleten, a levegő oxigénjével érintkezve töltött. A 9-9,5 ppm régióban azonosíthatóak Thr 37, Cys 7 és Cys 14  $\text{H}^{\text{N}}$  jelei, és a 0,5 ppm-nél látható 45. valintól származó metil  $^1\text{H}$  jele. Az integrálok alapján a feltekeredett frakció koncentrációja a korábbihoz képest kétszeresére növekedett, de az átalakulás ezek között a körülmények között nem folytatódott tovább.

#### 4. Meghatároztam a *Penicillium* antifungális fehérje (PAF) oldatfázisú térszerkezetét távolság-jellegű kényszerfeltételek és főlánc kémiai eltolódásokból származtatott torziós szögek alapján.

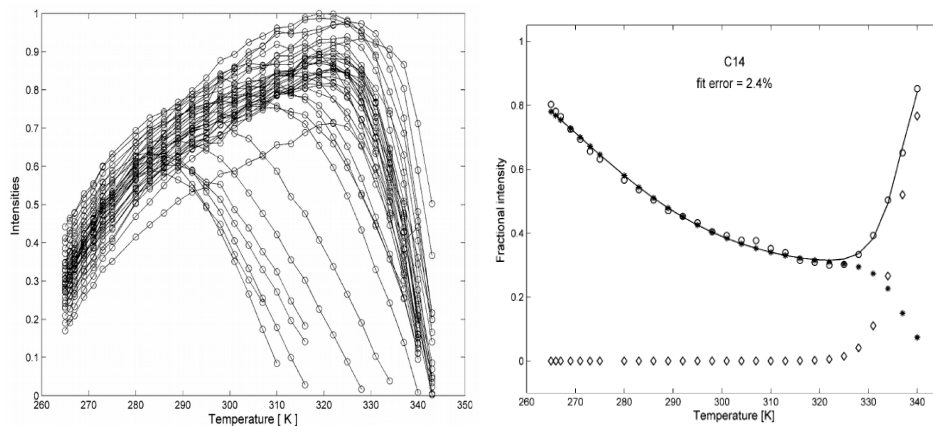
Az új térszerkezeti modell nem tér el lényegesen a korábban javasolt szerkezettől, viszont tartalmazza a független módszerrel meghatározott explicit diszulfidhid mintázatot, továbbá a szerkezet finomítása során figyelembe vettem a  $^{13}\text{C}_{\alpha,\beta}$  kémiai eltolódásokból számolt diéderes szög jellegű korlátokat is. Ezek együttes hatásaként az új modellben a 20 tagból álló konformációs sokaság a korábbi modellhez képest jobban definiált, és a konstitúció is korrekt, hiszen a ciszteinek meghatározott kapcsolódási sorrendjét reprezentálja. A térbeli koordinátákat tartalmazó molekulamodell minősége megfelelt a legnagyobb nemzetközi fehérjeszerkezeteket összegyűjtő adatbázis (Protein Data Bank; [www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)) minőségi kritériumainak, így az adatokat más kutatók számára is hozzáférhetővé tehetjük. (PDB azonosítók: korábban közölt, diszulfidhidakat nem tartalmazó modell: 2KCN; új, diszulfidhidakat tartalmazó modell: 2MHV).



7. ábra: Felül: A PAF térszerkezetének szalagos ábrázolása. A  $\beta$ -szálakat nyilak, a hurkokat és másodlagos szerkezettel nem rendelkező szakaszokat csövek jelölik. A diszulfid kötések sárga pálcákkal jelöltem. Alul: a PAF aminosav szekvenciája egybetűs jelöléssel. Zöld színnel a cisztein oldalláncokat, összekötéssel diszulfid kötésekkel jelöltem.

#### 5. Kimutattam, hogy a PAF oldatfázisú szerkezetében az NMR módszerekkel közvetlenül detektálható konformációkon kívül számos, nehezen megfigyelhető konformációs állapot létezik, melyek aránya hőmérséklet változtatásával eltolható.

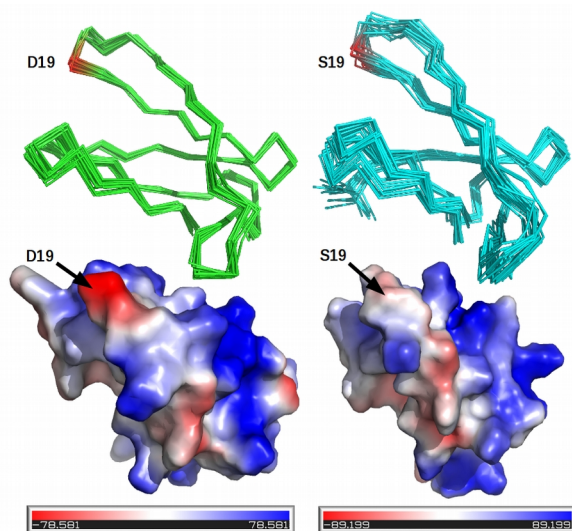
Kvantitatív kétdimenziós sorozatmérések részletes analizisével megbecsültem az NMR módszer számára közvetlenül megfigyelhető és "láthatatlan" konformációk arányát, és széles hőmérsékleti tartományban jellemeztem az egyensúlyi folyamat termodinamikáját. A letekeredés paraméterei függenek a másodlagos szerkezettől; amíg a mozgékonyabb szerkezeti elemek viselkedése (például terminális és hurok régiók) kétállapotú letekeredési modellel is jól illeszthetők, addig a  $\beta$ -redős szerkezeti elemek letekeredésének modellezéséhez legalább három konformációs állapot feltételezése szükséges. A minor konformációk populációja az illesztési modell választástól függetlenül a fehérje maximális stabilitású hőmérsékletén sem elhanyagolható: a fő konformációhoz képest mintegy 30%-ot tehet ki. Ezen kísérletek kiegészítéseként  $^{15}\text{N}$ -CEST-NMR mérések segítségével a fő konformációtól lényegesen eltérő, ám igen kis populációban jelenlévő konformációs állapotokat mutattam ki.



**3. ábra:** Baloldalt: a  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC keresztcsúcsok térfogat integrálja a hőmérséklet függvényében. Jobboldalt: a látható és láthatatlan konformációk populációjának aránya háromállapotú modellel illetve a cisztein 14 aminosav esetén. Jelölések: felteleredett:  $\square$ , átmeneti:  $*$ , letekeredett:  $\diamond$ , a két letekeredett állapot együttesen:  $\circ$ .

**6. A PAF és az antimikrobiális aktivitását tekintve inaktív PAF<sup>D19S</sup> forma szerkezeteinek részletes összehasonlító vizsgálatával kimutattam, hogy a PAF<sup>D19S</sup> biológiai hatásának elvesztésével a fehérje nagy mértékű felületi töltéseloszlás-változása és/vagy a hőmérséklet hatására történő kitekeredés-beli különbség hozható összefüggésbe.**

A pontmutációval létrehozott antifungális hatásában két nagyságrenddel csökkent PAF<sup>D19S</sup> szerkezetének és dinamikájának vizsgálatával bizonyítottam, hogy amíg a két fehérjeforma főlánc konformációjában, kémiai eltolódásaiban nem mutatható ki lényeges különbség, addig a két forma között kisebb dinamikai változások, szignifikáns felületi töltéseloszlás- és hőmérsékleti letekeredés-beli különbségek mutathatók ki, mely különbségek valamelyike vagy azok kombinációja összefüggésbe hozható PAF<sup>D19S</sup> biológiai hatásának elvesztésével.



**6. ábra:** fent: a PAF (baloldalt) és a PAF<sup>D19S</sup> (jobbaldalt) főláncának 20 konformációból álló sokaságának megjelenítése. Piros színnel a 19. pozícióban lévő aminosavat emeltem ki. Lent: vákuumban számolt felszíni töltés eloszlás. Piros: negatív, fehér: semleges, kék: pozitív oldalláncok a fehérje felszínén.

## A t ziszf zetben hivatkozott szakirodalom jegyzéke (List of references cited in the Summary of Thesis)

1. Kathiravan, M. K. *et al.* The biology and chemistry of antifungal agents: A review. *Bioorganic Med. Chem.* **20**, 5678–5698 (2012).
2. De Lucca, A. J. & Walsh, T. J. Antifungal peptides: Novel therapeutic compounds against emerging pathogens. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 1–11 (1999).
3. Marx, F., Binder, U., Leiter,  . & P csi, I. The *Penicillium chrysogenum* antifungal protein {PAF}, a promising tool for the development of new antifungal therapies and fungal cell biology studies. *Cell. Mol. Life Sci.* **65**, 445–454 (2007).
4. Lacadena, J. *et al.* Characterization of the Antifungal Protein Secreted by the Mould *Aspergillus giganteus*. *Arch. Biochem. Biophys.* **324**, 273–281 (1995).
5. Marx, F. *et al.* Cloning, structural organization and regulation of expression of the *Penicillium chrysogenum* paf gene encoding an abundantly secreted protein with antifungal activity. *Gene* **167**, 167–71 (1995).
6. Skouri-Gargouri, H. & Gargouri, A. First isolation of a novel thermostable antifungal peptide secreted by *Aspergillus clavatus*. *Peptides* **29**, 1871–7 (2008).
7. Kovacs, L. *et al.* Isolation and characterization of *Neosartorya fischeri* antifungal protein (NFAP). *Peptides* **32**, 1724–1731 (2011).
8. Eigentler, A., P csi, I. & Marx, F. The *ansin1* gene encodes a defensin-like protein and supports the fitness of *Aspergillus nidulans*. *Arch. Microbiol.* **194**, 427–37 (2012).
9. Seibold, M., Wolschann, P., Bodevin, S. & Olsen, O. Properties of the bubble protein, a defensin and an abundant component of a fungal exudate. *Peptides* **32**, 1989–1995 (2011).
10. Rodríguez-Martín, A. *et al.* Characterization of the novel antifungal protein PgAFP and the encoding gene of *Penicillium chrysogenum*. *Peptides* **31**, 541–547 (2010).
11. Sung, W. S., Lee, J. & Lee, D. G. Fungicidal effect of piscidin on *Candida albicans*: pore formation in lipid vesicles and activity in fungal membranes. *Biol. Pharm. Bull.* **31**, 1906–10 (2008).
12. Choi, H., Hwang, J.-S. & Lee, D. G. Identification of a novel antimicrobial peptide, scolopendin 1, derived from centipede *Scolopendra subspinipes mutilans* and its antifungal mechanism. *Insect Mol. Biol.* **23**, 788–99 (2014).
13. Hwang, J.-S. *et al.* Isolation and Characterization of a Defensin-Like Peptide (Coprison) from the Dung Beetle, *Copris tripartitus*. *Int. J. Pept.* **2009**, (2009).

14. Batta, G. *et al.* Functional aspects of the solution structure and dynamics of PAF--a highly-stable antifungal protein from *Penicillium chrysogenum*. *FEBS J.* **276**, 2875–90 (2009).
15. Kaiserer, L. *et al.* Characterization of the *Penicillium chrysogenum* antifungal protein PAF. *Arch. Microbiol.* **180**, 204–210 (2003).
16. Marx, F. *et al.* Proper folding of the antifungal protein PAF is required for optimal activity. *Res. Microbiol.* **156**, 35–46 (2005).
17. Leiter, É. *et al.* Antifungal Protein PAF Severely Affects the Integrity of the Plasma Membrane of *Aspergillus nidulans* and Induces an Apoptosis-Like Phenotype. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 2445–2453 (2005).
18. 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.* **75**, 294–307 (2010).
19. Hegedüs, N. *et al.* Review The small molecular mass antifungal protein of *Penicillium chrysogenum* – a mechanism of action oriented review. *J. Basic Microbiol.* **51**, 561–571 (2011).
20. Galgoczy, L. *et al.* Sensitivity of different zygomycetes to the *Penicillium chrysogenum* antifungal protein (PAF). *J. Basic Microbiol.* **45**, 136–141 (2005).
21. Oberparleiter, C. *et al.* Active internalization of the *Penicillium chrysogenum* antifungal protein PAF in sensitive aspergilli. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 3598–3601 (2003).
22. Hegedüs, N., Sigl, C., Zadra, I., Pócsi, I. & Marx, F. The *paf* gene product modulates asexual development in *Penicillium chrysogenum*. *J. Basic Microbiol.* **51**, 253–262 (2011).
23. Binder, U. *et al.* Protein kinase A signaling and calcium ions are major players in PAF mediated toxicity against *Aspergillus niger*. *FEBS Lett.* **589**, 1266–1271 (2015).
24. Binder, U., Chu, M., Read, N. D. & Marx, F. The Antifungal Activity of the *Penicillium chrysogenum* Protein {PAF} Disrupts Calcium Homeostasis in *Neurospora crassa*. *Eukaryot. Cell* **9**, 1374–1382 (2010).
25. Hegedüs, N. & Marx, F. Antifungal proteins: More than antimicrobials? *Fungal Biol. Rev.* **26**, 132–145 (2013).
26. Marx, F. Small, basic antifungal proteins secreted from filamentous ascomycetes: a comparative study regarding expression, structure, function and potential application. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **65**, 133–142 (2004).
27. Varadi, G., Batta, G., Kele, Z. & Toth, G. K. Synthesis of PAF, an antifungal protein from *Penicillium chrysogenum* by native chemical ligation. *J. Pept. Sci.* **18**, S68–S68 (2012).
28. 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* 1–10 (2015). doi:10.1002/chem.201404879

29. Kiraly, P. *et al.* Real-time pure shift  $^{15}\text{N}$  HSQC of proteins: a real improvement in resolution and sensitivity. *J. Biomol. NMR* **62**, 43–52 (2015).
30. Rodriguez, E. & Krishna, N. R. An Economical Method for  $\{^{15}\text{N}/^{13}\text{C}\}$  Isotopic Labeling of Proteins Expressed in *Pichia pastoris*. *J. Biochem.* **130**, 19–22 (2001).
31. Multi-copy *Pichia* Expression Kit. *User Man.* (1999).
32. Sonderegger, C. *et al.* A *Penicillium chrysogenum*-based expression system for the production of small, cysteine-rich antifungal proteins for structural and functional analyses. *Microb. Cell Fact.* 15:192 (2016). doi:10.1186/s12934-016-0586-4
33. Liu, M. *et al.* Improved WATERGATE Pulse Sequences for Solvent Suppression in NMR Spectroscopy. *J. Magn. Reson.* **132**, 125–129 (1998).
34. Piotto, M., Saudek, V. & Sklenar, V. Gradient-Tailored Excitation for Single-Quantum Nmr-Spectroscopy of Aqueous-Solutions. *J. Biomol. Nmr* **2**, 661–665 (1992).
35. Shen, Y., Delaglio, F., Cornilescu, G. & Bax, A. TALOS plus : a hybrid method for predicting protein backbone torsion angles from NMR chemical shifts. *J. Biomol. Nmr* **44**, 213–223 (2009).
36. Wider, G. & Dreier, L. Measuring protein concentrations by NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 2571–2576 (2006).
37. Vallurupalli, P., Bouvignies, G. & Kay, L. E. Studying {‘Invisible’} Excited Protein States in Slow Exchange with a Major State Conformation. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 8148–8161 (2012).
38. Hwang, T., Zijl, P. van & Mori, S. Accurate quantitation of water-amide proton exchange rates using the phase-modulated CLEAN chemical EXchange (CLEANEX-PM) approach with a Fast-HSQC. *J. Biomol. NMR* 221–226 (1998).
39. Herrmann T., Güntert P. & Wüthrich K. Protein NMR structure determination with automated NOE-identification in the NOESY spectra using the new software ATNOS. *J. Biomol. NMR* **24**, 19 (2002).
40. Sattler, M., Schleucher, J. & Griesinger, C. Heteronuclear multidimensional NMR experiments for the structure determination of proteins in solution employing pulsed field gradients. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **34**, 93–158 (1999).



Nyilvántartási szám: DEENK/84/2018.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Fizil Ádám  
Neptun kód: Q6W1W1  
Doktori Iskola: Kémiai Tudományok Doktori Iskola  
MTMT azonosító: 10032847

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

#### Idegen nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban (3)

1. Sonderegger, C., **Fizil, Á.**, Burtscher, L., Hajdu, D., Munoz, A., Gaáspári, Z., Read, N. D., Batta, G., Marx, F.: D19S Mutation of the Cationic, Cysteine-Rich Protein PAF: Novel Insights into Its Structural Dynamics, Thermal Unfolding and Antifungal Function.  
*PLoS One.* 12 (1), e0169920-1 - e0169920-21, 2017. EISSN: 1932-6203.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0169920>  
IF: 2.806 (2016)
2. **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.  
*Chem.-Eur. J.* 21 (13), 5136-5144, 2015. ISSN: 0947-6539.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/chem.201404879>  
IF: 5.771
3. Váradí, G., Tóth, G. K., 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.  
*Chem.-Eur. J.* 19 (38), 12684-12692, 2013. ISSN: 0947-6539.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/chem.201301098>  
IF: 5.696





### További közlemények

#### Idegen nyelvű tudományos közlemények hazai folyóiratban (1)

4. Kiss, R., **Fizil, Á.**, Szántay, C.: Az NMR-spektroszkópia szerepe a biológikumok analitikájában.  
*Magy. Kém. F.* 73 (2), 49-55, 2018. ISSN: 0025-0155.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.24364/MKL.2018.02>

#### Idegen nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban (6)

5. 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.* 8 (1), 1751, 2018. EISSN: 2045-2322.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-20002-2>  
IF: 4.259 (2016)
6. Kiss, R., **Fizil, Á.**, Szántay, C.: What NMR can do in the biopharmaceutical industry.  
*J. Pharm. Biomed. Anal.* 147, 367-377, 2018. ISSN: 0731-7085.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2017.07.004>  
IF: 3.255 (2016)
7. Sonderegger, C., Galgóczy, L., Garrigues, S., **Fizil, Á.**, Borics, A., Manzanares, P., Hegedűs, N., Huber, A., Marcos, J. F., 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.* 15 (192), 1-14, 2016. ISSN: 1475-2859.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/s12934-016-0586-4>  
IF: 3.681
8. Bereczki, I., Mándi, A., Róth, E., Borbás, A., **Fizil, Á.**, Komáromi, I., Sipos, A., Kurtán, T., Batta, G., Ostorházi, E., Rozgonyi, F., Vanderlinden, E., Naesens, L., Sztaricskai, F., Herczegh, P.: A few atoms make the difference: Synthetic, CD, NMR and computational studies on antiviral and antibacterial activities of glycopeptide antibiotic aglycon derivatives.  
*Eur. J. Med. Chem.* 94, 73-86, 2015. ISSN: 0223-5234.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.02.028>  
IF: 3.902
9. Binder, U., Bencina, M., **Fizil, Á.**, Batta, G., Chhillar, A. K., Marx, F.: Protein kinase A signaling and calcium ions are major players in PAF mediated toxicity against *Aspergillus niger*.  
*FEBS Lett.* 589 (11), 1266-1271, 2015. ISSN: 0014-5793.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2015.03.037>  
IF: 3.519





10. 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.* 94, 79-84, 2014. ISSN: 1046-5928.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pep.2013.11.003>  
IF: 1.695

Ismeretterjesztő, népszerűsítő cikkek (1)

11. **Fizil, Á.**, Gáspári, Z., Batta, G.: Egy gombaellenes gombafehéreje. PAF, a bűvös hatóanyag.  
*Termész. világa.* 148 (6), 265-268, 2017. ISSN: 0040-3717.

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 34,584**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre):  
14,273**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2018.03.29.

