

**A *PENICILLIUM CHRYSOGENUM* GOMBA ÁLTAL
TERMELT ANTIFUNGÁLIS FEHÉRJÉK**

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

KÉSZÍTETTE: Leiter Éva
molekuláris biológus (mikrobiológus)

TÉMAVEZETŐK: Dr. Pócsi István
habilitált egyetemi docens
Dr. Pusztahelyi Tünde
posztdoktori ösztöndíjas

Debreceni Egyetem
Általános Orvostudományi Kar
2004

Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni tanszékvezetőimnek, Dr. Lenkey Béla egyetemi docensnek és Dr. Pócsi István habilitált egyetemi docensnek, hogy lehetővé tették és támogatták a doktori értekezésem elkészítését a Debreceni Egyetem Természettudományi Karának Mikrobiológiai és Biotechnológiai Tanszékén;

Köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőimnek, Dr. Pócsi Istvánnak és Dr. Pusztahelyi Tünde posztdoktori ösztöndíjasnak segítségükért, szakmai irányításukért, hasznos tanácsaikért;

Dr. Emri Tamás egyetemi adjunktusnak az enzimológiai és apoptotikus munkákban nyújtott nélkülözhetetlen segítségéért;

Dr. Florentine Marx és Prof. Dr. Hubertus Haas oktatóknak (Department of Molecular Biology, Medical University of Innsbruck, Innsbruck, Austria), hogy lehetővé tették számomra a PAF-vel kapcsolatos munkákba való betekintést és támogatták szakmai fejlődésemet, illetve, hogy az új, közlés alatt álló kísérleti eredményeik egy részét dolgozatomban bemutatthattam;

Dr. Szappanos Henriettának és Dr. Csernoch László professzornak (Debreceni Egyetem, OEC, Élettani Intézet) a hiperpolarizációs munkákban nyújtott segítségükért;

Hegedűs Nikoletta szakdolgozónak a közös munkákban mutatott kitartásáért;

a Tanszék összes dolgozójának a sok segítségért, amellyel munkámat támogatták.

Tartalomjegyzék

Rövidítések	6. o.
1. Bevezetés	7. o.
1.1 Kis móltömegű antifungális fehérjék	7. o.
1.2 Glükóz oxidázok	13. o.
2. Célkitűzések	16. o.
3. Anyagok és módszerek	18. o.
3.1 Az antifungális fehérjék izolálására használt törzs tenyésztése	18. o.
3.2 Az antimikrobiális fehérjék tisztítása, jellemzése	19. o.
3.2.1 A fehérjék tisztítása	19. o.
3.2.1.1 A PAF tisztítása	19. o.
3.2.1.2 A GOX tisztítása	20. o.
3.2.2 A fehérjék móltömegének és izoelektromos pontjának meghatározása	21. o.
3.2.3 A GOX szekvenálása	21. o.
3.2.4 A GOX aktivitásának mérése	22. o.
3.2.5 A GOX enzimkinetikai paramétereinek meghatározása	22. o.
3.3 Az antimikrobiális fehérjék hatásspektrumának vizsgálata	23. o.
3.3.1 Az antimikrobiális hatás meghatározásához használt törzsek és tápközegek	23. o.
3.3.2 Az antimikrobiális hatás meghatározása	24. o.
3.4 Az antimikrobiális fehérjék hatásmechanizmusának vizsgálata	24. o.
3.4.1 A PAF hatásmechanizmusának vizsgálata	24. o.
3.4.1.1 A vizsgálatokban használt törzsek és tápközegek	24. o.
3.4.1.2 A PAF membránpotenciált befolyásoló hatásának kimutatása	25. o.
3.4.1.3 A PAF G-proteinnel kapcsolt hatásának kimutatása	25. o.
3.4.1.4 A reaktív oxigénformák (ROS) lokalizálódásának detektálása	26. o.
3.4.1.5 Apoptózis vizsgálatok	26. o.
3.4.1.5.1 Protoplasztok előállítása	26. o.
3.4.1.5.2 Annexin V festés	27. o.
3.4.1.5.3 DAPI festés	27. o.
3.4.1.5.4 TUNEL festés	28. o.
3.4.1.5.5 Elektron mikroszkópiás vizsgálatok	28. o.
3.4.1.6 A PAF hatása humán sejtekre	29. o.

3.4.1.6.1 A PAF hatása immunsejtekre	29. o.
3.4.1.6.2 A PAF hatása egyéb emlős sejtekre	30. o.
3.4.2 A GOX hatásmechanizmusának vizsgálata	30. o.
3.4.2.1 A GOX detektálása immunfestéssel <i>Aspergillus nidulans</i> ban	30. o.
3.4.2.2 A steady-state H ₂ O ₂ koncentráció meghatározása a GOX/kataláz rendszerben	31. o.
3.5 A fehérjetartalom és száraztömeg meghatározása	32. o.
3.6 Statisztikai módszerek	32. o.
3.7 Felhasznált vegyszerek	32. o.
4. Eredmények	33. o.
4.1 A PAF hatásmechanizmusa	33. o.
4.1.1 A PAF hiperpolarizációt indukál az <i>Aspergillus nidulans</i> sejtmembránján	33. o.
4.1.2 A PAF G-proteinnel kapcsolt jelátviteli útvonalon keresztül fejt ki hatását	35. o.
4.1.3 A PAF hatására ROS akkumulálódik az <i>Aspergillus nidulans</i> mitokondriumaiban	37. o.
4.1.4 A PAF apoptózist okoz a szenzitív gombákban	38. o.
4.1.5 A PAF hatása emlős és humán sejtekre	41. o.
4.1.5.1 A PAF hatása immunsejtekre	41. o.
4.1.5.2 A PAF hatása más emlős sejtekre	43. o.
4.2 A glükóz oxidáz jellemzése	44. o.
4.2.1 A <i>Penicillium chrysogenum</i> ból származó nagy móltömegű antifungális fehérje tisztítása, jellemzése	44. o.
4.2.2 A glükóz oxidáz hatásspektruma	50. o.
4.2.3 A glükóz oxidáz hatásmechanizmusának vizsgálata	52. o.
5. Az eredmények megbeszélése	56. o.
5.1 A <i>Penicillium chrysogenum</i> antifungális proteinjének (PAF) jellemzése	56. o.
5.1.1 A PAF hiperpolarizációt indukál az <i>Aspergillus nidulans</i> sejtmembránján	56. o.
5.1.2 A PAF G-proteinnel kapcsolt jelátviteli útvonalon keresztül fejt ki hatását	57. o.
5.1.3 A PAF apoptózist indukál a szenzitív törzsekben	59. o.
5.1.4 A PAF-nek nincs gyulladáskeltő hatása	60. o.
5.1.5 A PAF hatása egyéb emlős sejteken	61. o.
5.1.6 A PAF lehetséges alkalmazásai	61. o.
5.2 A <i>Penicillium chrysogenum</i> glükóz oxidázának jellemzése	62. o.

5.2.1 A glükóz oxidáz tisztítása, enzimológiai jellemzése	62. o.
5.2.2 A glükóz oxidáz hatásspektrumának vizsgálata	63. o.
5.2.3 A glükóz oxidáz hatásmechanizmusának vizsgálata	64. o.
5.2.4 A <i>P. chrysogenum</i> GOX lehetséges felhasználása	65. o.
6. Összefoglalás	66. o.
6.1 A <i>Penicillium chrysogenum</i> kis móltömegű fehérjéje (PAF)	66. o.
6.2 A <i>Penicillium chrysogenum</i> glükóz oxidáza (GOX)	66. o.
7. Irodalom	68. o.
8. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények és előadások	78. o.

Rövidítések

AFP	<i>Aspergillus giganteus</i> által termelt antifungális fehérje
Anafp	<i>Aspergillus niger</i> antifungális fehérjéje
Dm-AMP1	<i>Dahlia merckii</i> ből izolált defenzin
GOX	glükóz oxidáz
H ₂ DCFDA	2',7'-diklorodihidrofluoreszcein diacetát
HSE	heat shock element (a hősokk szabályozásában transzkripciós faktorokat kötő DNS szakaszok)
IEF	isoelectrofocusing (izoelektromos fókuszálás)
LPO	laktoperoxidáz
LPS	lipopoliszacharid
NAF	<i>Penicillium nalgiovense</i> antifungális fehérjéje
NRE	nitrogen regulatory element (nitrogén anyagcsere szabályozásában résztvevő transzkripciós faktor)
OB	oligonucleotide/oligosaccharide binding (oligonukleotid/oligoszacharid kötő)
PAF	<i>Penicillium chrysogenum</i> antifungális fehérjéje
PBS	phosphate buffer saline (0,9 % NaCl-ot tartalmazó foszfát puffer)
PS	foszfatidil-szerin
ROS	reactive oxygen species (reaktív oxigén formák)
Rs-AFP2	<i>Raphanus sativus</i> ból izolált defenzin
STRE	stress response element (a stresszválaszban szerepet játszó transzkripciós faktorokat kötő DNS szekvenciák)
TLR	Toll-szerű receptor (Toll-like receptor)

1. Bevezetés

1.1 Kis móltömegű antifungális fehérjék

Az 1970-es évek óta egyre inkább növekszik az emberi mikrobiális fertőzések száma. Ez egyrésztől tulajdonítható az immunszuppresszív terápiáknak, betegségeknek (pl. leukémia) vagy fertőzéseknek, amelyek legyengítik a szervezet védekező képességét (pl. AIDS), valamint egyre nagyobb azoknak a mikroorganizmusoknak a száma, amelyek eredendő rezisztenciával rendelkeznek vagy a hosszantartó kezelések miatt rezisztenssé váltak az antibiotikumokkal szemben. Ezért mindenképpen szükséges olyan új antimikrobiális hatású anyagok fejlesztése, amelyek megfelelnek az új kihívásoknak. Ezt a lehetőséget jelenthetik azok a kis móltömegű, széles hatásspektrumú fehérjék, amelyeket széles körben termelnek humán, emlős, gomba és növényi sejtek, illetve megtalálhatóak baktériumokban is (Pócsi és munkatársai, 2001; Marx, 2004). Ezekkel a fehérjékkel szemben csak nagyon kevés esetben sikerült rezisztenciát kifejleszteni a mikroorganizmusoknak.

Habár ezek az antimikrobiális fehérjék változatos aminosav szekvenciát és másodlagos-harmadlagos szerkezetet mutatnak, jellemző rájuk a kis molekulatömeg, a bázikus jelleg és hogy nagy részük a célsejtek membránjának permeabilizációját okozza. A gerincesekben talált proteinek nagy része 3-6 kDa móltömegű, bázikus, 3 diszulfid híddal rendelkező **defenzin**, amely az előbbieken említett membránkárosító hatással rendelkezik. Egyes típusaik pórusokat képeznek a membránon, míg mások szőnyegszerűen befedik a membrán felületét (Ganz, 1999). Szerkezetüket tekintve 3 nagy csoportba sorolhatóak: α -, β - és θ -defenzinek. Az α -defenzinek humán és emlős neutrofilokban és az intesztinális Paneth-sejtekben termelődnek, a β -defenzineket epitelsejtek termelik, míg a ciklikus θ -defenzineket *Rhesus* majmokban izolálták. Antimikrobiális hatásukat *in vivo* fagocitákban, illetve a bőr, valamint a nyálkahártya felszínén fejtik ki, mivel ezek a fehérjék hatásukat elvesztik nagy ionerősségű környezetben, kivéve a ciklikus θ -defenzineket. Mindamellet ezek a proteinek rendkívül fontos szerepet töltenek be az immunrendszer működésében. Növelik a fagocitózist, elősegítik a neutrofil granulociták migrációját a fertőzött szövetekhez, növelik az inflammatorikus citokinek termelődését, gátolják az anti-inflammatorikus mediátorok képződését, indukálják a komplement rendszert kemokin és Toll-szerű receptorokon (TLR) keresztül, ezzel hozzájárulnak a mikrobák gyors és hatékony eliminálásához, így aktív szereplői a celluláris adaptív immunválasznak is (Yang

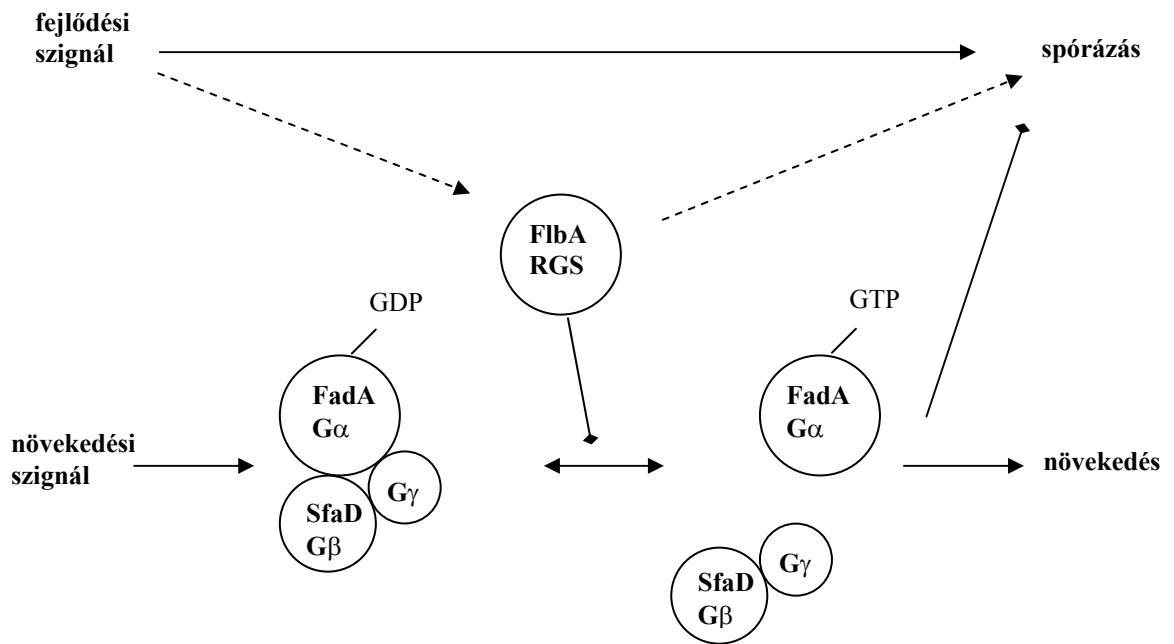
és munkatársai, 2002). Ráadásul az α -defenzin-1,-2 és 3-ról, amelyeket CD8⁺ effektor T-sejtek termelnek, kimutatták, hogy HIV ellenes hatással rendelkeznek (Zhang és munkatársai, 2002). Egerekben a defenzineknek tumorellenes hatását sikerült bizonyítani (Biragyn és munkatársai, 2002).

Az emlősökben található antimikrobiális hatású fehérjék másik nagy csoportját a **cathelicidinek** alkotják (Lehrer és Ganz, 2002). Szerkezetüket tekintve egy N-terminális cathelin doménből és egy C-terminális antimikrobiális hatású részből állnak. Emberben ez a fehérje a hCAP-18, amelynek érett formája az LL-37 nevezetű peptid. Az érett forma egy neutrofil elasztáz hatására alakul ki. A hCAP-18 neutrofil granulumban tárolódik. Hasonlóan a defenzinekhez antimikrobiális hatása mellett szintén fontos szerepet játszik az adaptív immunválaszban kemotaktikus anyagként is.

A növényekben többféle védekezési mechanizmus alakult ki a patogén mikróbákkal szemben, mint pl. a sejtfal módosítása, antimikrobiális hatású szekunder metabolitok termelése (fitoalexinek), lítikus enzimek (kitinázok, glükánázok) termelése vagy kis móltömegű fehérjék, ún. **defenzinek** előállítás (Thevissen és munkatársai, 2000). Növényekben 80 különböző defenzint sikerült mindezidáig izolálni és jellemezni. A növényi defenzinek szintén bázikus fehérjék, szerkezetüket meghatározza a 8 cisztein által képzett 4 diszulfid híd (Thomma és munkatársai, 2002). Ezeket a fehérjéket nagy mennyiségben a magvakból sikerült izolálni, de vegetatív növényi szövetekben is termelődnek. Hatásukat tekintve különböznek az emlős defenzinektől és ez alapján két csoportra oszthatóak. Egyes növényi defenzinek a fonalas gombákra hatva, a hifacsúcsok torzulását, rövid elágazásokat idéznek elő, pl. Rs-AFP2 (*Raphanus sativus*-ból izolált; Terras és munkatársai, 1995), míg más fehérjék nem okoznak morfológiai változásokat, pl. Dm-AMP1 (*Dahlia merckii*-ből izolált; Osborn és munkatársai, 1995). Ezek a növényi defenzinek nagy valószínűséggel receptorhoz kötődve, G-protein mediált jelátviteli útvonalon keresztül hatnak (Thevissen és munkatársai, 1996) és a célsejtekben K⁺-effluxot és Ca²⁺ felvételt okoznak, megváltoztatva a membránpotenciált. Ugyanakkor nagyobb mennyiségben alkalmazva membrán permeabilizáló hatást is mutatnak, valószínűleg kötőhelytől független módon. A Dm-AMP1 a *Saccharomyces cerevisiae* sejtmembránjában található mannóz-(inozitol-foszfát)₂-ceramidhoz kötődik, aminek a hiánya rezisztenciához vezet (Thevissen és munkatársai, 2000). A dohányból izolált ozmotin, amely a PR-5 (pathogenesis-related) családhoz tartozik *in vivo* és *in vitro* is antifungális hatással rendelkezik (Yun és munkatársai, 1997; Garcia-Olmedo és

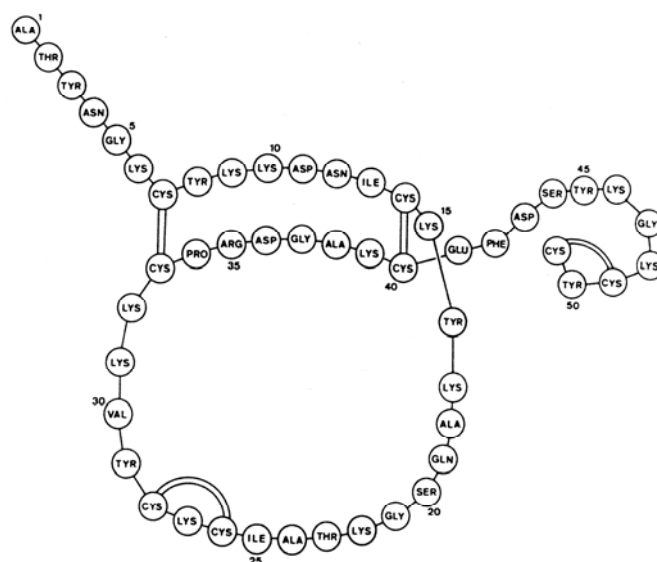
munkatársai, 1998). *Saccharomyces cerevisiae*ben programozott sejthalált, apoptózist indukál azáltal, hogy gátolja a RAS2/cAMP/PKA stresszválasz útvonalat, illetve reaktív oxigénformák (ROS) képzését generálja, valamint a redukált glutation mennyiségét csökkenti (Narasimhan és munkatársai, 2001).

*Aspergillus nidulans*ban az ozmotin hatása G-proteinnel kapcsolt jelátviteli útvonalon keresztül valósul meg. Ebben a fajban a növekedést és sterigmatocisztin szintézist egy G-proteinnel mediált szignáltranszdukciós útvonal szabályozza, amelynek két fontos eleme az FlbA és FadA fehérjék (Adams és munkatársai, 1998; Rosén és munkatársai, 1999). A FadA egy G-protein α -alegységét kódolja, amely aktív állapotban növekedési szignált közvetít és gátolja a spórázást, míg az FlbA fehérje ennek az alegységnek a GTP-áz aktivitását növeli, így blokkolva a FadA-val kapcsolt jelátviteli útvonalat. Ezért a $\Delta flbA$ mutáns nem képes spórázásra, és autolizáló fenotípust mutat. A $fadA^{G203R}$ domináns interferáló mutáció gátolja a $G\alpha$ alegység leválását a $G\beta\gamma$ alegségről, amely ennél fogva a szignál útvonal állandó gátlását eredményezi és hipersporuláló fenotípusban nyilvánul meg (**1. ábra**). A $G\alpha$ alegység (FadA), amelynek aktiválása micéliális növekedést indukál és a $G\beta$ alegység (SfaD), amely szintén növekedést indukál és gátolja a sporulációt, fontos szerepet játszik az ozmotinnal szembeni érzékenységben. A $fadA^{G203R}$ domináns interferáló és $\Delta sfaD$ *Aspergillus nidulans* mutánsok rezisztensek az ozmotinra. Az FlbA fehérje - amely stimulálja a $G\alpha$ alegység (FadA) GTP-áz aktivitását - hiánya ($\Delta flbA$ mutáció) szintén rezisztenciát okoz az ozmotinnal szemben (Coca és munkatársai, 2000).



1. ábra Az FlbA, SfaD és FadA fontos szerepet játszanak az *Aspergillus nidulans* növekedésében és fejlődésében. Az aktivált FadA G α (GTP-t köt) növekedést indukál és gátolja a sporulációt. Az FlbA egy GTP-áz aktiváló fehérje, azaz inaktíválja a FadA-t (GDP-t köt) (Rosén és munkatársai, 1999).

Antimikrobiális hatású, ciszteiben gazdag, bázikus proteineket gombákból is izoláltak. Az *Aspergillus giganteus* kis móltömegű fehérjéje (AFP) 51 aminosavból áll, 4 diszulfid hidat tartalmaz, móltömege 6000 Da és izoelektromos pontja 8,8 (Nakaya és munkatársai, 1990) (2. ábra).



2. ábra Az *Aspergillus giganteus*ből izolált antifungális fehérje (AFP) szerkezete (Nakaya és munkatársai, 1990)

Az érett AFP egy hat aminosavval hosszabb inaktív prekursor fehérjéből hasad le és nagy mennyiségben a tenyésztés 70-80. órájában mutatható ki extracellulárisan (Martínez-Ruiz és munkatársai, 1997). Nem mutat antimikrobiális hatást baktériumokkal és élesztőkkel szemben. Az AFP MIC értéke 6-25 μM fonalas gombákra: *Trichoderma koningii*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium purpurogenum* (Lacadena és munkatársai, 1995). Az AFP termelődése több faktor által is szabályozott (Meyer és munkatársai, 2002). Az *afp* gén transzkripcióját befolyásolja a pH (PacC transzkripciós faktor által, *afpP1* és *afpP2* kötőhelyeken a gén promoterében) (Meyer és munkatársai, 2002), savas pH gátolja, lúgos pH fokozza az AFP termelődését. Különböző stressz faktorok is hatással bírnak a fehérje termelődésére (HSE és STRE elemek találhatóak az *afp* gén promoterében). Az *afp* gén fokozott expresszióját figyelték meg hő sokk hatására, valamint NaCl és etanol jelenlétében, ezzel szemben H_2O_2 és nitrogénéhezés jelentősen csökkentette az AFP termelődését. A tápközegben jelenlevő foszfát is jelentős mértékben gátolja az *afp* gén transzkripcióját (Meyer és Stahl, 2002). Az AFP hatásmechanizmusa többrétű. Térszerkezete oligonukleotid/oligoszacharid (OB) kötő motívumot tartalmaz és így

nukleotidkötő tulajdonsággal rendelkezik. Ez a fehérje neutralizálja a DNS töltését és a DNS kondenzációját okozza (Martínez del Pozo és munkatársai, 2002). Ráadásul az AFP az érzékeny gombákban membrán permeabilizációt is okoz (Theis és munkatársai, 2003), illetve *in vitro* az unilamelláris savas foszfolipid vezikulák aggregációját is indukálja (Lacadena és munkatársai, 1995). Mivel az AFP hatása csak fonalas gombákon jelentkezik, nagy a valószínűsége annak, hogy specifikus receptorhoz kötődik a célsejteken. Azonban az AFP hatása megszüntethető kationokkal, amelyek valószínűleg telítik az esetleges AFP kötőhelyeket. Meglepő módon a rezisztens gombák is felveszik az AFP-t és lehetséges, hogy vakuólumaikban tárolják, mivel ez a fehérje rendkívül ellenálló proteázokkal szemben (Lacadena és munkatársai, 1995).

Az *Aspergillus niger*ből származó antimikrobiális hatású fehérje (Anafp) 58 aminosavból áll és 6 ciszteint tartalmaz. Az Anafp antifungális hatást mutat fonalas és élesztő gombákkal szemben (MIC: 4-15 μM), de nincs antibakteriális hatása (Lee és munkatársai, 1999).

A *Penicillium chrysogenum* fonalas gombából izolált antifungális hatású fehérje (PAF) 42,6 %-ban homológ az AFP-vel, 37 %-ban homológ az Anafp-vel és 100 %-os homológiát mutat a *Penicillium nalgiovense* antifungális fehérjéjével (NAF) (Geisen, 2000).

Az érett fehérje 55 aminosavból áll és a 92 aminosavas prekursor formából hasad le, 6500 Da móltömegű és 6 ciszteint tartalmaz. A *paf* gén 3 exonból és 2 intronból épül fel és expressziója karbon katabolikus (CreA kötőhelyekkel) és nitrogén metabolikus represszió (GATA motívumok a promoterben, NRE kötőhelyekkel) alatt áll (Marx és munkatársai, 1995). Így a PAF termelődése szacharóz szénforráson és nitrát nitrogénforráson figyelhető meg. A PAF hatása fonalas gombákon jelentkezik (pl. *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Trichoderma koningii*), gátolja a csírázást és torzult morfológiai formákat: a hifacsúcsok megduzzadását, illetve rövid hifa elágazásokat okoz (Kaiserer és munkatársai, 2003). A PAF az érzékeny gombákban K^+ -effluxot, reaktív oxigénformák akkumulálódását és csökkent metabolikus aktivitást eredményez. Ugyanakkor hasonlóan más antimikrobiális fehérjékhez a PAF káros hatása látványosan kivédhető kationok jelenlétében (pl. Mg^{2+} , K^+ és Na^+). Immunfluoreszcens festéssel kimutatták, hogy a PAF bejutása aktív transzporttal, endocitózissal történik, amely megakadályozható a légzési lánc gátlásával, konkrétan KCN és NaN_3 alkalmazásával (Oberparleiter és munkatársai, 2003).

1.2 Glükóz oxidázok

A glükóz oxidázok (GOX-ok) H_2O_2 és D-glükono- δ -lakton képződését katalizálják D-glükózból oxigén jelenlétében (Fogarty és Kelly, 1990):



A GOX flavoprotein, 2 FAD koenzimmel rendelkezik, a reakció során két hidrogént von el a glükózzal, miközben saját maga redukálódik, majd a redukált forma molekuláris oxigénnel újra oxidálódik. A δ -lakton spontán hidrolizál D-glükonsavvá. A GOX elterjedt a gombák körében, pl. *Aspergillus niger*, *Penicillium amagasakiense*, *P. notatum*, *P. glaucum*, *P. vitale* termelik, de izolálták dolgozó méhekből, ahol a nektár átalakításában fontos a GOX (Taormina és munkatársai, 2001; Ohashi és munkatársai, 1999) és *Helicoverpa zeaból*, ahol a képződő H_2O_2 antiszeptikus hatást biztosít (Eichenseer és munkatársai, 1999). Rendkívül fontos szerepe van a ligninbontó gombák esetében, mivel H_2O_2 -t termel a lignin lebontásához, pl. *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus* fajokban (Fogarty és Kelly, 1990).

Az iparban *Aspergillus niger*ből állítják elő és a D-glükonsav termelésére használják. A pH befolyásolja a termelődött szerves sav típusát, pH 2 alatt citromsav, pH 5,5-6,0 körül glükonsav képződik, illetve az enzim savas pH-n inaktíválódik (Petruccioli és munkatársai, 1993), ezért a pH-t CaCO_3 -tal kell kontrollálni (Mischak és munkatársai, 1985). *Penicillium variable* esetén az enzim Fe^{2+} -vel aktiválható, míg a Mg^{2+} ion inaktíválja az enzim működését. Ezzel ellentétes hatást tapasztaltak *Penicillium purpurogenum* esetén (Nakamatsu és munkatársai, 1975). Ugyanakkor a GOX enzimátikus jellemzőit lényegesen nem befolyásolja az enzim deglikozilációja (a GOX glikoprotein) (Kalisz és munkatársai, 1991, 1997), viszont jelentősen megkönnyíti az elektron átadását a különféle akceptoroknak, ezért ennek a deglikozilált formának a használata előnyösebb bioszenzorokban. Ráadásul a fehérjéhez kötött szénhidrátlánc nem befolyásolja a fehérje negyedleges szerkezetének kialakulását sem (Witt és munkatársai, 1998). Annak ellenére, hogy a GOX termelésére a leghatékonyabb szénforrás a glükóz, *Penicillium pinophilum*-ban szacharózt alkalmaztak, mivel ellentétben más *Penicillium* fajokkal, a képződő fruktóz jó szénforrás és a tápközeg savasodása elmarad, így a pH kontrollálására nincs szükség (Rando és munkatársai, 1997).

A GOX legtöbb esetben két alegységből felépülő homodimer, 150000-192000 Da móltömeggel (Fogarty és Kelly, 1990). Az enzim pH optimuma 4,5-7,0 közötti *Penicillium* és *Aspergillus* fajokban. A GOX specifikus a β -D-glükózra, 157-szer gyorsabban játszódik le a reakció, mint az α -D-glükóz esetében, a K_m érték β -D-glükózra 11 mM *Penicillium amagasakiensében* és 30 mM *Aspergillus nigerben*, míg a V_{max} 15,35 katkg⁻¹ *P. amagasakiensében* és 7,6 katkg⁻¹ *A. nigerben* (Witt és munkatársai, 1998).

A GOX enzimatis aktivitása során termelődött H₂O₂ antimikrobiális hatással rendelkezik. A méz antimikrobiális hatása a GOX által termelt H₂O₂-ből származik (Taormina és munkatársai, 2001). *Helicoverpa zeaban* antibakteriális hatást okoz és a GOX inaktíválja a növényi oxidatív enzimeket is (pl. peroxidáz, polifenol oxidáz) (Eichenseer és munkatársai, 1999). A *Talaromyces flavus* által termelt GOX fontos a *Verticillium dahliae* által okozott betegségek kivédésében, hiszen a GOX gátolja ennek a fitopatogén gombának a csírázását és növekedését (Madi és munkatársai, 1997).

Az élelmiszeriparban több alkalommal is történtek próbálkozások arra, hogy a glükóz/GOX rendszert, mint antimikrobiális hatású anyagot hasznosítsák és ezzel növeljék a tárolt élelmiszerek felhasználhatóságának élettartamát, pl. szárnyasok (Jeong és munkatársai, 1992) esetében. A glükóz és a GOX együttes alkalmazása eltávolítja az oxigént az élelmiszerekből, így megakadályozza a melanizációt is (Begliomini és munkatársai, 1995). Természetesen a glükóz/GOX rendszerrel szembeni érzékenységet az is meghatározza, hogy a mikroorganizmusok rendelkeznek-e antioxidánsokkal, pl. katalázzal, glutationnal (Fuglsang és munkatársai, 1995). A glükóz/GOX/kataláz rendszert szintén az oxigén eltávolítása miatt alkalmazzák széleskörben az élelmiszeriparban (Kantt és munkatársai, 1993; Dondero és munkatársai, 1993), ugyanakkor a képződött H₂O₂ is teljesen elbomlik, ami esetleg savasodást okozhatna a lipidek oxidációja miatt (Fuglsang és munkatársai, 1995). Ezért tartósításra inkább az utóbbi glükóz/GOX/kataláz rendszer tűnik alkalmasabbnak.

A laktoperoxidáz (LPO)/hidrogén peroxid/tiocianát rendszerben a szükséges hidrogén peroxidot a glükóz oxidáz biztosítja. Az antimikrobiális hatása abból adódik, hogy a mikroorganizmusok fehérjéinek szulfhidrid csoportjait oxidálja (Popper és munkatársai, 1997). A tiocianát (SCN⁻) ionok cseréje jodid (I⁻) és jodát (IO₃⁻) ionokra nagyobb antimikrobiális hatást eredményez (Revol-Junelles és munkatársai, 2001; Cailliez-Grimal és munkatársai, 2002). Ez azért lehet lényeges, mivel a tiocianáttal működő rendszer nem alkalmazható sem Európában, sem az USA-ban toxicitása miatt, így

a jodid vagy jodát bevonása felhasználhatóvá teszi az LPO alapú rendszert az élelmiszeriparban.

Jó eredmények születtek a GOX/LPO enzimek együttes alkalmazásával biofilmek eltávolításában is. A biofilmek komoly orvosi problémát jelentenek, pl. dentális plakkokat képeznek a szájbán, valamint kontaminálják az endoszkópot, kontaktlencsét, katétereket és implantátumokat (Johansen és munkatársai, 1997).

2. Célkitűzések

Mint ahogy a bevezetőben említettem, egyre több azoknak a mikroorganizmusoknak a száma, amelyek rezisztenciát fejlesztettek ki különféle antibiotikumokkal, sőt sok esetben a kombinált antibiotikumos kezelésekkel szemben is. Ezért szükséges új antimikrobiális szerek előállítása, pl. a különböző szervezetek genetikailag kódolt védekező képességét biztosító fehérjék kiaknázása révén. Választásunk a *Penicillium chrysogenum* által termelt kis móltömegű fehérjére (PAF) esett, amelyet már korábban leírtak Dr. Florentine Marx és munkatársai (1995), azonban hatásspektrumát és hatásmechanizmusát még nem tárták fel.

Kísérleteink kezdetén a *Penicillium chrysogenum* NCAIM 00237 ipari penicillin-termelő törzs fermentlevével *Candida albicans*-ellenes vizsgálatokat végeztünk. A fehérje tisztítások során kiderült, hogy ez a hatás egy enzimnek, a glükóz oxidáznak tulajdonítható, míg a fermentléből sikeresen izoláltuk a PAF-t is, amely hatástalan volt a *Candida* tesztörzsre.

A PAF-nek 2003-ban sok tulajdonsága vált ismertté. Ezeket az eredményeket szoros együttműködésben értem el Dr. Florentine Marx munkacsoportjával (Department of Molecular Biology, Medical University of Innsbruck, Innsbruck, Austria). Így sikerült igazolnunk, hogy antimikrobiális hatása csak fonalas gombákon jelentkezik, rövid elágazások képződését okozza a hifacsúcsokban. *Aspergillus niger*ben oxidatív stresszt, *Aspergillus nidulans*ban K^+ -effluxot indukál (Kaiserer és munkatársai, 2003). Egy további közleményben Dr. Florentine Marx és munkatársai leírták, hogy a PAF aktív transzporttal lép be a gombasejtekbe és a citoplazmában lokalizálódik (Oberparleiter és munkatársai, 2003).

Ezekre az eredményekre alapozva doktori munkámban a következőket vizsgáltam meg a PAF-vel kapcsolatban:

- (1) Okoz-e a PAF membránpotenciál változást a hifacsúcsokban, amely a kiváltója lehet a torzult morfológiai formák megjelenésének?
- (2) Mivel a PAF aktív transzporttal lép be a sejtekbe, elképzelhető, hogy receptorhoz kötődik a célsejteken és G-proteinnel kapcsolt jelátviteli útvonalon fejti ki hatását. Ez utóbbi igazolására G-proteinben sérült *Aspergillus nidulans* mutánsokat használtunk és G-protein inhibíciós vizsgálatokat végeztünk.

- (3) Mivel a PAF reaktív oxigénformák (ROS) megjelenését indukálja, lehetséges-e, hogy ezek főleg a mitokondriumokban akkumulálódnak károsítva azokat?
- (4) Az oxidatív stressz kiválthat-e programozott sejthalált?
- (5) Végezetül, mivel reményeink szerint a PAF-t a gyógyászatban is lehet majd alkalmazni, ezért több emlős és humán sejtenyészetben citotoxicitási vizsgálatokat végeztünk.

Fontosnak tartottuk a *Candida*-ellenes hatást mutató glükóz oxidáz jellemzését is. Erről az enzimiről ismert, hogy az általa katalizált reakcióban termelődő hidrogén-peroxid antimikrobiális hatású. Ezért doktori munkámban a glükóz oxidázzal kapcsolatban a következőket vizsgáltam meg:

- (1) A *Penicillium chrysogenum* által termelt glükóz oxidáz móltömege, enzimkinetikai paraméterei mennyiben térnek el más fajokétól (pl. *Aspergillus niger*étől)?
- (2) Mennyire tér el a különböző mikroorganizmusok oxidatív stresszel szembeni érzékenysége, így a glükóz oxidázzal szembeni szenzitivitása?
- (3) Kivédhető-e a glükóz oxidáz hatása antioxidánsok, pl. C-vitamin, kataláz alkalmazásával?
- (4) Milyen gyakorlati alkalmazásai lehetnek a glükóz oxidáznak, pl. az élelmiszeriparban? (Citotoxicitása miatt nem alkalmazható a gyógyászatban.)

3. Anyagok és módszerek

3.1 Az antifungális fehérjék izolálására használt törzs tenyésztése

Kísérleteinkben egy ipari penicillin-termelésben felhasznált, *Penicillium chrysogenum* (NCAIM 00237) törzs folyékony, rázatott, minimál táptalajon felnevesztett tenyészeit használtuk. A törzs fenntartása Chapek-Dox, illetve Sabouraud táptalajon történt.

A Chapek-Dox táptalaj összetétele:

0,3 % (w/v) NaNO_3

0,1 % (w/v) K_2HPO_4

0,05 % (w/v) KCl

0,05% (w/v) $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$

0,001 g (w/v) $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$

3 % (w/v) szacharóz

2 % (w/v) agar

pH=6,6

A Sabouraud táptalaj összetétele:

1 % (w/v) kazein pepton (Merck, Darmstadt, Németország)

2 % (w/v) glükóz

1,7 % (w/v) agar

pH=5,6

A szilárd táptalajon termelődött spórákat az alábbi összetételű minimál tápközegbe mostuk át:

0,3 % (w/v) NaNO_3
0,05 % (w/v) KCl
0,05 % (w/v) $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
0,005 % (w/v) $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
2 % (w/v) szacharóz
25 mM foszfát-pufferben
pH=5,8

A tápoldat 100 ml-ét 10^8 spórával oltottuk és rázógépből 25 °C-on, 250 rpm fordulatszámon, 72-144 óráig rázattuk.

3.2 Az antimikrobiális fehérjék tisztítása, jellemzése

3.2.1 A fehérjék tisztítása

3.2.1.1 A PAF tisztítása

A PAF tisztítása a *P. chrysogenum* 72 órás tenyészetéből történt. A tisztítás minden lépését 4 °C-on végeztem.

A fehérjetisztítás lépései:

1. Koncentrálás:

A centrifugált és szűrt fermentlét ultraszűréssel (Amicon Stirred Cell, 50 ml; Biomax PBTK ultrafiltration disc, polyethersulfone, MWCO 30000 Da, Millipore, Billerica, MA, USA) koncentráltam a kiindulási térfogat 1/5-ére, majd a pH-t 6,6-ra állítottam.

2. Kationcserés kromatográfia:

Az ioncserés kromatográfiát CM Sephadex Fast Flow (2x18cm, Amersham-Pharmacia, Uppsala, Sweden) 50 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ (pH 6,6) pufferrel ekvilibrált oszlopon végeztem, 1ml/perc áramlási sebességgel. Az elúció 50 mM NaH₂PO₄/ Na₂HPO₄, 0,05 és 1M NaCl (pH 6,6) gradienssel történt és 3 ml-es frakciókat szedtem. Az antifungális hatást mutató (3.3.2 fejezet) frakciókat egyesítettem, 50 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ (pH 6,6) pufferrel szemben dializáltam és gyárilag kész 16 %-os TRIS/GLICIN gélen történő SDS-PAGE-sel (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) ellenőriztem a fehérje tisztaságát (3.2.2 fejezet).

3.2.1.2 A GOX tisztítása

A glükóz oxidáz tisztítása a *P. chrysogenum* 72 órás tenyészetéből történt. A tisztítás minden lépését 4 °C-on végeztem.

A fehérjetisztítás lépései:

1. Koncentráálás:

A centrifugált és szűrt fermentlét ultraszűréssel (Amicon Stirred Cell, 50 ml; Biomax PBTK ultrafiltration disc, polyethersulfone, MWCO 30000 Da, Millipore, Billerica, MA, USA) koncentráltam a kiindulási térfogat 1/20-ára, majd 25 mM imidazol/HCl (pH 7,3) pufferrel szemben dializáltam.

2. Kromatofókuszálás:

A dializált fehérje oldatot 25 mM imidazol/HCl (pH 7,3) pufferrel ekvilibrált PBE 94 kromatofókuszáló oszlopra (1x18cm, folyási sebesség: 0,5 ml/perc) vittem fel. Az oszlopot Polybuffer 74 (Pharmacia Biotech, Uppsala, Svédország) pufferrel eluáltam, 2 ml-es frakciókat szedve. A frakciók pH-ját, fehérjetartalmát ($\lambda=280$ nm), antifungális aktivitását (3.3.2 fejezet) határoztam meg. A legalább 20 %-os antifungális hatást mutató frakciókat egyesítettem.

3. Gélszűrés:

A kromatofókuszált, egyesített frakciókat ultraszűréssel 1 ml térfogatra tömörítettem (Centriprep centrifugal filter unit YM-3, MWCO 3000 Da illetve Ultrafree CL, MWCO 10000 Da, Millipore, Billerica, MA, USA) és Superdex 200 FPLC oszlopon (24 ml, Amersham Pharmacia, Uppsala, Sweden) 0,2 M NaCl és 50 mM NaHPO₄ (pH 7,0) pufferrel eluáltam.

Az enzim tisztaságát gyárilag kész 10 %-os TRIS/GLICIN gélen történő SDS-PAGE-sel (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) ellenőriztem (3.2.2 fejezet).

3.2.2 A fehérjék móltömegének és izoelektromos pontjának meghatározása

A PAF és a GOX relatív móltömegének meghatározása Laemmli (1970) módszere szerint gyárilag elkészített 16 és 10 %-os TRIS/GLICIN gélen SDS-PAGE-sel történt Mark12 (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) móltömeg standardsor felhasználásával: miozin (200 kDa), β -galaktozidáz (116,3 kDa), foszforiláz b (97,4 kDa), marha szérum albumin (66,3 kDa), glutamát dehidrogenáz (55,4 kDa), laktát dehidrogenáz (36,5 kDa), szénsav anhidráz (31 kDa), tripszin inhibitor (21,5 kDa), lizozim (14,4 kDa), inzulin B lánc (3,5 kDa), inzulin A lánc (2,5 kDa).

A GOX izoelektromos pontjának meghatározásához gyárilag készített IEF (pH 3-7) és 16 % TRIS/GLICIN SDS-PAGE géleket használtam (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

A fehérje mintákat redukáló pufferrel elegyítettem (Tris-Glycine 2x sample buffer, L2676, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) és 5 percig, 95 °C-on hőkezelttem.

3.2.3 A GOX szekvenálása

Az N-terminális aminosav szekvencia meghatározása gáz/folyadék szekvenátorban Edman lebontással történt (Lindner és munkatársai, 1998). A fehérje identifikálását az első 14 aminosav alapján protein-protein homológia-kereső program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) segítségével végeztük.

3.2.4 A GOX aktivitásának mérése

A glükóz oxidáz aktivitását módosított glükóz „rate assay”-vel határoztuk meg (Leary és munkatársai, 1992). A reakcióelegy (1 ml végtérfogat) 900 µl reagenst (11 mM fenol, 0,76 mM 4-aminoantipirin, 1 kU/l torma peroxidáz 0,1 M Na-K foszfát pufferben, pH 6,6), 50 µl 50 mM glükóz oldatot és 50 µl mintát tartalmazott, a reakcióidő 1 perc volt. A reakciót ekkor a közleményben eredetileg szereplő *Aspergillus niger* segédenzim helyett a mintában levő *P. chrysogenum* GOX katalizálta. A *P. chrysogenum* GOX aktivitásokat az *Aspergillus niger* GOX kalibrációja alapján becsültem meg (0,39-5,0 U/l *Aspergillus niger* GOX, Sigma G7141; 1 U definíció szerint 1,0 mmol D-glükózt alakít át D-glükonáttá és H₂O₂-dá 1 perc alatt, 25 °C-on). Az aktivitásokat mintánként 3-4 párhuzamos mérés átlagából számolva a minták fehérjetartalmára vonatkoztattam. A specifikus aktivitásokat katg⁻¹ protein dimenzióban adtam meg.

3.2.5 A GOX enzimkinetikai paramétereinek meghatározása

A K_m és V_{max} értékeket 5-7 különböző szubsztrát koncentrációnál (0,5-5 K_m) mért enzimaktivitásokból, a klasszikus Michaelis-Menten sebességi egyenlet alapján (GraFit 2.1 program, Erithacus Software LTD., Horley, UK) határoztuk meg. A szubsztrát specifikációs vizsgálatokban D-glükózt, D-xilózt, D-fruktózt, D-galaktózt és D-arabinózt teszteltünk. Az enzimaktivitások számításához a Lambert-Beer törvényt alkalmaztuk és az értékeket katg⁻¹ dimenzióban adtuk meg.

3.3 Az antimikrobiális fehérjék hatásspektrumának vizsgálata

3.3.1 Az antimikrobiális hatás meghatározásához használt törzsek és tápközegek

GOX esetében:

Serratia marcescens ATCC 14756

Escherichia coli TG2

Staphylococcus aureus NCTC 6571

Bacillus subtilis ATCC 6633

Candida albicans ATCC 1023

Candida parapsilosis ATCC 22019

Candida dubliniensis NCPF 3949

Candida glabrata DSM 6425

Candida krusei DSM 6128

Saccharomyces cerevisiae AH 109

Penicillium chrysogenum Q176

Penicillium chrysogenum NCAIM 00237

Aspergillus niger CBS 12049

Aspergillus giganteus AG090701

Aspergillus terreus 304 (Dr. Florentine Marx és munkacsoportja)

Aspergillus nidulans FGSC26

YPD tápoldat:

2 % (w/v) pepton

1 % (w/v) élesztő kivonat

2 % (w/v) glükóz

pH=5,8

3.3.2 Az antimikrobiális hatás meghatározása

Az antimikrobiális hatást Lee és munkatársai (1999) módszerét követve mikrotiter lemezen határoztuk meg. A tesztelt mikroorganizmusokat YPD tápközegben 12-14 óráig felnevesztve vagy a spórákat 10^3 - 10^4 /ml koncentrációban alkalmaztuk 100 μ l térfogatban, amelyekhez a vizsgált fehérjemintákat 10-20 μ l-es térfogatban adtuk. A tisztításoknál a frakciókat 0,1-50 μ g/ml (PAF és GOX esetén is) koncentrációban vizsgáltuk antimikrobiális hatásra. A hatásspektrum vizsgálatoknál 0,1-40 μ g/ml GOX-ot teszteltünk. A hatásmechanizmus meghatározására PAF esetében 0,1-50 μ g/ml koncentrációkat alkalmaztunk, a GOX-zal kapcsolatos vizsgálatokban 5-150 mM H_2O_2 -ot, 0,004-1 U GOX-ot és 4-200 U katalázt (szarvasmarha májból; 1 U kataláz egyenlő azzal az enzimaktivitással, amelyben az enzim 1 μ mol H_2O_2 -ot bont el egy perc alatt pH 7,0-n és 25 °C-on, mialatt a H_2O_2 koncentrációja 10,3-ról 9,2 mM-ra csökken. Sigma C-40), illetve 1 mg/ml koncentrációban C-vitamint használtunk.

Az antimikrobiális hatás meghatározásakor a redukáló erőt mértük 10 μ l MTT [3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromid] (5 mg/ml törzsoldatból) hozzáadását követően. 5 órás inkubáció után (37 °C-on) a reakciót 30 μ l 20 % (w/v) SDS/20 mM HCl oldattal állítottuk le. Majd 16 órás inkubáció elteltével (37 °C-on) a képződött formazán mennyiségét 570 nm-en mikrotiter plate reader segítségével mértük meg (BIO-TEK EL 340 Microplate Biokinetics reader, BIO-TEK, Winooski, VT, USA).

3.4 Az antimikrobiális fehérjék hatásmechanizmusának vizsgálata

3.4.1 A PAF hatásmechanizmusának vizsgálata

3.4.1.1 A vizsgálatokban használt törzsek és tápközégek

Aspergillus nidulans FGSC26 (*biA*, *veA1*)

Aspergillus nidulans FGSC116 (*yA2*)

Aspergillus nidulans FGSC1035 (*yA2*, *fadA*^{G203R})

Aspergillus nidulans FGSC33 (*biA1*, *pyroA4*, *veA1*)

Aspergillus nidulans RJH046 (*argB2*, *biA1*, *pyroA4*, *veA1*, Δ *flbA::argB*)

YPD tápoldat:

- 2 % (w/v) pepton
- 1 % (w/v) élesztő kivonat
- 2 % (w/v) glükóz
- pH=5,8

A depolarizációs kísérletekben a 14-16 órás micéliumokat YPD-ről minimál, ionmentes tápközegre mostuk át:

- 2 % (w/v) glükóz
- 0,25 % (w/v) D-glutamin

3.4.1.2 A PAF membránpotenciált befolyásoló hatásának kimutatása

A PAF hiperpolarizációs hatását a szenzitív törzsekre di-8-ANEPPS feszültségérzékeny festékkel mutattuk ki. A spórákat 10^3 - 10^4 /ml YPD táptalajra oltottuk fedőlemezt tartalmazó mikrotiter plate-re. A 14 órás micéliumokat 2 % (w/v) glükózt és 0,25 % (w/v) D-glutamint tartalmazó ionmentes táptalajra (GG-oldat) mostuk át, 20 percig inkubáltuk 2 μ M festékkel és 0,1 % Pluronic F-127 detergenssel, majd a mintát GG-oldattal mostuk, PAF-vel (10 μ g/ml) kezeltük és konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal (Zeiss, LSM 510; Zeiss, Jena, Germany) vizualizáltuk. A gyártó által ajánlott filtereket használtuk (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). A mintákat 488 nm-en világítottuk meg és az emissziót két filter alkalmazásával mértük meg, 560 és 620 nm-en. A mikroszkópi képeket Zeiss LSM 5.0 programmal dokumentáltuk és elemeztük. A feszültségfüggő fluoreszcens emissziós hányadost ($R=F_{620}/F_{560}$) számoltuk ki mind a hifacsúcsban, mind a csúcstól távol eső szakaszban az első hifaszegmensben. A nagyobb R érték negatívabb potenciálnak felel meg. A két hányados különbségéből határoztuk meg a membránpotenciál változásokat a hifa mentén (Beach és munkatársai, 1996).

3.4.1.3 A PAF G-proteinnel kapcsolt hatásának kimutatása

Tanulmányoztuk, hogy vajon a PAF G-proteinnel kapcsolt jelátviteli útvonalon keresztül hat-e. Ezekben a kísérletekben 100 μ M GTP γ S, GDP β S és ATP γ S nukleotid

analógokat adtunk 15 perccel a PAF (25 µg/ml) hozzáadása előtt a 14 órás *A. nidulans* hifákhoz (Thevisen és munkatársai, 1996). A GTPγS egy nem hidrolizáló analógja a GTP-nek és így G-protein aktiváló szerepe van. Ezzel szemben a GDPβS inaktív formában tartja a G-proteint, tehát gátolja a G-proteinről induló szignáltranszdukciót. Az ATPγS nem befolyásolja a G-proteinek működését, kontrollként használtuk. Az antimikrobiális hatást szintén Lee és munkatársai (1999) módszerét alkalmazva, MTT-vel határoztuk meg (3.3.2 fejezet).

A G-proteinnel kapcsolt hatás további igazolására a szignáltranszdukciós útvonalban sérült *Aspergillus nidulans* mutánsokat (*A. nidulans fadA^{G203R}* és *ΔflbA*) is használtunk (3.4.1.1 fejezet, **1. ábra**), az antifungális hatás meghatározása szintén a 3.3.2 fejezet alapján történt.

3.4.1.4 A reaktív oxigénformák (ROS) lokalizálásának detektálása

Ezt a kísérletet Dr. Florentine Marx és munkacsoportja végezte el. A mintákat 50 µg/ml PAF-vel kezelték. A ROS detektálására 2',7'-diklorodihidrofluorescein diacetátot (H₂DCFDA, Molecular Probes, Eugene, OR, USA) (Ezaki és munkatársai, 2000) használtak és az *Aspergillus nidulans* hifákat mitokondriumokra specifikus fluoreszcens festékkel, MitoTracker Green FM festékkel (Rubino és munkatársai, 2000), (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) jelölték. A mintákat konfokális lézermikroszkóppal tanulmányozták.

3.4.1.5 Apoptózis vizsgálatok

3.4.1.5.1 Protoplasztok előállítása

A protoplasztokat *Aspergillus nidulans*ból állítottuk elő Vágvölgyi és Ferenczy módszere alapján (1991). Az *Aspergillus nidulans* FGSC26 törzset minimál-nitrát tápközegben (pH 6,5; Barratt és munkatársai, 1965) (0,5 % élesztő kivonattal) növesztettük fel (5×10^7 spórával oltva) (16 óra, 200 rpm). A tenyészetet zsugorított üvegszűrőn szűrtük, csigaenzimmel (0,5 g/15 ml 0,6 M MgSO₄), β-merkaptóetanollal (4,5 µl/15 ml 0,6 M MgSO₄ oldatban oldva) és 250 µl 12 mg/ml koncentrációjú BSA oldattal (1,2 M MgSO₄

10 mM Na-foszfát pufferben, pH 5,8) inkubáltuk 2 órán át, 37 °C-on, 80 rpm fordulatszámon. A tenyészetet steril gézen szűrtük, centrifugáltuk (5000 rpm, 12 perc, 4 °C, fékezés nélkül) és a csapadékot 1 M szorbitolt tartalmazó 10 mM TRIS/HCl (pH 7,5) pufferben vettük vissza. Ezután centrifugáltuk (800 rpm, 4 °C, 10 perc), majd a kapott felülúszót újra centrifugálva (8000 rpm, 4 °C, 10 perc), a csapadékot 1 M szorbitolt tartalmazó 10 mM TRIS/HCl (pH 7,5) pufferben visszavettük és ezt a sejtszuszpenziót használtuk az apoptózis vizsgálatokhoz.

3.4.1.5.2 Annexin V festés

A festést megelőzően a protoplaszt szuszpenziót (3-5 millió protopaszt) 50 µg/ml PAF-vel kezeltük 3 órán át, szobahőmérsékleten.

A foszfatidil-szerin (PS) transzlokációját a belső membránfelületről a külsőre (fontos apoptotikus marker) Vybrant Apoptosis Assay Kit #2 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) segítségével határoztuk meg a gyártó által megadott protokoll alapján. A kitben található annexin V nagy affinitással köti a PS-t, amely egy fluoreszcens festékkal van megjelölve (Alexa Fluor 488 annexin V, zöld fluoreszcencia). A kit tartalmaz egy másik festéket, a propidium jodidot (piros fluoreszcencia), amely a DNS-hez kötődik, de csak a membrán integritását vesztett, nekrotikus sejtekbe képes bejutni, az élő és apoptotikus sejtekbe nem. Így apoptotikusnak csak a zöld fluoreszcenciát mutató protoplasztok tekinthetők (Alexa Fluor 488 annexin V), amelyek természetesen nem mutatnak piros fluoreszcenciát (propidium jodid). Az élő sejtek nem fluoreszkálnak, míg a nekrotikus sejtek zöld és piros (narancs) színnel detektálhatók. Kb. 5000-5000 protoplasztot vizsgáltunk meg, mind a kontroll, mind a PAF-kezelt protoplaszt szuszpenziókban. A festett mintákat fluoreszcens mikroszkóppal tanulmányoztuk (Olympus mikroszkóp, BH2 SPlan 20 NH fáziskontraszt objektívvel, Olympus America Inc., Melville, NY, USA).

3.4.1.5.3 DAPI festés

A sejtmagvak detektálására 2 ml protoplaszt szuszpenzió 20 µl-éhez 20 µl DAPI oldatot (1 µg/ml-es vizes törzsoldatból) (Williamson and Fennell, 1979) adtunk egy tárgylemezen és sötétben inkubáltuk 3 percig, majd a mintát fluoreszcens mikroszkóppal

vizsgáltuk (Olympus mikroszkóp, BH2 SPlan 20 NH fáziskontraszt objektívvel, Olympus America Inc., Melville, NY, USA).

3.4.1.5.4 TUNEL festés

A DNS fragmentáció kimutatására TUNEL (Terminal Deoxynucleotide Transferase dUTP Nick End Labeling) assayt (APO-BrdUTM TUNEL Assay Kit, Molecular Probes, Eugene, OR, USA) alkalmaztunk a gyártó által megadott protokoll alapján. A módszer elve az, hogy a DNS szétesése során a képződő 3'-hidroxil végeket 5-bromo-2'-deoxiuridin 5'-trifoszfáttal (BrdUTP) jelöljük a terminális deoxinukleotidil transzferáz enzim (TdT) segítségével. A BrdU-val jelölt DNS-t Alexa Fluor[®] 488 festékkel jelölt anti-BrdU antitesttel mutatjuk ki. A protoplasztokat 1 órán át inkubáltuk 50 µg/ml PAF-vel, festettük és fluoreszcens mikroszkóppal figyeltük meg (Olympus mikroszkóp, BH2 SPlan 20 NH fáziskontraszt objektívvel, Olympus America Inc., Melville, NY, USA). Kb. 5000-5000 protoplasztot tanulmányoztunk, mind a kontroll, mind a PAF-kezelt protoplaszt szuszpenziókban (Laun és munkatársai, 2001).

3.4.1.5.5 Elektron mikroszkópiás vizsgálatok

A kísérleteket Dr. Florentine Marx és munkacsoportja végezte. A 24 órás *Aspergillus nidulans* tenyészeteket 3 órán át inkubálták 10-50 µg/ml PAF-vel. A hifákat glutáraldehiddel, majd ozmium-tetroxiddal és kálium-ferrocianáttal fixálták. 50-90 és 300 nm vastagságú metszeteket készítettek, uranil-acetáttal és ólom-citráttal festették és a mintákat transzmissziós elektron mikroszkóppal detektálták.

3.4.1.6 A PAF hatása humán sejtekre

3.4.1.6.1 A PAF hatása immunsejtekre

A vér fehérvérsejtjeinek aktiválása:

Ezt a munkát Prof. Dr. Rajnavölgyi Éva és munkatársai (DE, OEC, Immunológiai Intézet) végezték el. Kísérleteikben egészséges donorokból származó perifériás vért (Vértranszfúziós Központ) használtak. A véralvadás megakadályozására dextróz-citrát puffert alkalmaztak. 3 ml vért inkubáltak 300 μ l PAF-vel 2-0,002 μ g/ml végkoncentrációban 1 órán át szobahőmérsékleten rázatva, majd a mintákat 24 órán át 37 °C-on CO₂ inkubátorban tartották. Hasonló eljárást alkalmaztak a negatív (a vért 300 μ l fiziológiás sóoldattal kezelték) és a pozitív kontroll [a vért 300 μ l LPS oldattal (*E. coli* 0128, Difco Laboratories #3131-25) inkubálták, hogy a végkoncentráció 0,1 μ g/ml legyen] esetében is. A plazmát centrifugálással gyűjtötték össze (1500 rpm, 23 perc) és -70 °C-on tárolták a citokinek meghatározásáig.

A citokinek mennyiségének meghatározása:

A szolubilis IL-6, IL-8 és TNF- α citokinek koncentrációjának mérésére ultraszenzitív kettős szendvics ELISA-t alkalmaztunk a gyártó által megadott paraméterek szerint (Biosource International Inc., Camarillo, CA, USA). A citokinek mennyiségét kalibrációs görbe segítségével határoztuk meg. A kapott eredményeket a sóoldattal kezelt vérből származó adatokhoz viszonyítottuk (negatív kontroll), míg az LPS-sel indukált vérből származó adatokat pozitív kontrollként kezeltük.

3.4.1.6.2 A PAF hatása egyéb emlős sejtekre

Endotélsejtek:

A PAF citotoxicitását (2-100 µg/ml) umbilikális vénából származó endotél sejtenyészeten (Dr. Balla József és munkatársai, DE, OEC, Nefrológiai Tanszék) a redukáló erő mérésén alapuló MTT módszerrel vizsgálták (Mossman és munkatársai, 1983).

Idegsejtek (Dr. Rusznák Zoltán és Dr. Pál Balázs, DE, OEC, Élettani Intézet):

A PAF hatását tanulmányozták

(1) agyszleteken, melyekben hiperpolarizációval és depolarizációval aktivált áramokat mértek (Rusznák és munkatársai, 1997),

(2) hippocampusból származó szeparált neuronon, amelyen depolarizációval aktivált K⁺ áramokat mértek (Rusznák és munkatársai, 2001),

(3) és asztrocitákon.

Vázizomsejtek és –rostok (Prof. Dr. Csernoch László és Dr. Szappanos Henrietta, DE, OEC, Élettani Intézet):

A PAF hatását vizsgálták

(1) K⁺ áramokon izomrostokban (Csernoch és munkatársai, 1999; Szentesi és munkatársai, 2001)

(2) és L-típusú Ca²⁺ áramokat mértek izomsejteken.

3.4.2 A GOX hatásmechanizmusának vizsgálata

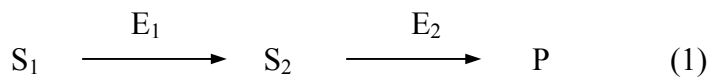
3.4.2.1 A GOX detektálása immunfestéssel *Aspergillus nidulans*ban

Aspergillus nidulans spórákat 10²/200 µl-es koncentrációban minimál-nitrát táptalajra (pH 6,5; Barratt és munkatársai, 1965) (0,5 % élesztő kivonattal) oltottunk zárható üvegkamrában és 37 °C-on inkubáltuk 14-16 órán át, majd glükóz oxidázzal (1-10 U, *Aspergillus niger*ből) kezeltük 2 órán át 37 °C-on. A sejteket ezután 100 %-os jéghideg acetonnal fixáltuk 30 percig -20 °C-on. A mintákat egy óráig szobahőmérsékleten blokkoltuk 1 mg/ml zselatinnal PBS-ben oldva (pH 7,4) és monoklonális anti-GOX antitesttel (1:4000-es hígításban 1 mg/ml zselatinos PBS-ben oldva; Sigma G5399)

kezeltük 2 órán át, 37 °C-on. A nem kötődött antitesteket 0,1 % TWEEN20-as PBS-sel mostuk 5-ször, majd a hifákat a szekunder anti-egér IgG-FITC fluoreszcensen jelölt antitesttel (1:800 hígításban 1 mg/ml zselatinos PBS-ben oldva; Sigma F8264) inkubáltuk (1 óra, 37 °C), sötétben tartva a mintát. Ezután a sejteket 5-ször mostuk 0,1 % TWEEN20-as PBS-sel; fedőoldattal (0,4 g glicin, 0,02 g NaOH, 0,5 g NaCl 30 ml desztillált vízben és 70 ml glicerinben oldva), fedőlemezzel zártuk és fluoreszcens mikroszkóppal tanulmányoztuk (Olympus mikroszkóp, Olympus America Inc., Melville, NY, USA). A kontroll minta nem tartalmazott primer antitestet.

3.4.2.2 A steady-state H₂O₂ koncentráció meghatározása a GOX/kataláz rendszerben

A steady-state H₂O₂ koncentráció meghatározása a konszekutív enzimek reakcióira (1) vonatkozó számítások alapján történt, ahol az $[S_1] \gg K_{m,1}$ és $[S_2] \ll K_{m,2}$ (Keleti, 1985).



Figyelembe véve, hogy mind a két reakció eleget tesz a Michaelis-Menten kinetikának, az S₂ koncentrációja csak a katalitikus állandóktól függ (2).

$$d[S_2]/dt = k_{cat,1} * E_{t,1} - \frac{k_{cat,2} * E_{t,2}}{K_{m,2}} * [S_2] \quad (2)$$

$E_{t,1}, E_{t,2}$ = teljes enzimkoncentrációk

$k_{cat,1}, k_{cat,2}$ = katalitikus állandók

$K_{m,2}$ = az E₂ által katalizált reakció Michaelis konstansa

Steady-state körülmények között a $d[S_2]/dt = 0$ és így $[S_2] = [S_2]_{ss}$, azaz a steady-state koncentrációja S₂-nek (3).

$$[S_2]_{ss} = \frac{k_{cat,1} * E_{t,1}}{k_{cat,2} * E_{t,2}} * K_{m,2} \quad (3)$$

3.5 A fehérjetartalom és száraztömeg meghatározása

A minták fehérjetartalmának meghatározására Bradford (1976) módszerét alkalmaztuk, a kalibrációs sor készítéséhez szarvasmarha szérum albumint használtunk. A szárazanyag tartalom meghatározásához a zsugorított üvegszűrőn átszűrt és desztillált vízzel mosott tenyészeteket szobahőmérsékleten súlyállandóságig szárítottuk. A száraztömeget a fermentlé egy ml-ére vonatkoztattuk.

3.6 Statisztikai módszerek

A statisztikai elemzésekhez 3-5 független mérés átlagát és azok szórását (S.D.) határoztuk meg. A szignifikancia vizsgálatokhoz a Student-féle t-tesztet alkalmaztuk.

3.7 Felhasznált vegyszerek

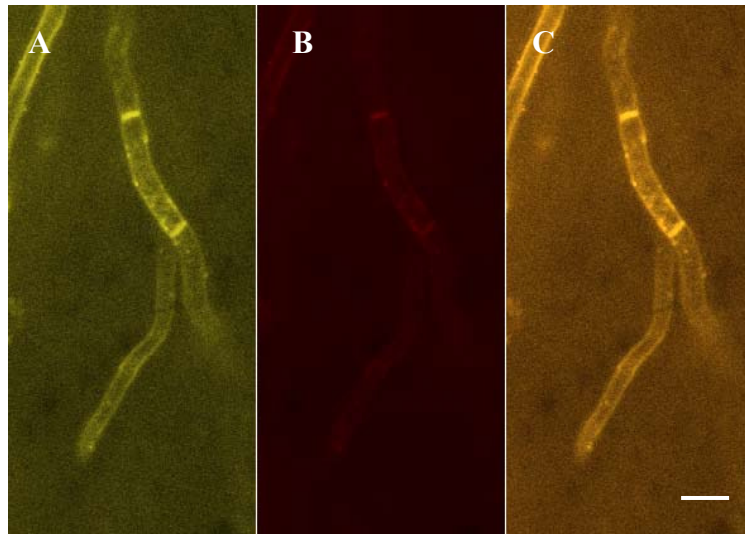
A kísérleteinkben felhasznált finomvegyszerek, ha másként nem jelöltem, a Sigma-Aldrich Kft. (Budapest) termékei voltak. Minden egyéb vegyszer analitikai minőségű volt és a Spektrum 3D Kft.-től (Debrecen) került beszerzésre.

4. Eredmények

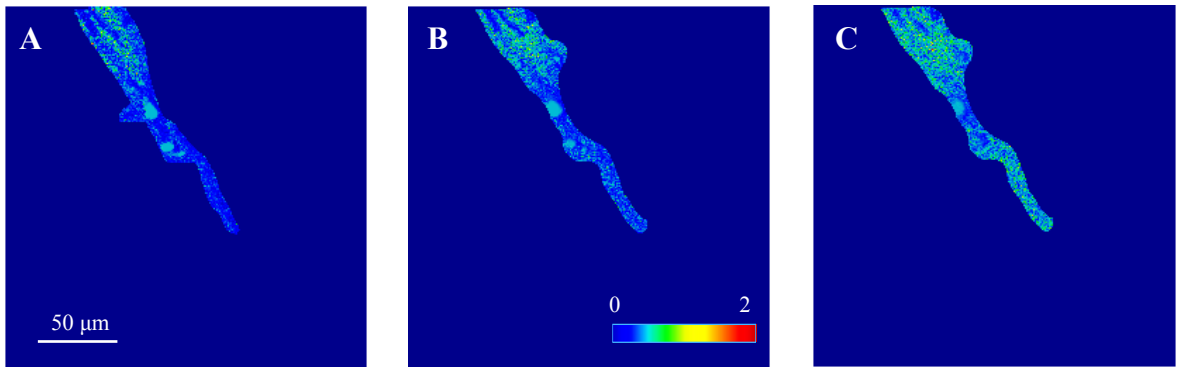
4.1 A PAF hatásmechanizmusa

4.1.1 A PAF hiperpolarizációt indukál az *Aspergillus nidulans* sejtmembránján

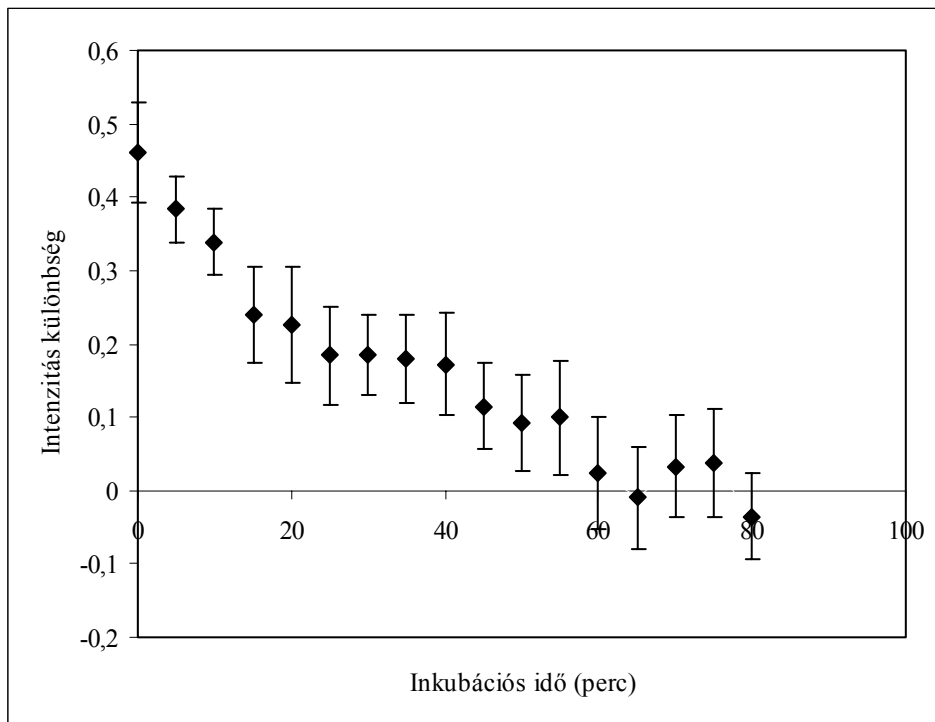
Korábbi kísérleti eredményekre alapozva, mely szerint a PAF K^+ -effluxot okoz (Kaiserer és munkatársai, 2003), membránpotenciál változást mértünk a PAF-vel kezelt *Aspergillus nidulans* FGSC26 tesztörzsön di-8-ANEPPS feszültségérzékeny festéket használva. 10 $\mu\text{g/ml}$ PAF hozzáadása után hiperpolarizációt tapasztaltunk az első hifaszegmensben (**4. ábra A-C**). A hiperpolarizáció maximumát a kezelés után a 80. percben érte el, ez idő alatt az emittált fluoreszcens jel aránya fokozatosan kiegyenlítettődött a hifacsúcs és a csúcstól távol eső hifaszakaszban az első hifaszegmenst vizsgálva, ugyanakkor a kontroll tenyészetekben semmilyen változást nem tapasztaltunk (**3. ábra A-C** és **5. ábra**).



3. ábra A-C di-8-ANEPPS festékekkel vizualizált *Aspergillus nidulans* hifák PAF hozzáadása nélkül pásztázó lézer mikroszkóppal detektálva (**A**: 560 nm, **B**: 620 nm, **C**: 560 és 620 nm; 2,7-szeres nagyítás; skála: 5 μm).



4. ábra A-C di-8-ANEPPS festékekkel kezelt *Aspergillus nidulans* hifák 10 µg/ml PAF hozzáadása után, az $R=F_{620}/F_{560}$ intenzitás arányok bemutatásával, pásztázó lézer mikroszkóppal detektálva (A: 1. perc, B: 40. perc, C: 80. perc; 2,7-szeres nagyítás; skála: 50 µm).

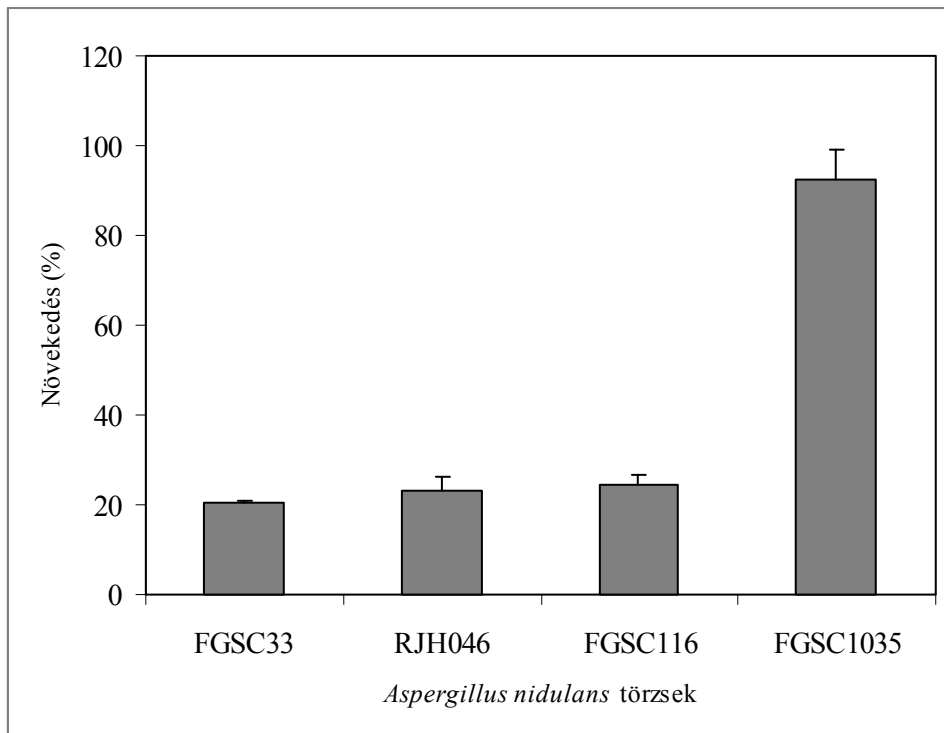


5. ábra A di-8-ANEPPS festék intenzitás arányok ($R=F_{620}/F_{560}$) különbségének változása az első hifaszegmensben a hifacsúcs és a szeptum meletti szakasz között 10 µg/ml PAF kezelés hatására. Az első mérési pontot PAF kezelés nélkül vettük fel (kontroll).

4.1.2 A PAF G-proteinnel kapcsolt jelátviteli útvonalon keresztül fejt ki hatását

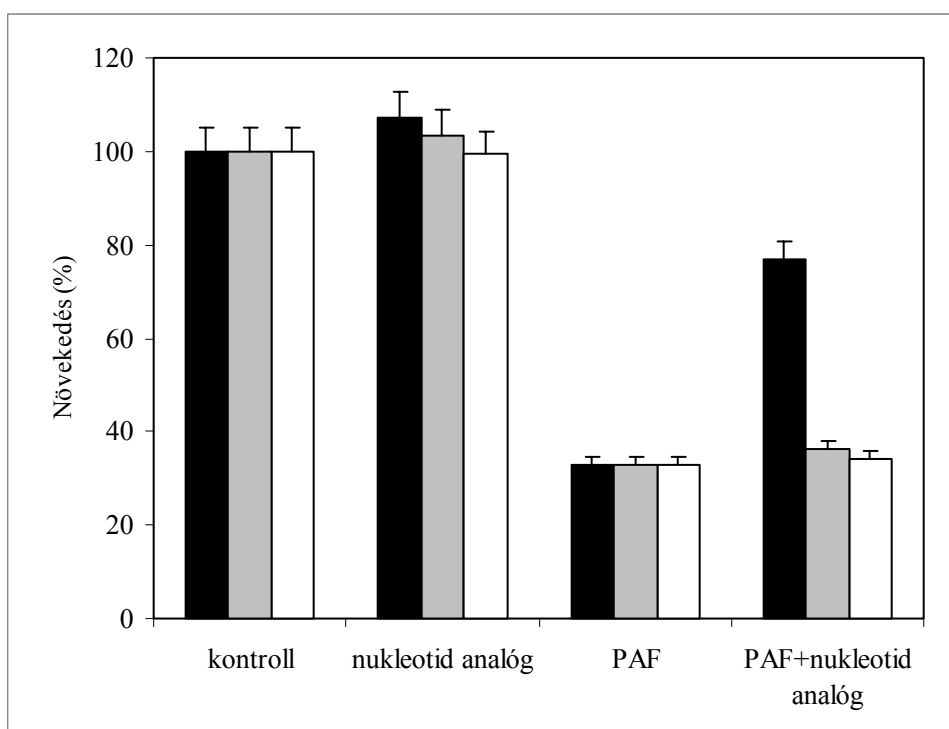
Az *Aspergillus nidulans*ban a növekedést és sterigmatocisztin szintézist egy G-proteinnel kapcsolt jelátviteli útvonal szabályozza, amelynek két fontos eleme az FlbA és FadA fehérjék (Adams és munkatársai, 1998; Rosén és munkatársai, 1999; **1. ábra**; 1.1 fejezet). Kísérleteinkben ebben a jelátviteli útvonalban sérült *fadA*^{G203R} és $\Delta flbA$ mutánsok növekedését vizsgáltuk PAF kezelés hatására.

A *fadA*^{G203R} mutáns rezisztensnek bizonyult PAF jelenlétében, míg az *Aspergillus nidulans* $\Delta flbA$ mutáns hasonló szenzitivitást mutatott PAF-re, mint a kontroll törzsek (**6. ábra**).



6. ábra A PAF hatása (25 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációban) a G-proteinben sérült mutánsok növekedésére. RJH046: $\Delta flbA$ mutáns, FGSC33: kontroll, szülői törzs. FGSC1035: *fadA*^{G203R} mutáns, FGSC116: kontroll, szülői törzs. Az antifungális hatás meghatározására az MTT/formazán tesztet használtuk mikrotiter plate-n (Lee és munkatársai, 1999; 3.3.2 fejezet).

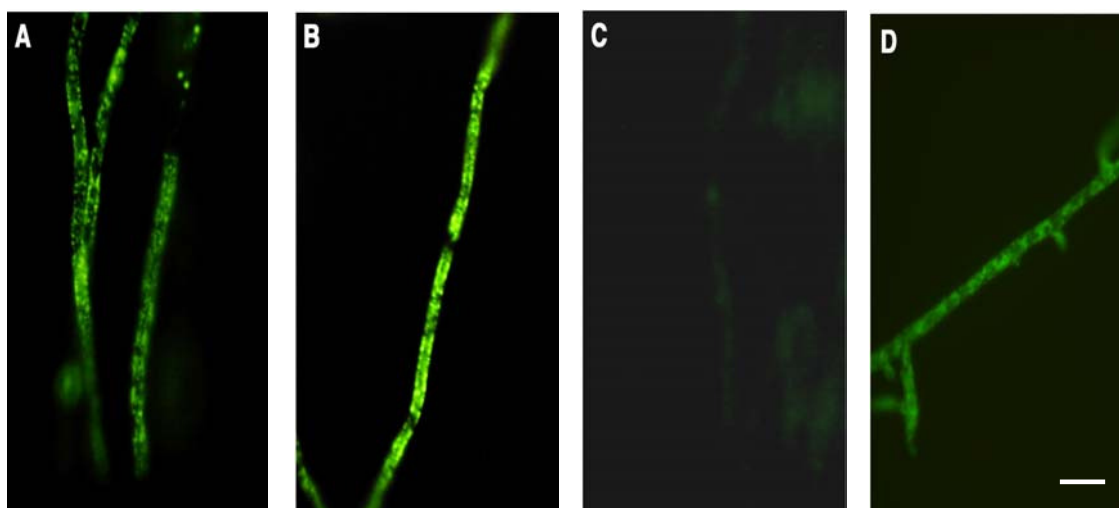
Az *Aspergillus nidulans* FGSC26 100 μM $\text{GTP}\gamma\text{S}$ guanidin nukleotid analóg (a G-proteint aktív formában tartja) jelenlétében nem érzékeny a PAF-ra, míg a $\text{GDP}\beta\text{S}$ analóg (a G-proteint GDP-kötött, inaktív formában tartja) jelenléte nem befolyásolta a PAF hatását. Ez utóbbit figyeltük meg $\text{ATP}\gamma\text{S}$ esetében is, mivel ez a vegyület nem befolyásolja a G-proteinek működését (7. ábra).



7. ábra Az *Aspergillus nidulans* FGSC26 tenyészetek növekedése, melyeket 25 $\mu\text{g/ml}$ PAF hozzáadása előtt 15 perccel 100 μM guanidin nukleotid analóggal kezeltünk ($\text{GTP}\gamma\text{S}$ (■), $\text{GDP}\beta\text{S}$ (■) és $\text{ATP}\gamma\text{S}$ (□)). Az antifungális hatás meghatározására az MTT/formazán tesztet használtuk mikrotiter plate-n (Lee és munkatársai, 1999; 3.3.2 fejezet).

4.1.3 A PAF hatására ROS akkumulálódik az *Aspergillus nidulans* mitokondriumaiban

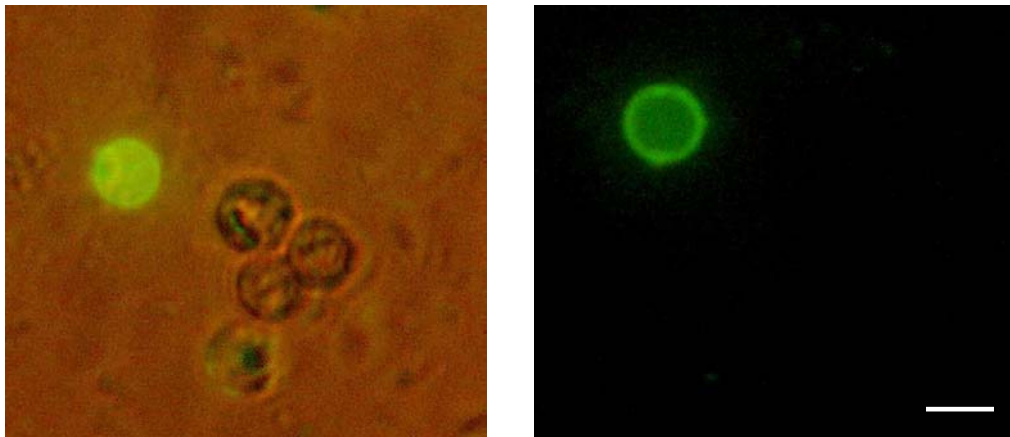
Korábbi kísérletekben megfigyelték, hogy a PAF reaktív oxigénformák (ROS) megjelenését indukálja az *Aspergillus niger* hifákban (Kaiserer és munkatársai, 2003). Ugyanakkor sikerült igazolni, hogy a ROS akkumulálódása PAF kezelés hatására a mitokondriumokban történik (Dr. Florentine Marx és munkacsoportja). A ROS kimutatására az *Aspergillus nidulans* hifákat 2',7'-diklorodihidrofluorescein diacetáttal festették (**8. ábra A**), míg a mitokondriumokat MitoTracker Green festéssel vizualizálták (**8. ábra D**). A mitokondriumra specifikus jel eloszlása jól összevethető a ROS eloszlásával, azaz a mitokondrium fontos szerepet játszik a ROS generálásában. A kontroll kísérletekben ROS akkumulálódását nem mutatták ki (**8. ábra C**). Pozitív kontrollként 5 μ g nisztatint használtak (mg nedves tömegre vonatkoztatva, **8. ábra B**).



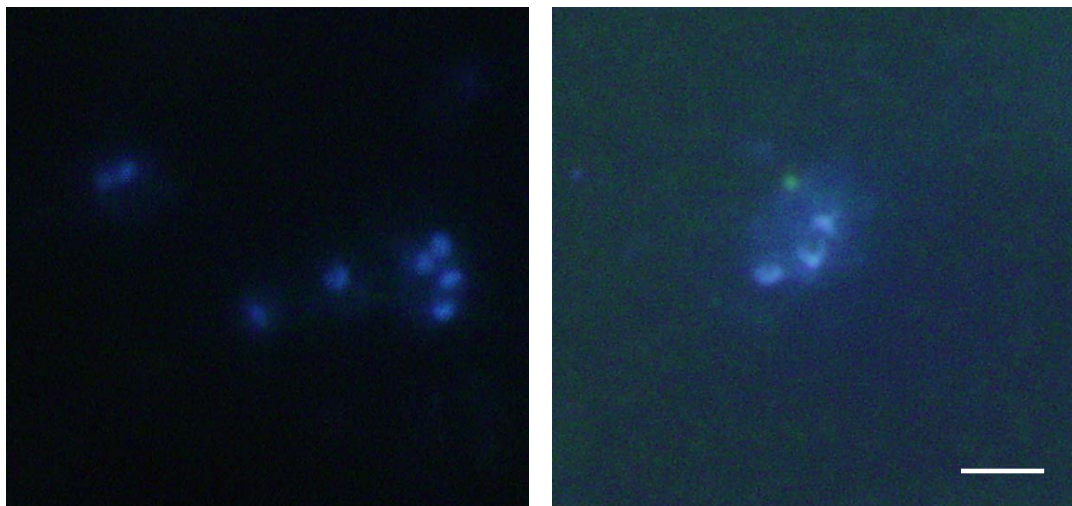
8. ábra Az intracelluláris reaktív oxigénformák (ROS) kimutatása *Aspergillus nidulans*ban 2',7'-diklorodihidrofluorescein diacetát festéssel (**A**, **B**, **C**, kontroll: **C**) és a mitokondriumok festése MitoTracker Green-nel PAF nélkül (**D**). A hifákat 50 μ g/ml PAF-vel inkubálták szobahőmérsékleten 90 percig (**A**). Pozitív kontrollként 5 μ g nisztatint (mg nedves tömegre vonatkoztatva) alkalmaztak (**B**). Skála: 10 μ m (Dr. Florentine Marx és munkacsoportja)

4.1.4 A PAF apoptózist okoz a szenzitív gombákban

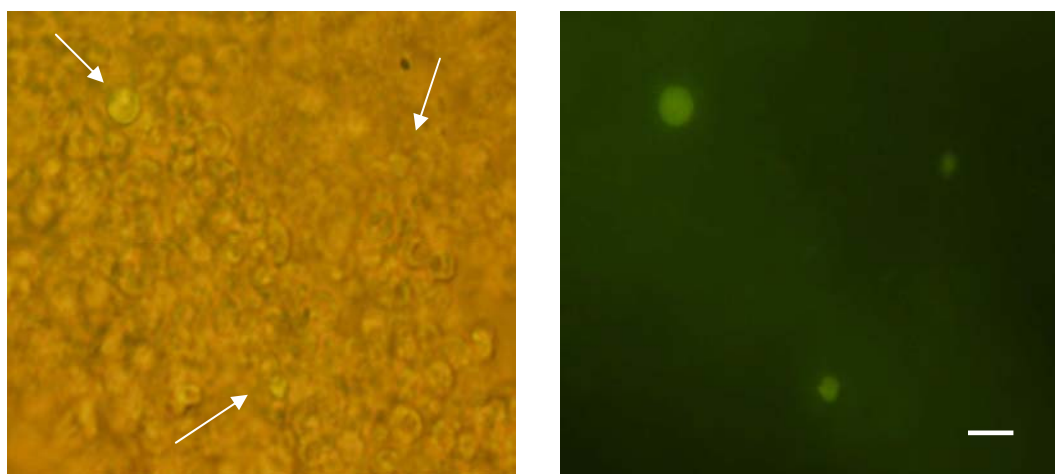
Az apoptózis vizsgálatokban protoplasztokat állítottunk elő Vágvölgyi és Ferenczy módszerét alkalmazva (1991), majd PAF-vel kezeltük a protoplaszt szuszpenziót. A sejtmembrán kifordulását (erős zöld fluoreszcencia, Alexa Fluor 488 annexin V festékkel) és a sejt integritását megőrző protoplasztok (nem mutatnak piros fluoreszcenciát, propidium jodid festékkel detektálva) tekinthetőek apoptotikusnak. A PAF-vel kezelt protoplasztok 2,5 %-a apoptotikusnak mutatkozott (kontrollban ez 0,6 %-os volt) 1 órás 50 $\mu\text{g/ml}$ PAF-vel történő inkubáció után szobahőmérsékleten. Míg 3 órás inkubáció után PAF kezelés hatására 28 %-os volt az apoptózist szenvedett protoplasztok aránya (Kontrollban ez 7 %-osnak bizonyult.) (**9. ábra**). DAPI festéssel detektálva ugyanakkor a sejtmagvak morfológiája szabálytalanná vált PAF kezelés hatására, ami szintén fontos apoptotikus marker (**10. ábra**). A DNS fragmentációt, amely PAF jelenlétében már 1 óra után jelentkezik, TUNEL festéssel mutattuk ki (**11. ábra**).



9. ábra Az apoptotikus protoplasztokat Alexa Fluor 488 annexin V festékkel detektáltuk 3 órás 50 $\mu\text{g/ml}$ PAF kezelés után. Az első fotó fáziskontraszt és fluoreszcens mikroszkópiával, míg a második fáziskontraszt objektív használata nélkül készült (skála: 5 μm).

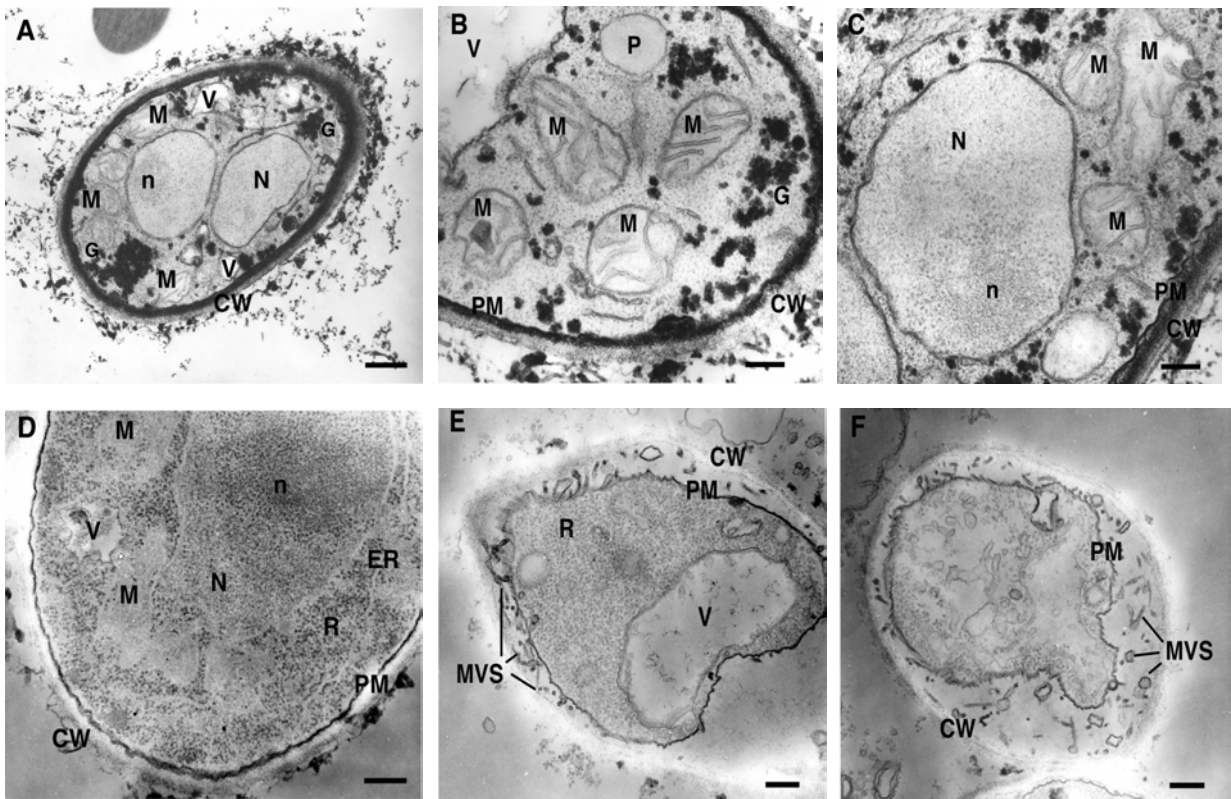


10. ábra PAF kezelés hatására a sejtmagvak elnyúlt, apoptotikus formát mutatnak. Az első mikrofotó kontroll, míg a második PAF (50 $\mu\text{g/ml}$) kezelés után készült (DAPI-val festve; skála: 5 μm).



11. ábra PAF (50 $\mu\text{g/ml}$) jelenlétében az *Aspergillus nidulans*ban a DNS fragmentációja következik be, amelyet TUNEL festéssel detektáltunk (skála: 5 μm).

Az apoptózis kimutatására alkalmas a hifák ultrastruktúrájának vizsgálata is, amelyet Dr. Florentine Marx és munkacsoportja végzett el (**12. ábra**). Az ábrán jól látható, hogy a kontroll, kezeletlen *Aspergillus nidulans* hifák ultrastruktúrája szabályosnak bizonyult (**12. ábra A-C**). Ezzel szemben a PAF kezelés hatására drámai változások következtek be. A sejtfal granulitása, normál struktúrája megszűnt, a sejtmembrán fodrosodását figyelték meg, illetve mikrovezikulák képződtek a sejtfal és a sejtmembrán közötti térben (**12. ábra E, F**). A mitokondriumok külső membránja szétesett, a sejtmembrán eltűnt (**12. ábra D**). A sejtekben nagy vakuólumok jelentek meg (**12. ábra E**).



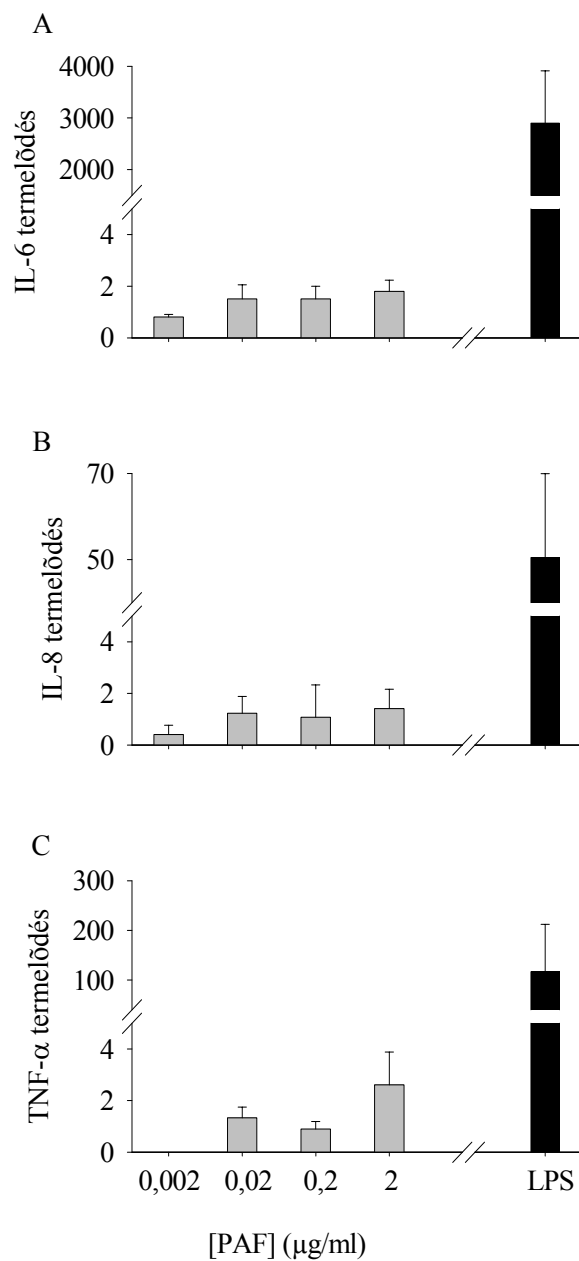
12. ábra *Aspergillus nidulans* sejtek ultrastruktúrája (transzmissziós elektron mikroszkópiával kimutatva). A mintákat 50 $\mu\text{g/ml}$ PAF-vel kezelték 3 órán át szobahőmérsékleten (**D, E, F**); kontroll: **A, B, C**. CW: sejtfal, ER: endoplazmatikus retikulum, G: glikogén, M: mitokondrium, MVS: mikrovezikuláris struktúrák, N: sejtmag, n: nukleólusz, P: peroxiszóma, PM: plazmamembrán, R: riboszóma, V: vakuólum. Skála (**A, B, C, E, F**): 0,25 μm , (**D**): 0,6 μm (Dr. Florentine Marx és munkacsoportja).

4.1.5 A PAF hatása emlős és humán sejtekre

4.1.5.1 A PAF hatása immunsejtekre

A PAF citotoxicitásának vizsgálatakor tanulmányoztuk, hogy milyen hatása van az immunrendszerre. Az immunválasz első lépésében gyulladáskeltő citokinek termelődnek, amelyek aktiválják az immunrendszer sejtjeit a kórokozó leküzdésére.

Ezeknek a citokineknek a termelődése TLR receptorok által indukált jelátviteli útvonalon valósul meg és nagyon kis mennyiségű gomba vagy baktérium sejtfallalaktó (LPS) is kiváltja. Mindamellet az emlősök és ezen belül az ember által termelt defenzinek hasonló módon indukálják az immunrendszert inflammatorikus citokinek előállítására. Kísérleteinkben ezért a PAF hatását vizsgáltuk meg IL-6, IL-8 és TNF- α citokinek termelődésére perifériás vérből származó immunsejtekre, pozitív kontrollként pedig LPS-t használtunk, amely *E. coli*ből származott. A legnagyobb koncentrációban alkalmazott PAF (2 $\mu\text{g/ml}$) sem eredményezett gyulladáskeltő hatást a különböző egészséges donorokból származó vérben (**13. ábra**).



13. ábra A PAF és az LPS (pozitív kontroll) hatása az IL-6 (**A**), IL-8 (**B**) és TNF- α (**C**) termelődésére. Az értékeket a negatív kontrollhoz viszonyítva, relatív növekedés formájában ábrázoltuk. A kísérlethez 10 (**A**), 8 (**B**) illetve 5 (**C**) donort használtunk.

4.1.5.2 A PAF hatása más emlős sejtekre

Vaszkuláris endotélsejtek:

Még 100 $\mu\text{g/ml}$ PAF sem okozott sejtkárosító hatást (Dr. Balla József és munkatársai, DE, OEC, Nefrológiai Tanszék).

Idegsejtek:

A PAF-vel történő kezelés nem eredményezett változást sem a mért áramok amplitudóján, sem az áramok időtartamán, agyszeleteket, hippocampusból származó neuront és asztocitákat vizsgálva (Dr. Rusznák Zoltán és Dr. Pál Balázs, DE, OEC, Élettani Intézet).

Izomsejtek:

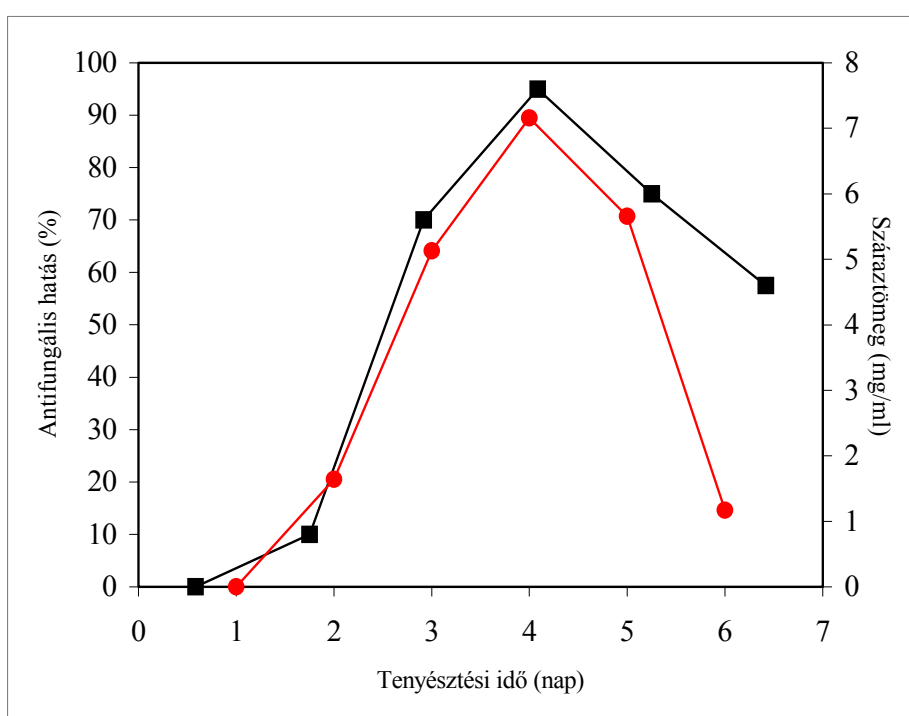
A PAF ebben az esetben sem befolyásolta a K^+ áramok és L-típusú Ca^{2+} áramok aktiválhatóságát, kinetikáját illetve amplitudóját (Dr. Csernoch László és Dr. Szappanos Henrietta, DE, OEC, Élettani Intézet).

Így megállapítható, hogy a PAF a vizsgált sejtípusokra nézve nem citotoxikus.

4.2 A glükóz oxidáz jellemzése

4.2.1 A *Penicillium chrysogenum*-ből származó nagy móltömegű antifungális fehérje tisztítása, jellemzése

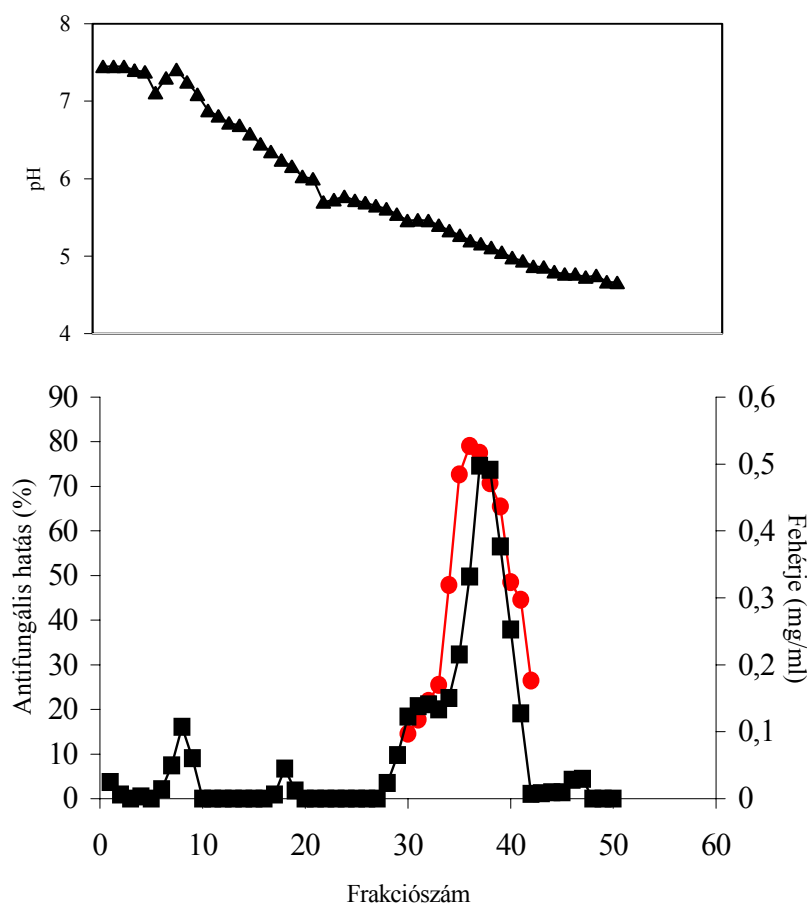
A *Penicillium chrysogenum* NCAIM 00237 fonalas gomba 2 % szacharózon és 0,3 % nitráton tenyésztve erőteljes *Candida*-ölő hatást mutatott. Ez az antifungális hatás a tenyésztés 96 órában érte el maximumát, amely a *P. chrysogenum* tenyésztés autolízisének előrehaladtával fokozatosan lecsökkent (**14. ábra**).



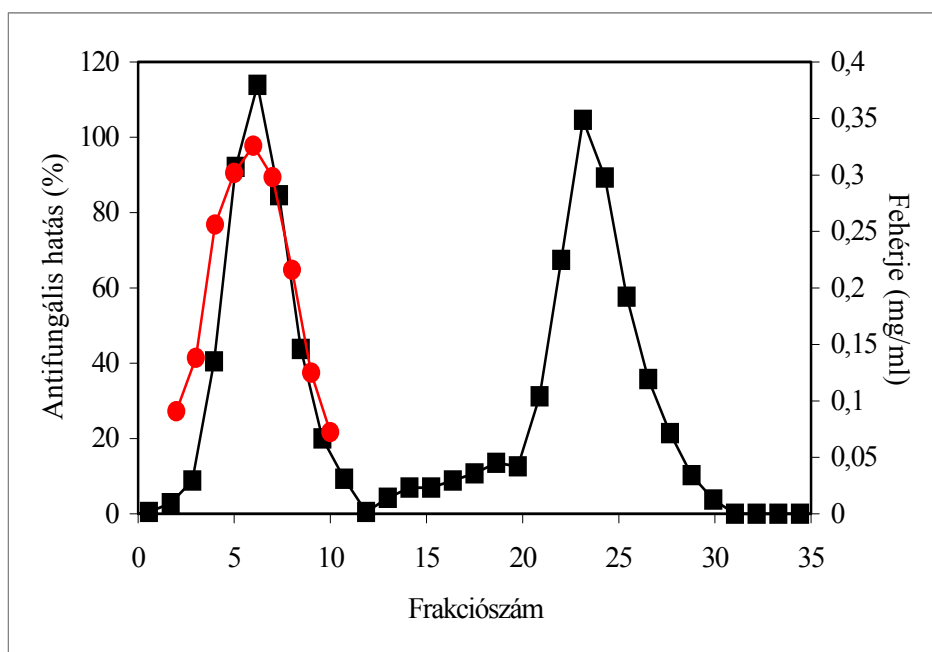
14. ábra A *Penicillium chrysogenum* növekedése (■) és a fermentlé antifungális hatása *Candida albicans* ATCC 1023 tesztörzsön (növekedés gátlása %-ban) (●). Az antifungális hatás meghatározására az MTT/formazán tesztet használtuk mikrotiter plate-n (Lee és munkatársai, 1999; 3.3.2 fejezet). Minden esetben a *Candida albicans*hoz 2,8 µg fehérjetartalmú nyers fermentlét adtunk (végtérfogat 120 µl).

A tisztítás eredményeképpen - ultraszűrés, kromatofókuszálás (**15. ábra A**) és gélszűrés (**15. ábra B**) - egy nagy tisztaságú fehérjepreparátumot kaptunk (**16. ábra A**), amely 5,4 μg mennyiségben közel 100 %-os növekedésgátlást eredményezett a *Candida albicans* ATCC 1023 törzsön.

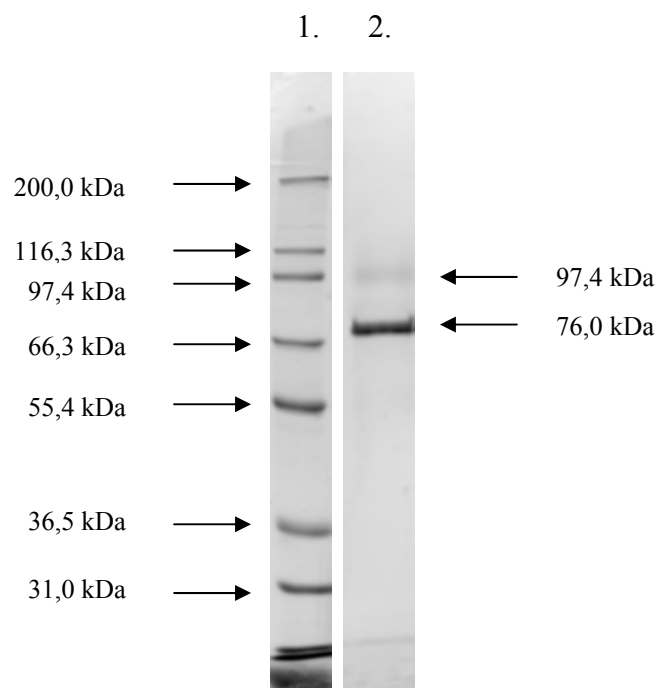
A tisztított fehérje móltömege 155000 Da volt, gélszűréssel meghatározva, míg redukáló SDS-PAGE gélen a fehérje homodimer szerkezetét állapítottuk meg, 76000 Da alegység-móltömegeg (16. ábra A). A tisztított fehérje izoelektromos pontja 5,4, amelyet kromatofókuszálással (**15. ábra A**) és kétdimenziós gélelektroforézissel (**16. ábra B**) is meghatároztunk. Az SDS-PAGE-sel készült gél perjódsavas-Schiff bázikus festése igazolta, hogy a fehérje glikoprotein (a gél nincs bemutatva).



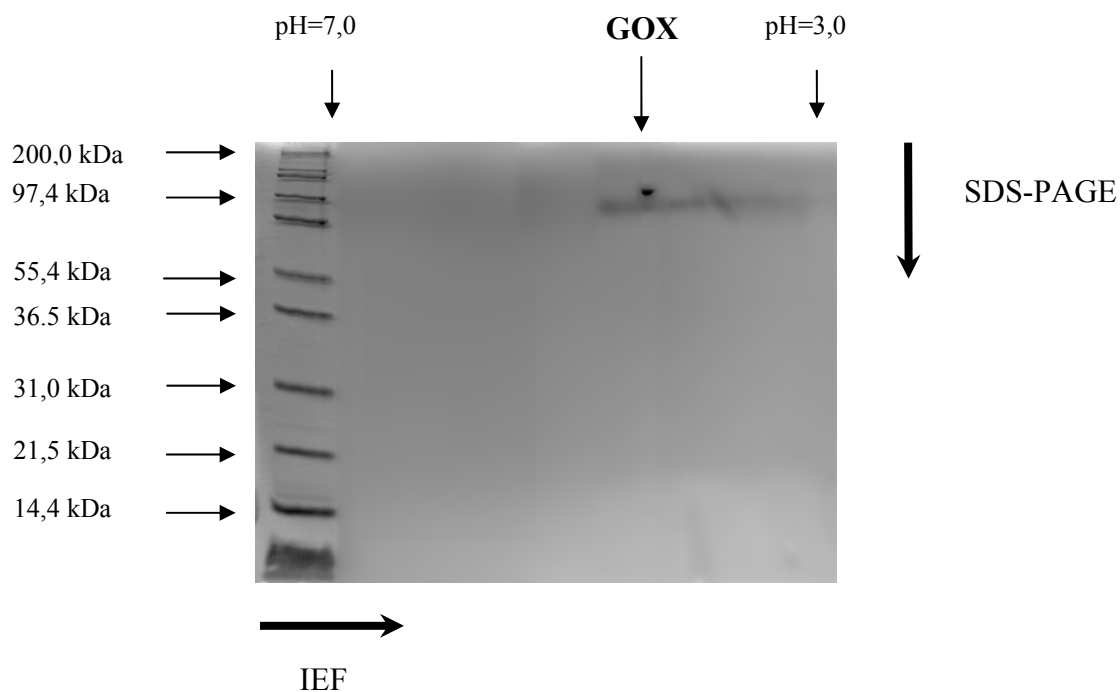
15. ábra A A kromatofókuszálás (PBE94) elúciós profilja. ● Antifungális hatás (*Candida albicans* növekedésgátlás %-ban), ■ fehérjetartalom, ▲ pH. Az antifungális hatás meghatározására az MTT/formazán tesztet használtuk mikrotiter plate-n (Lee és munkatársai, 1999; 3.3.2 fejezet). Minden esetben a *Candida albicans* ATCC 1023-hoz 5,4 μg fehérjetartalmú mintát adtunk (végtérfogat 120 μl).



15. ábra B A gélszűrés elúciós profilja (Superdex 200 FPLC oszlop). ● Antifungális hatás (*Candida albicans* növekedésgátlás %-ban), ■ fehérjetartalom. Az antifungális hatás meghatározására az MTT/formazán tesztet használtuk mikrotiter plate-n (Lee és munkatársai, 1999; 3.3.2 fejezet). Minden esetben a *Candida albicans* ATCC 1023-hoz 5,4 μ g fehérjetartalmú mintát adtunk (végtérfogat 120 μ l).



16. ábra A A *P. chrysogenum* GOX móltömegének meghatározása SDS-PAGE-sel redukáló körülmények között (Novex 10 % TRIS/GLICIN gél). Az 1. sáv Mark12 standardsort tartalmaz (3.2.2 fejezet), míg a 2. sávban 5 μ g tisztított GOX-ot vittem fel. A GOX móltömege 76000 Da, tisztasága nagyobb, mint 97 %, amit QuantiScan Version 1.2 programmal határoztunk meg (Biosoft, Cambridge, UK).



16. ábra B A *P. chrysogenum* GOX izoelektromos pontjának meghatározása. Az 1. sáv Mark12 standardsort tartalmaz (3.2.2 fejezet). A 2. sávban 8,5 μg tisztított GOX-ot vittem fel. A GOX-ot gyárilag készített Novex pH 3-7 IEF gélen futtattam meg, majd SDS-PAGE gélen molekulaméret szerinti elválasztást végeztem (gyárilag készített Novex 16 % TRIS/GLICIN gél).

Edman lebontással 14 N-terminális aminosavat szekvenáltunk (Lindner és munkatársai, 1998). Ez a szekvencia jelentős (78,6 %) homológiát mutatott a *Penicillium amagasakiense* és *Talaromyces flavus* fajokból izolált GOX-okéval (17. ábra). Ezt aktivitás mérésel is megerősítettük. Tehát a *P. chrysogenum*-ból tisztított antifungális hatású fehérje GOX-nak bizonyult.

Faj	N-terminális aminosav szekvencia	Referencia
	1 10 20 30 40 50	
	-----+-----+-----+-----+-----+-----+	
<i>T. flavus</i>	NYSVFLSTLLLAARTVQAYLPAQQIDVQSSLLSDPSKYAGKTYDYIIAGGI	Murray és mtsai. 1997
<i>P. amagasakiense</i>	NYSVFLSTLLLSAAAVQAYLPAQQIDVQSSLLSDPSKYAGKTYDYIIAGGI	Kiess és mtsai. 1998
<i>A. niger</i>	NQTLVSSLVYSLAALPHY-IRSNGLIASLLTOPKDYSGRTVDYIIAGGI	Frederick és mtsai. 1990
<i>P. chrysogenum</i>	YSPAEQIDVQSHLL	

17. ábra A *Penicillium chrysogenum* glükóz oxidáz N-terminális aminosav szekvenciával történő homológia-keresés (NCBI protein-protein BLAST segítségével, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) eredménye. A homológia a közeli rokon *Penicillium chrysogenum* és *Penicillium amagasakiense* fajok között 78,6 %-os. A szekvenciák összevetése a Florence Corpet's MultiAlin program segítségével történt (Corpet, 1988).

A *P. chrysogenum* glükóz oxidáza a D-glükózt nagy hatékonysággal oxidálja ($K_{m, \text{glükóz}} = 9,5 \text{ mM}$; $V_{\text{max, glükóz}} = 10,38 \text{ katkg}^{-1}$). Az enzim lényegesen kisebb hatékonysággal ugyan, de szintén katalizálja a D-xilóz oxidációját ($K_{m, \text{xilóz}} = 690 \text{ mM}$; $V_{\text{max, xilóz}} = 0,777 \text{ katkg}^{-1}$). Az enzim nem mutatott aktivitást D-fruktózzal, D-galaktózzal és D-arabinózzal szemben.

4.2.2 A glükóz oxidáz hatásspektruma

D-glükóz jelenlétében a tesztelt baktériumok, élesztők és fonalas gombák érzékenyek voltak a glükóz oxidázzal szemben, bár meglehetősen eltérő módon. A humán patogén *Candida* fajok növekvő szenzitivitást mutatnak a következő sorrendben: *C. albicans* \cong *C. dubliniensis* < *C. parapsilosis* < *C. glabrata* \cong *C. krusei*. Az *Aspergillus* fajok is eltérő mértékben érzékenyek a GOX-ra a következő sorrendnek megfelelően: *A. giganteus* < *A. niger* \cong *A. terreus* < *A. nidulans*. Ráadásul a termelő törzs, azaz a *P. chrysogenum* NCAIM 00237 is nagyon szenzitívnek bizonyult GOX-ra (**1. táblázat**).

Mikroorganizmusok	Érzékenység
<i>Serratia marcescens</i> ATCC 14756	+++
<i>Escherichia coli</i> TG2	+++
<i>Staphylococcus aureus</i> NCTC 6571	+++
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	+++
<i>Candida albicans</i> ATCC 1023	+
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	++
<i>Candida dubliniensis</i> NCPF 3949	+
<i>Candida glabrata</i> DSM 6425	+++
<i>Candida krusei</i> DSM 6128	+++
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> AH 109	+++
<i>Penicillium chrysogenum</i> Q176	+++
<i>Penicillium chrysogenum</i> NCAIM 00237	+++
<i>Aspergillus niger</i> CBS 12049	++
<i>Aspergillus giganteus</i> AG090701	+
<i>Aspergillus terreus</i> 304	++
<i>Aspergillus nidulans</i> FGSC26	+++

1. táblázat Különböző fajok érzékenysége a *P. chrysogenum* GOX-ra.

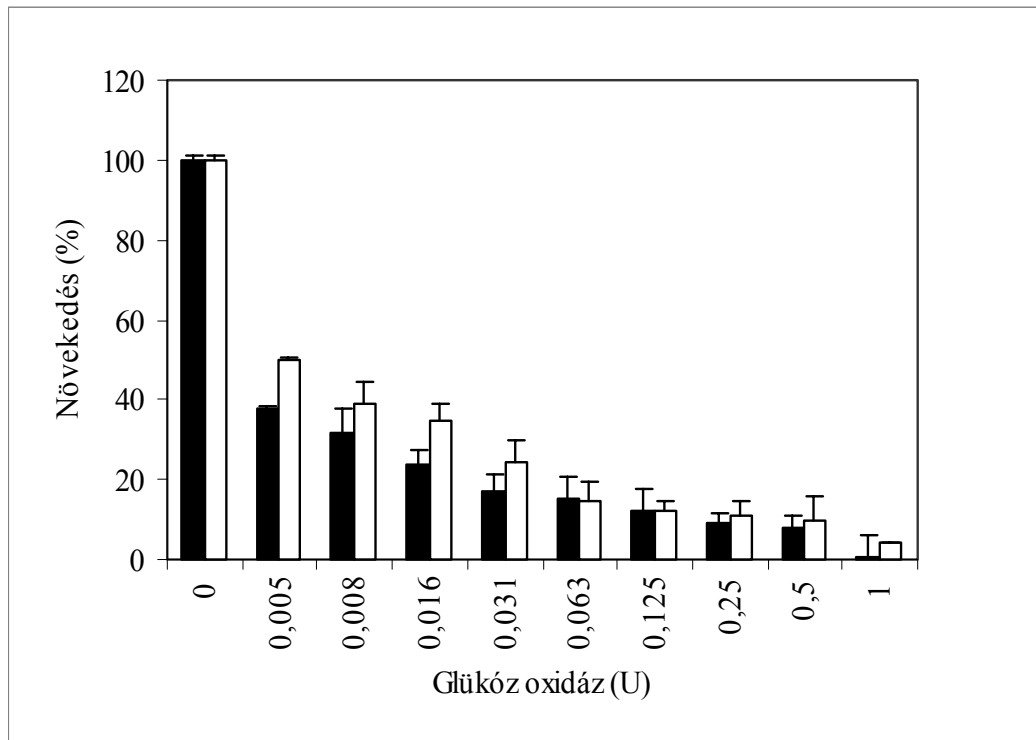
A végkoncentráció 40 µg/ml GOX volt (enzimaktivitás: 0,090 U).

- +++ nagyon érzékeny, növekedés gátlás >90 %;
- ++ érzékeny, növekedés gátlás 50–90 %;
- + enyhén érzékeny, növekedés gátlás 25-50 %.

Az antifungális hatás meghatározására az MTT/formazán tesztet használtuk mikrotiter plate-n (Lee és munkatársai, 1999; 3.3.2 fejezet).

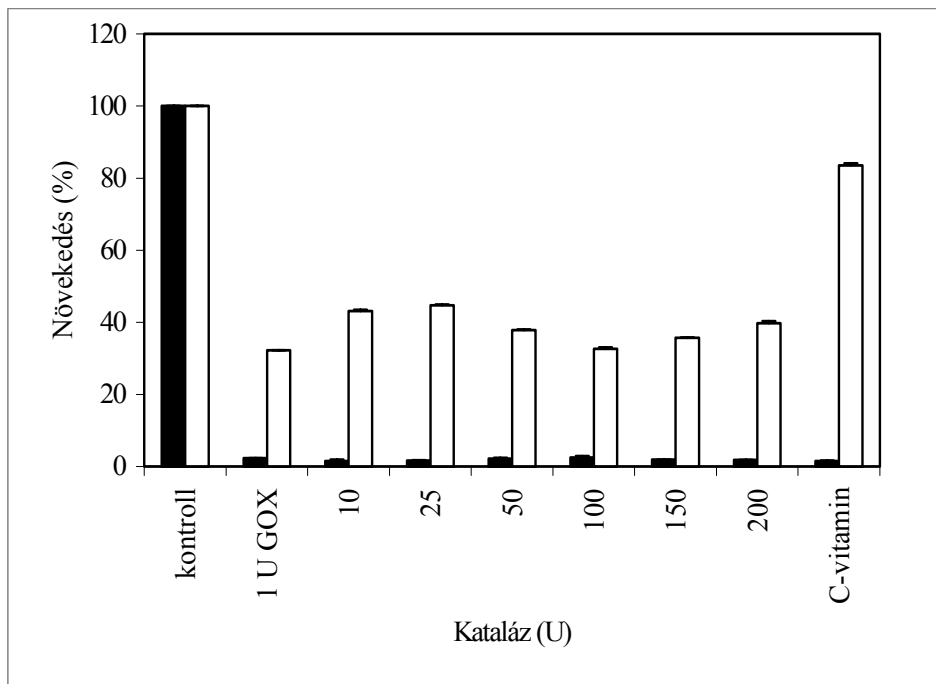
4.2.3 A glükóz oxidáz hatásmechanizmusának vizsgálata

A továbbiakban a GOX-zal szemben igen érzékeny *Aspergillus nidulans* FGSC26 tesztörzset használtuk. Kísérleteinkben ugyanakkor összehasonlítottuk a *Penicillium chrysogenum* és az *Aspergillus niger* által termelt glükóz oxidáz hatását is (**18. ábra**).



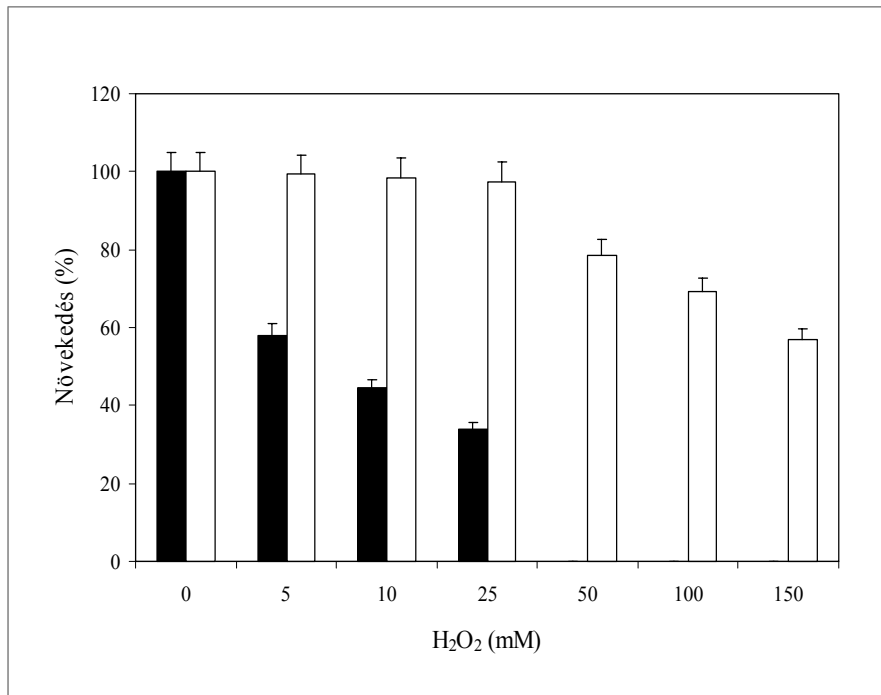
18. ábra Az *Aspergillus niger* (■) és a *Penicillium chrysogenum* (□) GOX-ának összehasonlítása 14 órás exponenciális fázisban levő *Aspergillus nidulans* tenyészetben. Az *A. nidulans* micéliumok 0,1-1 U GOX-zal voltak kezelve. Az antifungális hatást szintén az MTT/formazán teszt segítségével határoztuk meg (Lee és munkatársai, 1999; 3.3.2 fejezet).

Már 0,004 U GOX növekedésgátlást eredményezett, míg 1 U GOX elegendő volt a növekedés teljes blokkolásához. Meglepő módon katalázzal ez a hatás nem volt kivédhető, még 0,004:200 U GOX:kataláz arány esetén sem (**19. ábra**). Fontos megjegyezni, hogy a kísérlet inkubációs ideje alatt (9 óra), a kataláz aktivitása nem csökkent lényegesen. Csak 1 mg/ml koncentrációban beadott C-vitamin tudta a GOX hatását közömbösíteni, de csak 0,004 U GOX koncentráció alkalmazása esetén (**19. ábra**).



19. ábra A kataláz (0-200 U) részleges védő hatása 14 órás exponenciális fázisban levő *Aspergillus nidulans* tenyészetén, amelyet előzőleg 1 U (■) vagy 0,004 U (□) *Penicillium chrysogenum* GOX-zal kezeltünk. A kontroll tenyészet sem GOX-t, sem katalázt nem tartalmazott. A C-vitaminnal kezelt tenyészetekhez sem adtunk katalázt. Az antifungális hatást MTT/formazán teszt alkalmazásával határoztuk meg (Lee és munkatársai, 1999; 3.3.2 fejezet).

A H_2O_2 citotoxikus hatását külön kísérletben teszteltük, ahol az alkalmazott legnagyobb koncentráció megegyezett az előző két kísérletben (18. és 19. ábra) a tápközegben levő glükóz mennyiségével (20. ábra). 50 mM H_2O_2 már 100 %-os növekedésgátlást eredményezett. Ellentétben a GOX-zal már 4 U kataláz elegendő volt, hogy megakadályozza a H_2O_2 növekedésgátló hatását.



20. ábra A H_2O_2 (0-150 mM) antifungális hatása 14 órás exponenciális fázisban levő *A. nidulans* tenyészetben (■). Párhuzamos kísérletben a tenyészetek 4 U katalázt is tartalmaztak, demonstrálva a kataláz antioxidáns tulajdonságát (□). Az antifungális hatást MTT/formazán teszt alkalmazásával határoztuk meg (Lee és munkatársai, 1999; 3.3.2 fejezet).

Mivel katalázzal a GOX sejtkárosító hatását még igen nagy koncentrációban sem tudtuk kivédeni, feltételeztük, hogy a GOX kitapad a célsejtek falán és membránkárosodást okoz. Ezért a glükóz oxidáz esetleges lokalizációjának meghatározására indirekt immunfestést alkalmaztunk *Aspergillus nidulans* FGSC26 tesztörzsön. A kontroll és GOX-zal kezelt sejtek semmilyen különbséget nem mutattak, tehát a GOX nem tapad ki a sejtekhez, sem a sejtfalhoz, sem a hifacsúcsokhoz (a festés nincs bemutatva).

Elméleti számításokat végezve (Keleti, 1985) az általunk használt modellrendszerekben a steady-state H_2O_2 koncentráció maximálisan $1,48 \mu\text{M}$ volt, még 1 U *P. chrysogenum* GOX és 10 U kataláz esetén is ($k_{\text{cat,GOX}} = 1609 \text{ s}^{-1}$, $k_{\text{cat,kataláz}} = 8 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$, $E_{\text{t,GOX}} = 9,9 \times 10^{-9} \text{ M}$, $E_{\text{t,kataláz}} = 3,36 \times 10^{-7} \text{ M}$, $K_{\text{m,kataláz}} = 25 \text{ mM}$). A számításokhoz a kataláz kinetikai paramétereit Abe és munkatársai cikkéből (1979) használtuk fel. Kisebb GOX és nagyobb kataláz koncentráció esetén a $[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{ss}}$ még kisebbnek adódott (nM-os nagyságrendűnek).

5. Az eredmények megbeszélése

5.1 A *Penicillium chrysogenum* antifungális proteinjének (PAF) jellemzése

5.1.1 A PAF hiperpolarizációt indukál az *Aspergillus nidulans* sejtmembránján

A di-8-ANEPPS feszültségérzékeny fluoreszcens festék alkalmazásával bebizonyítottuk, hogy a PAF a szenzitív gombák plazmamembránjának hiperpolarizációját okozza (4. és 5. ábra). Jól ismert, hogy gombákban a membránpotenciál fenntartása H^+ -efflux segítségével, aktívan történik (Serrano és munkatársai, 2001). Feltételezhető, hogy a PAF direkt vagy indirekt módon hat a plazma membránban található H^+ pumpa működésére vagy más ionáramokat (pl. K^+ áramokat) befolyásol. Ez az eredmény összhangban van a korábbi kísérleti eredményekkel, mely szerint a PAF K^+ -effluxot okoz *Aspergillus nidulans*-ban (Kaiserer és munkatársai, 2003). Mint ismert, a PAF-kezelés torzult morfológiai formákat eredményez: a hifavégek megduzzadnak és rövid, többszörösen elágazó fonalvégek képződnek *Aspergillus nidulans*-ban (Kaiserer és munkatársai, 2003), azaz a PAF közvetve vagy közvetlenül az apikális növekedésre hat. Így nagy valószínűséggel a hifacsúcsban tapasztalt hiperpolarizáció lehet a kiváltója ennek a jelenségnek.

Membránpotenciál változást számos antimikrobiális protein okozhat. A colicin A, az *Escherichia coli*-ból származó fehérje, a célsejtekhez kötődve, feszültségfüggő csatornát képez a membránon és ezzel K^+ -effluxot indukál, ami a sejtek depolarizációjához vezet (Bourdineaud és munkatársai, 1990). Rovarokból származó kis móltömegű defenzinről (Cociancich és munkatársai, 1993), illetve a nyúlból származó neutrofil peptidről (NP-1) és humán defenzinekről (HNP-1) (Kagan és munkatársai, 1990) hasonló adatok állnak a rendelkezésünkre. Ezekre a fehérjékre jellemző azonban, hogy a hőmérséklet csökkenésével a K^+ -efflux lecsökken, illetve megszűnik, ami PAF jelenlétében nem mutatható ki (Dr. Florenitne Marx és munkacsoportjának személyes közlése). Ez megerősíti azt a korábbi állítást, mely szerint a PAF receptorhoz kötődik és aktív transzporttal, endocitózissal jut be a célsejtekbe (Oberparleiter és munkatársai, 2000). Növényi defenzinekről szintén írtak le K^+ -effluxot okozó hatást, amely független volt a kísérletben alkalmazott hőmérséklettől (Thevissen és munkatársai, 1996). Ezidáig azonban még nem sikerült a PAF-ra specifikus receptort izolálni a szenzitív gombafajokból.

5.1.2 A PAF G-proteinnel kapcsolt jelátviteli útvonalon keresztül fejt ki hatását

A PAF receptorhoz való kötődését a szenzitív fajokban az a kísérleti eredmény is megerősítheti, hogy a PAF G-proteinnel kapcsolt jelátviteli útvonalon keresztül fejt ki hatását. A PAF által kiváltott növekedésgátláshoz feltétlenül szükséges aktív G-proteinnel kapcsolt jelátviteli útvonal, mivel az *Aspergillus nidulans fadA^{G203R}* a G-protein működésében inaktív mutáns rezisztens a PAF-vel szemben (**1.** és **6. ábra**). Hasonló rezisztenciát tapasztaltak a növényi ozmotin esetén is *A. nidulans fadA^{G203R}* mutáns (Coca és munkatársai, 2000). Ugyanakkor az *flbA* gén deléciója nem befolyásolja a PAF hatását, amely azt valószínűsíti, hogy a PAF hatásához ténylegesen aktív G-proteinnel kapcsolt jelátviteli útvonal szükséges. Ezzel ellentétes tulajdonságot mutatott az ozmotin, mivel az *A. nidulans AflbA* ugyanúgy rezisztens volt, mint az *A. nidulans fadA^{G203R}* mutáns (Coca és munkatársai, 2000), ami nehezen diszkutálható.

A GTP γ S jelenléte szintén rezisztenciát okoz PAF-vel szemben az *A. nidulans* FGSC26 törzsben, míg a GDP β nem befolyásolja a PAF hatását (**7. ábra**). A GTP γ S és GDP β S jelenléte a növényi defenzinek hatását csökkenti (Thevissen és munkatársai, 1996), míg az ozmotin hatásának redukálódása csak GDP β S jelenlétében figyelhető meg (Coca és munkatársai, 2000). A GTP γ S nukleotid analóg állandóan aktív állapotban tartja a G-proteint, míg a GDP β S állandóan inaktív állapotban. Tehát a *AflbA* mutáció a GTP γ S által kiváltott hatáshoz, míg a GDP β S jelenléte a *fadA^{G203R}* hatásához lehet hasonló. Megállapíthatjuk, hogy a guanidin nukleotid analógokkal végzett *in vivo* gátlási kísérletek nem korrelálnak az *A. nidulans AflbA* és *fadA^{G203R}* mutánsokkal végzett kísérletekkel PAF esetében, ugyanis ezek az analógok nagy valószínűséggel más G-proteineket is befolyásolnak. Így a gátlási kísérletek eredményei az inhibitoroknak különféle G-proteinekre gyakorolt hatásainak együttes eredői. Ez jelzi, hogy a PAF hatásának kifejeződésében más G-proteinek is szerepet játszhatnak.

Az ozmotin például *Saccharomyces cerevisiae*ben bizonyítottan más G-proteinnel mediált útvonalon hat, hiszen gátolja a RAS2/cAMP/PKA stresszválasz útvonalat, amely az élesztő sejtek apoptózisához vezet, de nincs hatása a Ras1 fehérjére (Narasimhan és munkatársai, 2001). *Aspergillus nidulans*ban egyetlen ras fehérje (RasA) található (Som és Kolaparthi, 1994), de ennek deléciója letális, ezért ezt az útvonalat nem tudtuk vizsgálni PAF-vel.

*Aspergillus nidulans*ban a FadA-n kívül még további két G α alegységet találtak, a GanA-t és a GanB-t. A GanB gátolja a spórázást és indukálja a konidiumok csírázását hasonlóan a FadA-hoz (Chang és munkatársai, 2004). A GanA *A. nidulans* növekedésében betöltött szerepét jelenleg is vizsgálják (Han és munkatársai, 2004). Tervezzük ezen G-proteinek esetleges szerepének a tanulmányozását a PAF által kiváltott apoptotikus sejtpusztulásban.

Azt is fontos megjegyezni, hogy a sejtfal képzésében is fontos szerepe van a G-proteinnel kapcsolt jelátviteli útvonalaknak és ez hatással van az antifungális szerekkel szembeni érzékenységre is. Az *A. nidulans fadA^{G203R}* mutáns, amely ozmotinnal szemben rezisztenciát mutatott, SDS-sel és lítikus enzimekkel szemben is ellenállóbbnak bizonyult, valószínűleg annak köszönhetően, hogy sejtfala nagyobb mennyiségű kitint tartalmaz és a sejtfal porozitása is lényegesen kisebb, mint a vad típusú törzsé (Coca és munkatársai, 2000). Elképzelhető, hogy a megváltozott sejtfalszerkezet biztosít rezisztenciát a PAF-vel szemben az *A. nidulans fadA^{G203R}* mutáns törzs számára. Ráadásul ez az *A. nidulans fadA^{G203R}* mutáns sokkal lassabb növekedést mutat és süllyesztett tenyészetben is spórázik (Adams és munkatársai, 1998; Molnár és munkatársai, 2004), így csökkent metabolikus aktivitása is érzéketlenné teheti a PAF hatásával szemben.

5.1.3 A PAF apoptózist indukál a szenzitív törzsekben

A PAF programozott sejthalált indukál *A. nidulans*ban. Apoptózist többek között a reaktív oxigénformák (ROS) mennyiségének növekedése is kiválthat (Greenlund és munkatársai, 1995; Ligr és munkatársai, 1998; Madeo és munkatársai, 1999, 2002). A ROS akkumulálódása PAF kezelés hatására főleg a mitokondriumokban mutatható ki (Dr. Florentine Marx és munkacsoportja) (**8. ábra**). Metazoonokban a ROS mennyiségének növekedése a mitokondriumok széteséséhez, mitoptózishoz vezet (Madeo és munkatársai, 1999; Skulachev, 2000). Ez a folyamat egy kaspáz rendszert aktivál a citoszólban, amely elindítja a programozott sejthalált (Skulachev, 2002). Gombákban a prokaspáz-kaspáz rendszer hiányzik, de a mitoptózis itt is beindítja a sejthalál programot, ennek a folyamatnak a molekuláris háttere azonban még nem ismert. *Saccharomyces cerevisiae*ben találtak egy a kaspázok szerkezetével homológ fehérjét (YCA-1), amely H₂O₂ hatására nagy mennyiségben termelődött (Madeo és munkatársai, 2002). Hasonlóan a PAF-hez az ozmotin *S. cerevisiae*ben szintén apoptózist indukál. A programozott sejthalál kiváltója a reaktív oxigénformák jelenléte, mivel akár egy antioxidáns enzim jelenlétének hiánya (pl. tioredoxin peroxidáz) is ROS akkumulálódást és TUNEL pozitív reakciót eredményez ozmotin hatására (Narasimhan és munkatársai, 2001).

Az apoptózis egyik jellegzetes markere a citoplazmamembrán kifordulása, amelyet PAF jelenlétében tapasztaltunk *A. nidulans* protoplasztokon Annexin V-vel festve azokat (**9. ábra**). A foszfatidil-szerin transzlokációját a membrán külső felszínére nem csak emlős sejteken (Champagne és munkatársai, 1999), de élesztőkben és más fonalas gombákban is megfigyelték már (Mousavi és Robson, 2003; Madeo és munkatársai, 1999). *Saccharomyces cerevisiae*ben a *cdc48* (a CDC48 fehérje vezikulumok fúziójáért felelős) mutációja, a glutation hiánya (γ -glutamilcisztein szintáz gén deléciójával) és az emlős *bax* gén expressziója apoptózist indukált. Minden esetben ROS akkumulálódást detektáltak a sejtekben, igazolva, hogy a reaktív oxigénformák kulcselemei az apoptózisnak (Madeo és munkatársai, 1999). Laun és munkatársai (2001) öregedő *Saccharomyces cerevisiae* sejtek mitokondriumaiban ROS-at figyeltek meg, és ezek a sejtek TUNEL és DAPI festéssel apoptotikusnak bizonyultak. *Aspergillus fumigatus*ban a növekedés stacioner fázisának kezdetén apoptotikus markerek mutathatók ki (Mousavi és munkatársai, 2003).

A programozott sejthalálban a DNS fragmentációja és a sejtmagvak töredezése is megfigyelhető. PAF kezelés hatására TUNEL festéssel igazoltuk a DNS fragmentációját (**11. ábra**), illetve DAPI festéssel a sejtmagvak torzulását (**10. ábra**).

A PAF-vel kezelt *Aspergillus nidulans* hifák ultrastruktúráját vizsgálva szintén apoptotikus jegyeket fedezhetünk fel. A sejtmembrán fodrosodása, mikrovezikulák képződése csak az apoptózis során megfigyelhető jelenségek (Dr. Florentine Marx és munkacsoportja) (**12. ábra**) (Gomez-Angelats és munkatársai, 2000).

Hasonlóan a PAF-hez, apoptózist váltottak ki *Aspergillus fumigatus*-ban a sejtfalra ható anyagok közül az echinocandin (glükán szintáz inhibitor) és a nikkomycin (kitin szintáz inhibitor) is (Chiou és munkatársai, 2001).

5.1.4 A PAF-nek nincs gyulladáskeltő hatása

Az emberi immunrendszer rendkívül fontos elemei a mintázat felismerő receptorok, amelyek különféle mikrobiális alkotókra specifikusak és azonnali immunválaszt indukálnak a szervezetben. A vérben keringő neutrofilok, monociták, makrofágok felszínén található Toll-szerű receptorok képesek felismerni rendkívül kis mennyiségű (pikogramnyi) bakteriális vagy fungális sejtalkomponenseket (pl. LPS, proteoglikánok) és gyulladáskeltő citokinek termelődését indukálják. A proinflammatorikus citokinek (IL-6, IL-8, TNF- α) termelődéséért elsősorban a perifériás vérben található aktivált monociták a felelősek, amelyek a vérsejtek 3-5 %-át jelentik. Ezeknek a citokineknek a gyors termelődését kiválthatják ezenkívül más citokinek, akut fázis fehérjék, biológiailag aktív vegyületek, amelyek gyulladást okoznak a szervezetben. A természetes immunválasznak ez a reakciója kiemelt fontosságú a szerzett immunitásban is (Barton és munkatársai, 2002; Triantafilou és munkatársai, 2002).

Kísérleteinkben a PAF még a legnagyobb koncentrációban (2 $\mu\text{g/ml}$) sem okozott gyulladást okozó reakciót összehasonlítva a pozitív kontrollként használt LPS-sel (**13. ábra**), amely minden donorban erőteljes IL-6, IL-8 és TNF- α termelődést váltott ki.

A PAF-vel rokon fehérjék, az emlős defenzinek a PAF-vel ellentétben indukálják gyulladáskeltő citokinek termelődését. A humán neutrofil α -defenzinek (HNP-1-3) a bronchiális epitelsejteket indukálják IL-8 termelésére, amely inflammatorikus hatású és kiváltják a neutrofilok akkumulálódását is. Emellett ezek a defenzinek IL-1 és TNF- α termelődését is okozzák, felerősítve a lokális gyulladást (Yang és munkatársai, 2002).

Az egérből izolált β -defenzin ugyanakkor a TLR-4 receptorhoz kapcsolódva nagy valószínűséggel felerősíti az LPS által kiváltott választ, ha az túl kicsi koncentrációban van

jelen és olyan jelátviteli útvonalakat is befolyásol, amely a dendritikus sejtek éréséhez és így a kórokozó leküzdéséhez vezet (Biragyn és munkatársai, 2002).

5.1.5 A PAF hatása egyéb emlős sejteken

A PAF sem vaszkuláris endotélsejteken, sem idegsejteken (agyszeleteken, hippocampusból származó neuronon, asztrocitán), sem izomsejteken és izomroston nem váltott ki sejtkárosodást.

5.1.6 A PAF lehetséges alkalmazásai

A PAF stabilitása (szélsőséges pH-val, hőmérséklettel, proteázokkal szemben), humán sejtekkel szembeni citotoxicitásának hiánya lehetővé teszi ezen fehérje használatát humán mikózisok kezelésében, pl. *Aspergillus fumigatus* fertőzések esetén.

Mivel a PAF számos fitopatogén és raktári kártevő gomba növekedését is gátolja (pl. *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*) (Kaiserer és munkatársai, 2003), így alkalmas lehet növényvédelmi célokra, pl. a *pafl* gént tartalmazó transzgenikus növények előállítására révén, illetve élelmiszerek konzerválására.

5.2 A *Penicillium chrysogenum* glükóz oxidázának jellemzése

5.2.1 A glükóz oxidáz tisztítása, enzimológiai jellemzése

A *Penicillium chrysogenum* NCAIM 00237 ipari penicillin-termelő törzs fermentlevéből szacharóz szénforráson és nitrát nitrogénforráson egy 155000 Da móltömegű fehérjét sikerült izolálni, amely *Candida*-ölő hatással rendelkezik és antimikrobiális hatást mutat mind a Gram-pozitív, mind a Gram-negatív baktériumokkal, illetve élesztőkkel és fonalas gombákkal szemben. Az N-terminális szakaszból (14 aminosav) homológia-kutatás (protein-protein NCBI Blast) és enzimológiai vizsgálatok eredményeképpen a fehérje glükóz oxidáznak bizonyult (**17. ábra**). Korábbi kísérletek is alátámasztják, hogy a szacharóz és nitrát meglepő módon jó szubsztrátjai a GOX termelésnek, mivel a szacharóz glükózra és fruktózra bomlik és a nitrát enyhén savas tápközeget (pH 5,5-6,5) biztosít (Mischak és munkatársai, 1985; Rando és munkatársai, 1997), amely fontos körülmény, mivel savas pH-n a GOX termelődése gátlódik és az enzim inaktiválódik (Fogarty és Kelly, 1990).

Penicillium chrysogenum GOX-ot először 1987-ben izolálták (Eriksson és munkatársai), de a fehérje jellemzői ($M_r = 175000$, $M_{r,\alpha} = 72000$, pI = 4,2) nagyban eltérnek az általunk vizsgált törzsből származó GOX-étól ($M_r = 155000$, $M_{r,\alpha} = 76000$, pI = 5,4) (**15. és 16. ábra**), amely talán az eltérő tisztítási módszer alkalmazásának következménye. A *P. chrysogenum* GOX általunk meghatározott kinetikai paraméterei ($K_m = 9,5$ mM, $V_{max} = 10,38$ katkg⁻¹, $k_{cat} = 1609$ s⁻¹) nagy hasonlóságot mutatnak más *Penicillium* fajokból izolált GOX-okéval (Swoboda és Massey, 1965; Garzillo és munkatársai, 1995; Witt és munkatársai, 1998) (**2. táblázat**)

GOX	K_m (mM)	V_{max} (katkg ⁻¹)	k_{cat} (s ⁻¹)
<i>Penicillium amagasakiense</i>	5,7	15,35	2001
<i>Penicillium variable</i> P16	6	16,29	1805
<i>Penicillium chrysogenum</i> NCAIM 00237	9,5	10,38	1609

2. táblázat Különböző *Penicillium* fajokból származó glükóz oxidázok kinetikai paramétereinek összehasonlítása

5.2.2 A glükóz oxidáz hatásspektrumának vizsgálata

A GOX antimikrobiális hatását több fajon teszteltük, beleértve a termelő *P. chrysogenum* NCAIM 00237 törzset is (**1. táblázat**). Meglepő módon a nagy oxidatív toleranciát mutató termelő törzs is szenzitív GOX-zal szemben. Glükóz tartalmú tápközegben a *P. chrysogenum* NCAIM 00237 törzset exponenciális fázisban nagy mértékű oxidatív gyök akkumulálódás jellemzi, amely nagy valószínűséggel a jelenlevő GOX H₂O₂ termelésének tulajdonítható (Sámi és munkatársai, 2003). A *P. chrysogenum* fonalas gomba nagyfokú rezisztenciát mutat oxidatív stresszt generáló ágensekkel szemben, ami azzal magyarázható, hogy a fonalak állandó endogén stressznek vannak kitéve, illetve ez folyamatosan indukálja a hatékonyan működő ROS elimináló rendszert (Sámi és munkatársai, 2003). Valószínűleg a nagy feleslegben adott GOX felborítja a ROS generáló és elimináló rendszer egyensúlyát, ami magyarázhatja a GOX termelő törzs GOX-szenzitivitását.

A különböző *Candida* fajok eltérő érzékenysége GOX-zal szemben fontos információ, mert ez jelzi a fajok rezisztenciáját oxidatív stresszel szemben. Eredményeinkkel összhangban Maródi és munkatársai igazolták (1991), hogy azok a *Candida* fajok, amelyek nagyobb kataláz vagy szuperoxid dizmutáz aktivitást mutatnak, ellenállóbbak a mieloperoxidáz által termelt hipoklorittal és monoklóraminnal szemben.

A glükóz oxidázzal szembeni eltérő érzékenység fontos szerepet játszhat a gombák közötti kölcsönhatásban is, hiszen a GOX-termelő és nagyobb mértékben GOX-rezisztens fajok a tápanyagért folyó versenyben előnyre tehetnek szert. Pl. a *Talaromyces flavus* mikoparazita gomba által termelt GOX gátolja a *Verticillium dahliae* növénypatogén gomba csírázását és növekedését (Madi és munkatársai, 1997; Murray és munkatársai, 1997).

5.2.3 A glükóz oxidáz hatásmechanizmusának vizsgálata

A GOX antimikrobiális hatása az általa termelt, oxidatív sejtkárosodást okozó H_2O_2 -nek tulajdonítható. Ezt a hatást a tesztelt *Aspergillus nidulans* mikroorganizmus esetében csak 1 mg/ml koncentrációjú C-vitamin, mint antioxidáns volt képes meggátolni (19. ábra). Meglepő módon más korábbi eredményekkel ellentétben (Kim és munkatársai, 1988; Geisen, 1999), a tenyészethez adott kataláz nem volt képes kivédeni a GOX által generált oxidatív stresszt. Ennek két oka lehetett feltételezéseink szerint: (1) a GOX vagy kitapad a célsejteken és membránkárosodást okoz, vagy (2) a GOX/kataláz rendszerben a gyorsan elfogyott oxigén vezetett a mikroorganizmusok pusztulásához. Bár a GOX-ok nagy része a termelő fajokban a sejtfalban lokalizálódik (*Aspergillus niger*ben, Witteveen és munkatársai, 1992) illetve a *Penicillium chrysogenum* GOX periplazmatikus lokalizációt mutat (Nielsen, 1995), immunfestéssel nem sikerült detektálni a GOX kitapadását *A. nidulans*on (4.2.3 fejezet).

A steady-state H_2O_2 koncentráció igen kicsinek (μM -nM nagyságrendűnek) bizonyult az általunk alkalmazott körülmények között. Ezért nagy valószínűséggel a GOX/kataláz rendszerben kialakuló oxigénhiány idézte elő a másodlagos növekedésgátlást *A. nidulans*ban. Bár Hall és Denning (1994) vizsgálatai alapján ismert, hogy az *Aspergillus* fajok képesek növekedésre alacsony oxigén tenzió mellett is, de 0,025% oxigén koncentráció alatt ők nem tapasztaltak növekedést.

A GOX/kataláz rendszernek ezt a hatását már alkalmazzák az élelmiszeriparban konzerválásra, hiszen az oxigén eliminálása elpusztítja az aerob mikroorganizmusokat (Dondero és munkatársai, 1993; Kantt és munkatársai, 1993; Fuglsang és munkatársai, 1995). Dondero és munkatársai (1993) bebizonyították, hogy a garnélarák tartósításakor a GOX/kataláz rendszer gátolta a pszikrofil és *Pseudomonas* fajok növekedését. Kantt és munkatársai (1993) vizsgálatai szerint a garnélarák barnulása 80 %-kal csökkent és az ammónia illetve egyéb nitrogéntartalmú gázok képződése is megszűnt a GOX/kataláz rendszer hatására. A GOX/kataláz rendszer alkalmas szirupok és narancsdzsúz tartósítására (Sagi és Mannheim, 1990) és folyékony tojásból a cukor és oxigén eltávolítására (Kantt és munkatársai, 1993).

5.2.4 A *P. chrysogenum* GOX lehetséges felhasználása

A *P. chrysogenum* GOX kinetikai paramétereit alapján ígéretesnek bizonyulhat bioszenzorokban, pl. a glükóz mennyiségi meghatározására a vérben és egyéb testfolyadékokban (Jaffari és Turner, 1995; Liang és munkatársai, 2000).

Antimikrobiális hatása miatt felhasználhatják biofilmek eltávolítására katéterekről, implantátumokról (Johansen és munkatársai, 1997).

Az élelmiszeriparban katalázzal együtt alkalmazást nyerhet antimikrobiális és konzerváló anyagként is (Dziezak és munkatársai, 1986; Tiina és Sandholm, 1989; Begliomini és munkatársai, 1995; Dobbenie és munkatársai, 1995; Fugslang és munkatársai, 1995).

6. Összefoglalás

6.1 A *Penicillium chrysogenum* kis móltömegű fehérjéje (PAF)

A *Penicillium chrysogenum* NCAIM 00237 ipari penicillin-termelő törzs szacharóz és nitrát tápközegben kis móltömegű antifungális hatású fehérjét (PAF) termel.

A PAF a szenzitív gombákon, így az általunk vizsgált *Aspergillus nidulans* hiperpolarizációt indukál, amely a PAF-vel történő inkubáció 40. percében már kimutatható.

A PAF minden bizonnyal G-proteinnel kapcsolt jelátviteli útvonalon fejti ki hatását, amelyet G-proteinben sérült *Aspergillus nidulans* mutánsokkal és guanidin nukleotid analógok használatával bizonyítottunk.

A PAF reaktív oxigénformák akkumulálódását indukálja az *Aspergillus nidulans* mitokondriumaiban, amely a mitokondriumok dezintegrációjához vezet (Dr. Florentine Marx és munkatársai).

A PAF programozott sejthalált okoz *Aspergillus nidulans*ban, amely a DNS fragmentációjával, a sejtmag töredezésével, a sejtmembrán kifordulásával jellemezhető. A sejtmembrán fodrosodása és mikrovezikulák, vakuólumok megjelenése szintén megfigyelhető PAF hatására (Dr. Florentine Marx és munkatársai).

A PAF nem vált ki gyulladást humán vérből származó sejteken, sem a TNF- α , sem az IL-6, illetve IL-8 szintje nem növekszik PAF kezelés hatására.

Munkatársaink megfigyelései szerint a PAF nem volt citotoxikus vaszkuláris endotélsejteken, ideg-és izomsejteken, ami valószínűleg lehetővé teszi ennek a fehérjének a biztonságos felhasználását humán terápia és mezőgazdasági növényvédelmi célokra.

6.2 A *Penicillium chrysogenum* glükóz oxidáza (GOX)

A *Penicillium chrysogenum* NCAIM 00237 törzs szacharóz és nitrát tápközegben egy nagy móltömegű, antimikrobiális enzimet, glükóz oxidázt termel, amely legnagyobb aktivitással a fermentáció 72. órájában figyelhető meg.

A glükóz oxidáz móltömege eltér más *Penicillium* fajokból származó enzimekétől, de kinetikai paraméterei nagy hasonlóságot mutatnak azokéval.

Az általunk izolált enzim már 40 $\mu\text{g/ml}$ -es koncentrációban alkalmazva is hatékonyan bizonyult az élesztők és fonalas gombák széles spektrumával szemben, de a

tesztelt gombák GOX-érzékenysége eltérő mértékű. A GOX-érzékenység egyértelműen a különböző gombák fajspecifikus antioxidatív védekező képességének a függvénye.

A GOX nem tapad ki a célsejtek sejtfalához és a GOX/kataláz rendszerben levő kis mennyiségű steady-state H_2O_2 koncentráció sem magyarázza a GOX nagy mértékű antimikrobiális hatását. Minden bizonnyal a két enzim az oldott oxigén gyors eliminálása révén olyan anaerob miliót teremt, amely másodlagos antimikrobiális hatást eredményez.

7. Irodalom

Abe, K., Makino, N. and Anan, F.K. (1979) pH dependency of kinetic parameters and reaction mechanism of beef liver catalase. *J. Biochem.* **85**: 473-479.

Adams, T.H., Wieser, J.K. and Yu, J.-H. (1998) Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 35-54.

Barratt, R.W., Johnson, G.B. and Ogata, W.N. (1965) Wild-type and mutant stocks of *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **52**: 233-246.

Barton, G.M. and Medzhitov, R. (2002) Control of adaptive immune response by Toll-like receptors. *Curr. Opin. Immun.* **14**: 380-383.

Beach, J.M., McGahren, E.D., Xia, J. and Duling, B.R. (1996) Ratiometric measurement of endothelial depolarization in arterioles with a potential-sensitive dye. *Am. J. Physiol.* **270**: 2216-2272.

Begliomini, A.L., Montedoro, G., Servili, M., Petruccioli, M. and Federici, F. (1995) Oxidoreductases from tomato fruit: inhibitory effect of a fungal glucose oxidase. *J. Food Biochem.* **19**: 161-173.

Biragyn, A., Ruffini, P.A., Leifer, C.A., Klyushnenkova, E., Shakhov, A., Chertov, O., Shirakawa, A.K., Farber, J.M., Segal, D.M., Oppenheim, J.J. and Kwak, L.W. (2002) Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by β -defensin 2. *Science* **298**: 1025-1029.

Bourdineaud, J.P., Boulanger, P., Lazdunski, C. and Letellier, L. (1990) In vivo properties of colicin A: channel activity is voltage dependent but translocation may be voltage independent. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 11037-1041.

Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.

Cailliez-Grimal, C., Revol-Junelles, A.-M., Linder, M. and Milliere, J.-B. (2002) Antimicrobial activity spectra of the glucose/glucose-oxidase and the lactoperoxidase systems (SCN⁻) modified by I⁻ and IO₃⁻ anion. *Milchwissenschaft* **57**: 656-660.

Champagne, M.J., Dumas, P., Orlov, S.N., Bennett, M.R., Hamet, P. and Tremblay, J. (1999) Protection against necrosis but not apoptosis by heat-stress proteins in vascular smooth muscle cells: evidence for distinct modes of cell death. *Hypertension* **33**: 906-913.

Chang, M.-H., Chae, K.-S., Han, D.-M. and Jahng, K.-W. (2004) The GanB G α protein negatively regulates asexual sporulation and plays a positive role in conidial germination in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* (in press).

Chiou, C.C., Mavrogiorgos, N., Tillem, E., Hector, R. and Walsh, T.J. (2001) Synergy, pharmacodynamics, and time-sequenced ultrastructural changes of the interaction between nikkomycin Z and echinocandin FK463 against *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**: 3310-3321.

Coca, M.A., Damsz, B., Yun, D.-J., Hasegawa, P.M., Bressan, R.A. and Narasimhan, M.L. (2000) Heterotrimeric G-proteins of a filamentous fungus regulate cell wall composition and susceptibility to a plant PR-5 protein. *Plant J.* **22**: 61-69.

Cociancich, S., Ghazi, A., Hetru, C., Hoffmann, J.A. and Letellier, L. (1993) Insect defensin, an inducible antibacterial peptide, forms voltage-dependent channels in *Micrococcus luteus*. *J. Biol. Chem.* **268**: 19239-19425.

Corpet, F. (1988) Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res.* **16**: 10881-10890.

Csernoch, L., Szentesi, P. and Kovács, L. (1999) Differential effects of caffeine and percholate on excitation-contraction coupling in mammalian skeletal muscle. *J. Physiol. (Lond)* **520**: 217-230.

Dobbenie, D., Uyttendaele, M. and Debevere, J. (1995) Antibacterial activity of the glucose oxidase/glucose system in liquid whole egg. *J. Food. Protect.* **58**: 273-279.

Dondero, M., Egana, W., Tarky, W., Cifuentes, A. and Torres, J.A. (1993) Glucose oxidase/catalase improves preservation of shrimp (*Heterocarpus reedi*). *J. Food Sci.* **58**: 774-779.

Dziezak, J.D. (1986) Antioxidants, the ultimate answer to oxidation. *Food Technol.* **40**: 94-103.

Eichenseer, H., Mathews, M.C., Bi, J.L., Murphy, J.B. and Felton, G.W. (1999) Salivary glucose oxidase: multifunctional roles for *Helicoverpa zea*? *Arch. Insect. Biochem. Phys.* **42**: 99-109.

Eriksson, K.-O., Kourteva, I., Yao, K., Liao, J.-L., Kilár, F. and Hjertén, S. (1987) Application of high-performance chromatographic and electrophoretic methods to the purification and characterization of glucose oxidase and catalase from *Penicillium chrysogenum*. *J. Chrom.* **397**: 239-249.

Ezaki, B., Gardner, R.C., Ezaki, Y. and Matsumoto, H. (2000) Expression of aluminium-induced genes in transgenic *Arabidopsis* plants can ameliorate aluminium stress and/or oxidative stress. *Plant Physiol.* **122**: 657-665.

Fogarty, W.M. and Kelly, C.T. (1990) Microbial enzymes and biotechnology (2nd edition). *Elsevier Science Publishers Ltd.*, Essex, UK

Fuglsang, C.C., Johansen, C., Christgau, S. and Adler-Nissen, J. (1995) Antimicrobial enzymes: Applications and future potential in the food industry. *Trends Food Sci. Tech.* **6**: 390-396.

Ganz, T. (1999) Defensins and host defense. *Science* **286**: 420-421.

Garcia-Olmedo F., Molina A., Alamillo J.M. and Rodriguez-Palenzuela, P. (1998) Plant defense peptides. *Biopolymers.* **47**: 479-491.

Garzillo, A.M.V., Di Paolo, S., Fenice, M., Petruccioli, M., Buonocore, V. and Federici, F. (1995) Production, purification and characterization of glucose oxidase from *Penicillium variable* P16. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **22**: 169-178.

Geisen, R. (1999) Inhibition of food-related pathogenic bacteria by *god*-transformed *Penicillium nalgiovense* strains. *J. Food Protect.* **62**: 940-943.

Geisen, R. (2000) *P. nalgiovense* carries a gene which is homologous to the *paf* gene of *P. chrysogenum* which codes for an antifungal peptide. *Int. J. Food. Microbiol.* **62**: 95-101.

Gomez-Angelats, M., Bortner, C.D. and Cidlowski, J.A. (2000) Cell volume regulation in immune cell apoptosis. *Cell Tissue Res.* **301**: 33-42.

Greenlund, L.J., Deckwerth, T.L. and Johnson, E.M. (1995) Superoxide dismutase delays neuronal apoptosis: a role for reactive oxygen species in programmed neuronal death. *Neuron* **14**: 303-315.

Hall, L.A. and Denning, D.W. (1994) Oxygen requirements of *Aspergillus* species. *J. Med. Microbiol.* **41**: 311-315.

Han, K.-H., Seo, J.-A. and Yu, J.-H. (2004) Regulators of G-protein signalling in *Aspergillus nidulans*: RgsA downregulates stress response and stimulates asexual sporulation through attenuation of GanB ($G\alpha$) signalling. *Mol. Microbiol.* **53**: 529-540.

Harder, J., Bartels, J., Christophers, E. and Schröder, J.-M. (2001) Isolation and characterization of human β -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J. Biol. Chem.* **276**: 5707-5713.

Hatzinikolaou, D.G., Hansen, O.C., Macris, B.J., Tingey, A., Kekos, D., Goodenough, P. and Stougaard, P. (1996) A new glucose oxidase from *Aspergillus niger*:

characterization and regulation studies of enzyme and gene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **46**: 371-381.

Hayashi, S. and Nakamura, S. (1976) Comparison of fungal glucose oxidases: chemical, physicochemical and immunological studies. *Biochim. Biophys. Acta.* **438**: 37-48.

Jaffari, S.A. and Turner, A.P.F. (1995) Recent advances in amperometric glucose biosensors for *in vivo* monitoring. *Physiol. Meas.* **16**: 1-15.

Jeong, D.K., Harrison, M.A., Frank, J.F. and Wicker, L. (1992) Trials on the antibacterial effect of glucose oxidase on chicken breast skin and muscle. *J. Food Saf.* **13**: 43-49.

Johansen, C., Falholt, P. and Gram, L. (1997) Enzymatic removal and disinfection of bacterial biofilms. *Appl. Env. Microbiol.* **63**: 3724-3728.

Kagan, B.L., Selsted, M.E., Ganz, T. and Lehrer, R. (1990) Antimicrobial defensin peptides form voltage-dependent ion-permeable channels in planar lipid bilayer membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 210-214.

Kaiserer, L., Oberparleiter, C., Weiler-Görz, R., Burgstaller, W., Leiter, É. and Marx, F. (2003) Characterization of the *Penicillium chrysogenum* antifungal protein PAF. *Arch. Microbiol.* **180**: 204-210.

Kalisz, H.M., Hecht, H.-J., Schomburg, D. and Schmid, R.D. (1991) Effects of carbohydrate depletion on the structure, stability and activity of glucose oxidase from *Aspergillus niger*. *Biochim. Biophys. Acta* **1080**: 138-142.

Kalisz, H.M., Hendle, J. and Schmid, R.D. (1997) Structural and biochemical properties of glycosylated and deglycosylated glucose oxidase from *Penicillium amagasakiense*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **47**: 502-507.

Kantt, C.A., Bouzas, J., Dondero, M. and Torres, J.A. (1993) Glucose oxidase/catalase solution for on-board control for shrimp microbial spoilage: model studies. *J. Food Sci.* **58**: 104-107.

Kantt, C.A. and Torres, J.A. (1993) Growth inhibition by glucose oxidase of selected organisms associated with the microbial spoilage of shrimp (*Pandalus jordani*): *in vitro* model studies. *J. Food Protect.* **56**: 147-152.

Keleti, T. (1985) Enzimkinetika. *Tankönyvkiadó*, Budapest

Kiess, M., Hecht, H.-J. and Kalisz, H.M. (1998) Glucose oxidase from *Penicillium amagasakiense*. Primary structure and comparison with other glucose-methanol-choline (GMC) oxidoreductases. *Eur. J. Biochem.* **252**: 90-99.

Kim, K.K., Fravel, D.R. and Papavizas, G.C. (1988) Identification of a metabolite produced by *Talaromyces flavus* as glucose oxidase and its role in the biocontrol of *Verticillium dahliae*. *Phytopathology* **78**: 488-492.

Lacadena, J., Martínez del Pozo, Á., Gasset, M., Patino, B., Campos-Olivas, R., Vázquez, C., Martínez-Ruiz, A., Mancheno, J.M., Onaderra, M. and Gavilanes, J.G. (1995) Characterization of the antifungal protein secreted by the mould *Aspergillus giganteus*. *Arch. Biochem. Biophys.* **324**: 273-281.

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* **227**: 680-685.

Laun, P., Pichova, A., Madeo, F., Fuchs, J., Ellinger, A., Kohlwein, S., Dawes, I., Fröhlich, K.-U. and Breitenbach, M. (2001) Aged mother cells of *Saccharomyces cerevisiae* show markers of oxidative stress and apoptosis. *Mol. Microbiol.* **39**: 1166-1173.

Leary, N.O., Pembroke, A. and Duggan, P.F. (1992) Improving accuracy of glucose oxidase procedure for glucose determinations on discrete analyzers. *Clin. Chem.* **38**: 298-302.

Lee, D.G., Shin, S.Y., Maeng, C.-Y., Jin, Z.Z., Kim, K.L. and Hahm, K.-S. (1999) Isolation and characterization of a novel antifungal peptide from *Aspergillus niger*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **263**: 646-651.

Lehrer, R.I. and Ganz, T. (2002) Cathelicidins: a family of endogenous antimicrobial peptides. *Curr. Opin. Hematol.* **9**: 18-22.

Liang, J.F., Li, Y.T. and Yang, V.C. (2000) Biomedical application of immobilised enzymes. *J. Pharm. Sci.* **89**: 979-990.

Ligr, M., Madeo, F., Fröhlich, E., Hilt, W., Fröhlich, K.-U. and Wolf, D.H. (1998) Mammalian Bax triggers apoptotic changes in yeast. *FEBS Lett.* **438**: 61-65.

Lindner, H., Sarg, B., Hoertnagl, B. and Helliger, W. (1998) The microheterogeneity of the mammalian H1(0) histone. Evidence for an age-dependent deamination. *J. Biol. Chem.* **273**: 13324-13330.

Madeo, F., Fröhlich, E., Ligr, M., Grey, S., Sigrist, S.J., Wolf, D.H. and Fröhlich, K.-U. (1999) Oxygen stress: A regulator of apoptosis in yeast. *J. Cell Biol.* **145**: 757-767.

Madeo, F., Herker, E., Maldener, C., Wissing, S., Lächlet, S., Herlan, M., Fehr, M., Lauber, K., Sigrist, S.J., Wesselborg, S. and Fröhlich, K.-U. (2002) A caspase-related protease regulates apoptosis in yeast. *Mol. Cell* **9**: 911-917.

Madi, L., Katan, T., Katan, J. and Henis, Y. (1997) Biological control of *Sclerotium rolfsii* and *Verticillium dahliae* by *Talaromyces flavus* is mediated by different mechanisms. *Phytopathology* **87**: 1054-1060.

Maródi, L., Forehand, J.R. and Johnston, R.B. (1991) Mechanisms of host defense against *Candida* species. II. Biochemical basis for the killing of *Candida* by mononuclear phagocytes. *J. Immunol.* **146**: 2790-2794.

Maródi, L., Korchak, H.M. and Johnston, R.B. (1991) Mechanisms of host defense against *Candida* species. I. Phagocytosis by monocytes and monocyte-derived macrophages. *J. Immunol.* **146**: 2783-2789.

Martin, E., Ganz, T. and Lehrer, R.I. (1995) Defensins and other endogenous peptide antibiotics of vertebrates. *J. Leuk. Biol.* **58**: 128-136.

Martínez del Pozo, Á., Lacadena, V., Mancheno, J.M., Olmo, N., Onaderra, M. and Gavilanes, J.G. (2002) The antifungal protein AFP of *Aspergillus giganteus* is an OB fold-containing protein that produces condensation of DNA. *J. Biol. Chem.* **277**: 46179-46183.

Martínez-Ruiz, A., Martínez del Pozo, Á., Lacadena, J., Mancheno, J.M., Onaderra, M. and Gavilanes, J.G. (1997) Characterization of a natural larger form of the antifungal protein (AFP) from *Aspergillus giganteus*. *Biochim. Biophys. Acta* **1340**: 81-87.

Marx, F. (2004) Small, basic antifungal proteins secreted from filamentous ascomycetes: a comparative study regarding expression, structure, function and potential application. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **65**: 133-142.

Marx, F., Haas, H., Reindl, M., Stöffler, G., Lottspeich, F. and Redl, B. (1995) Cloning, structural organization and regulation of expression of the *Penicillium chrysogenum paf* gene encoding an abundantly secreted protein with antifungal activity. *Gene* **167**: 167-171.

Meyer, J. N. and Nes, I. F. (1997) Ribosomally synthesized antimicrobial peptides: their function, structure, biogenesis and mechanism of action. *Arch. Microbiol.* **167**: 67-77.

Meyer, V. and Stahl, U. (2002) New insights in the regulation of the *afp* gene encoding the antifungal protein of *Aspergillus giganteus*. *Curr. Genet.* **42**: 36-42.

Meyer, V., Wedde, M. and Stahl, U. (2002) Transcriptional regulation of the antifungal protein in *Aspergillus giganteus*. *Mol. Genet. Genomics* **266**: 747-757.

Michael Salzet (2002) Antimicrobial peptides are signaling molecules. *TRENDS in Immunol.* **23**: 283-284.

Michael Zasloff (2002) Antimicrobial peptides in health and disease. *N. Engl. J. Med.* **347**: 1199-1200.

Mischak, H., Kubicek, C.P. and Röhr, M. (1985) Formation and location of glucose oxidase in citric acid producing mycelia of *Aspergillus niger*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **21**: 27-31.

Molnár, Zs., Mészáros, E., Szilágyi, Zs., Rosén, S., Emri, T. and Pócsi, I. (2004) Influence of *fadA*^{G203R} and *AflbA* mutations on morphology and physiology of submerged *Aspergillus nidulans* cultures. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **118**: 349-360.

Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**: 55-63.

Mousavi, S.A. and Robson, G.D. (2003) Entry into the stationary phase is associated with a rapid loss of viability and an apoptotic-like phenotype in the opportunistic pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Fung. Genet. Biol.* **39**: 221-229.

Murray, F.R., Llewellyn, D.J., Peacock, W.J. and Dennis, E.S. (1997) Isolation of the glucose oxidase gene from *Talaromyces flavus* and characterisation of its role in the biocontrol of *Verticillium dahliae*. *Curr. Genet.* **32**: 367-375.

Nakamatsu, T., Akamatsu, T., Miyajima, R. and Shio, I. (1975) Microbial production of glucose oxidase. *Agric. Biol. Chem.* **39**: 1803-1811.

Nakaya, K., Omata, K., Okahashi, I., Nakamura, Y., Kolkenbrock, H. and Ulbrich, N. (1990) Amino acid sequence and disulfide bridges of an antifungal protein isolated from *Aspergillus giganteus*. *Eur. J. Biochem.* **193**: 31-38.

Narasimhan, M.L., Damsz, B., Coca, M.A., Ibeas, J.I., Yun, D.-J., Pardo, J.M., Hasegawa, P.M. and Bressan, R.A. (2001) A plant defense response effector induces microbial apoptosis. *Mol. Cell* **8**: 921-930.

Nielsen, J. (1995) Physiological engineering aspects of *Penicillium chrysogenum*. Polyteknisk Forlag, Lyngby.

Oberparleiter, C., Kaiserer, L., Haas, H., Ladurner, P., Andratsch, M. and Marx, F. (2003) Active internalization of the *Penicillium chrysogenum* antifungal protein PAF in sensitive Aspergilli. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**: 3598-3601.

Ohashi, K., Natori, S. and Kubo, T. (1999) Expression of amylase and glucose oxidase in the hypopharyngeal gland with an age-dependent role change of the worker honeybee (*Apis mellifera* L.). *Eur. J. Biochem.* **265**: 127-133.

Osborn, R.W., de Samblanx, G.W., Thevissen, K., Goderis, I., Torrekens, S., van Leuven, F., Attenborough, S., Rees, S. and Broekaert, W.F. (1995) Isolation and characterisation of plant defensins from seeds of Asteraceae, Fabaceae, Hippocastanaceae and Saxifragaceae. *FEBS Letters* **368**: 257-262.

Petruccioli, M. and Federici, F. (1993) Glucose oxidase production by *Penicillium variabile* P16: effect of medium composition. *J. Appl. Bacteriol.* **75**: 369-372.

Pócsi, I., Sámi, L., Leiter, É., Majoros, L., Szabó, B., Emri, T. and Pusztahelyi, T. (2001) Searching for new-type antifungal drugs (An outline for possible new strategies). *Acta Microbiol. Immunol. Hun.* **48**: 533-543.

Popper, L. and Knorr, D. (1997) Inactivation of yeast and filamentous fungi by the lactoperoxidase-hydrogen peroxide-thiocyanate-system. *Nahrung* **41**: 29-33.

Rando, D., Kohring, G.-W. and Giffhorn, F. (1997) Production, purification and characterization of glucose oxidase from a newly isolated strain of *Penicillium pinophilum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **48**: 34-40.

Revol-Junelles, A.-M., Bousouel, N., Ramet, J.-P. and Milliere, J.-B. (2001) Antibacterial activities of lactoperoxidase systems (LPS) modified by Γ and IO_3^- anions. *Milchwissenschaft* **56**: 329-332.

Risso, A. (2000) Leukocyte antimicrobial peptides: multifunctional effector molecules of innate immunity. *J. Leuk. Biol.* **68**: 308-316.

Rosén, S., Yu, J.-H. and Adams, T.H. (1999) The *Aspergillus nidulans* *sfaD* gene encodes a G-protein β subunit that is required for normal growth and repression of sporulation. *EMBO J.* **18**: 5592-5600.

Rubino, L., Di Franco, A. and Russo, M. (2000) Expression of a plant virus non-structural protein in *Saccharomyces cerevisiae* causes membrane proliferation and altered mitochondrial morphology. *J Gen Virol.* **81**: 279-86.

Rusznák, Z., Forsythe, I.D., Brew, H.M. and Stanfield, P.R. (1997) Membrane currents influencing action potential latency in granule neurons of the rat cochlear nucleus. *Eur. J. Neurosci.* **9**: 2348-2358.

Rusznák, Z., Harasztosi, C., Stanfield, P.R. and Szűcs, G. (2001) An improved cell isolation technique for studying intracellular Ca^{2+} homeostasis in neurones of the cochlear nucleus. *Brain Res. Brain Res. Protoc.* **7**: 68-75.

Sagi, I. and Mannheim, C.H. (1990) The effect of enzymatic removal on quality of unpasteurized and pasteurized orange juice. *J. Food. Proc. Pres.* **14**: 253-266.

Sámi, L., Karaffa, L., Emri, T. and Pócsi, I. (2003) Autolysis and ageing of *Penicillium chrysogenum* under carbon starvation: respiration and glucose oxidase production. *Acta Microbiol. Immunol. Hun.* **50**: 67-76.

Selitrennikoff, C.P. (2001) Antifungal proteins. *Appl. Env. Microbiol.* **67**: 2883-2894.

Serrano, R. and Rodriguez-Navarro, A. (2001) Ion homeostasis during salt stress in plants. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **13**: 399-404.

Skulachev, V.P. (2000) Mitochondria in the programmed death phenomena; A principle of biology: „It is better to die than to be wrong”. *IUBMB Life* **49**: 365-373.

Skulachev, V.P. (2002) Programmed death phenomena: from organelle to organism. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **959**: 2104-237.

Som, T. and Kolaparthi, V.S.R. (1994) Developmental decisions in *Aspergillus nidulans* are modulated by ras activity. *Mol. Cell. Biol.* **14**: 5333-5348.

Stephenson, J. (2002) Researchers identify anti-HIV proteins. *Med. News and Perspect.* **288**: 1969-1970.

Swoboda, B.E.P. and Massey, V. (1965) Purification and properties of the glucose oxidase from *Aspergillus niger*. *J. Biol. Chem.* **240**: 2209-2215.

Szentesi, P., Collet, C., Sárközi, S., Szegedi, C., Jóna, I., Jacquemond, V., Kovács, L. and Csernoch, L. (2001) Effects of dantrolene on steps of excitation-contraction coupling in mammalian skeletal muscle fibers. *J. Gen. Physiol.* **118**: 355-375.

Taormina, P.J., Niemira, B.A. and Beuchat, L.R. (2001) Inhibitory activity of honey against foodborne pathogens as influenced by the presence of hydrogen peroxide and level of antioxidant power. *Int. J. Food Microbiol.* **69**: 217-225.

Terras, F.R.G., Eggermont, K., Kovaleva, V., Raikhel, N.V., Osborn, R.W., Kester, A., Rees, S.B., Torrekens, S., van Leuven, F., Vanderleyden, J., Cammue, B.P.A. and Broekaert, W.F. (1995) Small cysteine-rich antifungal proteins from radish: their role in host defense. *The Plant Cell* **7**: 573-578.

Theis, T., Wedde, M., Meyer, V. and Stahl, U. (2003) The antifungal protein from *Aspergillus giganteus* causes membrane permeabilization. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**: 588-593.

Thevissen, K., Cammue, B.P.A., Lemaire, K., Winderickx, J., Dickson, R.C., Lester, R.L., Ferket, K.K.A., van Even, F., Parret, A.H.A. and Broekaert, W.F. (2000) A gene encoding a sphingolipid biosynthesis enzyme determines the sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* to an antifungal plant defensin from dahlia (*Dahlia merckii*). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 9531-9536.

Thevissen, K., Ghazi, A., de Samblanx, G.W., Brownlee, C., Osborn, R.W. and Broekaert, W.F. (1996) Fungal membrane responses induced by plant defensins and thionins. *J. Biol. Chem.* **271**: 15018-15025.

Thevissen, K., Osborn, R.W., Acland, D.P. and Broekaert, W.F. (1997) Specific, high activity binding sites for an antifungal plant defensin on *Neurospora crassa* hyphae and microsomal membranes. *J. Biol. Chem.* **272**: 32176-32181.

Thevissen, K., Osborn, R.W., Acland, D.P. and Broekaert, W.F. (2000) Specific binding sites for an antifungal plant defensin from Dahlia (*Dahlia merckii*) on fungal cells are required for antifungal activity. *Mol. Plant Microbe Interact.* **13**: 54-61.

Thomma, B.P.H.J., Cammue, B.P.A. and Thevissen, K. (2002) Plant defensins. *Planta* **216**: 193-202.

Tiina, M. and Sandholm, M. (1989) Antibacterial effect of the glucose oxidase-glucose system on food-poisoning organisms. *Int. J. Food Microbiol.* **8**: 165-174.

Triantafilou, M. and Triantafilou, K. (2002) Lipopolysaccharide recognition: CD14, TLRs and the LPS-activation cluster. *TRENDS Immun.* **23**: 301-304.

Vágvölgyi, C. and Ferenczy, L. (1991) Isolation of nuclei from *Aspergillus nidulans* protoplasts. *FEMS Microbiol. Lett.* **66**: 247-251.

Williamson, D.H. and Fennell, D.J. (1979) Visualization of yeast mitochondrial DNA with the fluorescent stain "DAPI". *Methods Enzymol.* **56**: 728-33.

Witt, S., Singh, M. and Kalisz, H.M. (1998) Structural and kinetic properties of nonglycosylated recombinant *Penicillium amagasakiense* glucose oxidase expressed in *Escherichia coli*. *Appl. Env. Microbiol.* **64**: 1405-1411.

Witteveen, C.F.B., Veenhuis, M. and Visser, J. (1992) Localization of glucose oxidase and catalase activities in *Aspergillus niger*. *Appl. Env. Microbiol.* **58**: 1190-1194.

Yang, D., Biragyn, A., Kwak, L.W. and Oppenheim, J.J. (2002) Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal. *TRENDS Immunol.* **23**: 291-296.

Yang, D., Chen, Q., Chertov, O. and Oppenheim, J.J. (2000) Human neutrophil defensins selectively chemoattract naive T and immature dendritic cells. *J. Leuk. Biol.* **68**: 9-14.

Yun, D.-J., Zhao, Y., Pardo, J.M., Narasimhan, M.L., Damsz, B., Lee, H., Abad, L.R., D'Urzo, M.P., Hasegawa, P.M. and Bressan, R.A. (1997) Stress proteins on the yeast cell surface determine resistance to osmotin, a plant antifungal protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 7082-7087.

Zhang, L., Yu, W., He, T., Yu, J., Caffrey, R.E., Dalmaso, E.A., Fu, S., Pham, T., Mei, J., Ho, J.J., Zhang, W., Lopez, P. and Ho, D.D. (2002) Contribution of human α -defensin 1, 2 and 3 to the anti-HIV-1 activity of CD8 antiviral factor. *Science* **298**: 995-1000.

8. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények és előadások

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

(1) **Leiter, É.**, Marx, F., Pusztahelyi, T., Haas, H. and Pócsi, I. (2004) *Penicillium chrysogenum* glucose oxidase - a study on its antifungal effects. *J. Appl. Microbiol.* Közlésre elfogadva.

(2) **Leiter, É.**, Szappanos, H., Oberparleiter, C., Kaiserer, L., Csernoch, L., Pusztahelyi, T., Emri, T., Pócsi, I., Salvenmoser, W. and Marx, F. (2004) The antifungal protein PAF severely affects the integrity of the plasma membrane of *Aspergillus nidulans* and induces an apoptosis-like phenotype. *Antimicrob. Agents Chemother.* Közlésre benyújtva.

(3) Kaiserer, L., Oberparleiter, C., Weiler-Görz, R., Burgstaller W., **Leiter, É.** and Marx F. (2003) Characterization of the *Penicillium chrysogenum* antifungal protein PAF. *Arch. Microbiol.* 180(3): 204-10.

(4) Pócsi, I., Sámi, L., **Leiter, É.**, Majoros, L., Szabó, B., Emri, T. and Pusztahelyi, T. (2001) Searching for new-type antifungal drugs (An outline for possible new strategies). *Acta Microbiol. Immunol. Hun.* 48 (3-4): 533-543.

(5) Szappanos, H., Szigeti, Gy. P., Pál, B., Rusznák, Z., Szűcs, G., Rajnavölgyi, É., Balla, J., Balla, Gy., Nagy, E., **Leiter, É.**, Pócsi, I., Marx, F. and Csernoch, L. (2004) An antifungal peptide derived from *Penicillium chrysogenum* (PAF) with no toxic effects on mammalian tissues. *Naunyn Schmiedeberg's Arc. Pharmacol.* Közlésre benyújtva.

Egyéb közlemények

(1) **Leiter, É.**, Emri, T., Gyémánt, Gy., Nagy, I., Pócsi, I., Winkelmann, G. and Pócsi, I. (2001) Penicillin V production by *Penicillium chrysogenum* in the presence of Fe(III) and in low-iron culture medium. *Folia Microbiol.* 46(2): 127-132.

(2) Emri, T., **Leiter, É.** and Pócsi, I. (2000) Effect of phenoxyacetic acid on the glutathione metabolism of *Penicillium chrysogenum*. *J. Basic Microbiol.* 40(2): 93-104.

(3) Emri, T., **Leiter, É.**, Farkas, E. and Pócsi, I. (2001) Penicillin productivity and glutathione-dependent detoxification of phenylacetic and phenoxyacetic acids in *Penicillium chrysogenum*. *J. Basic. Microbiol.* 2: 73-76.

Előadások

(1) **Leiter, É.**, Pusztahelyi, T., Marx, F., Szappanos, H., Haas, H., Csernoch, L. and Pócsi, I. Isolation and characterisation of antifungal proteins from *Penicillium chrysogenum* liquid cultures. 14th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology, Balatonfüred, Hungary (2003)

(2) **Leiter, É.**, Pusztahelyi, T. and Pócsi, I. Investigation of a small antifungal protein from a submerged culture of *Penicillium chrysogenum*. 13th Congress of the Hungarian Society for Microbiology, Balatonfüred, Hungary (2001)

(3) **Leiter, É.**, Emri, T., Gyémánt, Gy., Nagy, I., Pócsi, I., Károlyi, A., Winkelmann, G. and Pócsi, I. Physiological effects of Fe(III) in shake flask *Penicillium chrysogenum* cultures under penicillin V producing conditions. "Biometals 2000" 2nd International Biometals Symposium, Tübingen, Germany (2000)

(4) **Leiter, É.**, Emri, T. and Pócsi, I. Effect of the Fe(III) transport on the antibiotic production of a high β -lactam producer *Penicillium chrysogenum* strain. 1th Hungarian Conference of Mycology, Budapest, Hungary (1999)

(5) Pócsi, I., Sámi, L., **Leiter, É.**, Majoros, L., Szabó, B., Emri, T. és Pusztahelyi, T. Új típusú antifungális szerek kutatása. Az 50 éves Magyar Mikrobiológiai Társaság 2001. évi Jubileumi Nagygyűlése, Balatonfüred (2001)

(6) Emri, T., **Leiter, É.**, Farkas, E. and Pócsi, I. Effect of the phenoxyacetic acid, phenylacetic acid and their derivatives on the glutathione metabolism and antibiotic production of *Penicillium chrysogenum*. 1st Joint Meeting of the Slovenian Society for Microbiology and the Hungarian Society for Microbiology, Keszthely (2000)

(7) Emri, T., **Leiter, É.**, Pócsi, I. and Szentirmai, A. Effect of phenoxyacetic acid on the glutathione metabolism of a high β -lactam producer *Penicillium chrysogenum* strain. First Hungarian Conference of Mycology, Budapest, Hungary (1999)

(8) Emri, T., **Leiter, É.**, Farkas, E. and Pócsi, I. Effect of the penicillin side-chain precursor phenoxyacetic and phenylacetic acids on the glutathione metabolism of a high β -lactam producer *Penicillium chrysogenum* strain. 7th International Fungal Biology Conference, Groningen, The Netherlands (1999)