

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

A *Penicillium chrysogenum* által termelt antifungális fehérjék

Leiter Éva

Debreceni Egyetem
Általános Orvostudományi Kar
2004

BEVEZETÉS

1. Kis móltömegű antifungális fehérjék

Az 1970-es évek óta egyre inkább növekszik az emberi mikrobiális fertőzések száma. Ez egyrészt 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, bázikus, széles hatásspektrumú fehérjék, amelyeket széles körben termelnek humán, emlős, gomba és növényi sejtek, illetve megtalálhatóak baktériumokban is (Pócsi és munkatársai, 2001; Marx, 2004).

A *Penicillium chrysogenum* fonalas gombából tisztított antifungális hatású fehérje (PAF) 55 aminosavból áll, 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 (ROS) 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).

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 koenzimmal rendelkezik, a reakció során két hidrogént von el a glükóztól, miközben saját maga redukálódik, majd a redukált forma molekuláris oxigénnel újra oxidálódik. A δ -lakton spontán hidrolizálódik D-glükonsavvá.

A GOX elterjedt a gombák körében, pl. *Aspergillus niger*, *Penicillium amagasakiense*, *P. notatum*, *P. glaucum*, *P. vitale* termelik.

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 amagasakiense*-ben és 30 mM *Aspergillus niger*-ben, míg a V_{max} 15,35 katkg⁻¹ *P. amagasakiense*-ben és 7,6 katkg⁻¹ *A. niger*-ben (Witt és munkatársai, 1998).

A GOX enzimatis aktivitása során termelődött H_2O_2 ugyanakkor antimikrobiális hatással rendelkezik. A méz antimikrobiális hatása a GOX által termelt H_2O_2 -ből származik (Taormina és munkatársai, 2001). *Helicoverpa zeaban* antibakteriális hatást okoz, ráadásul a GOX inaktiválja a növényi oxidatív enzimeket (pl. peroxidáz, polifenol oxidáz) (Eichenseer és munkatársai, 1999).

Az élelmiszeriparban több esetben is történtek kísérletek 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. 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), ráadásul a képződött H_2O_2 is teljesen

elbomlik, ami esetleg savasodást okozhatna a lipidek oxidációja miatt (Fuglsang és munkatársai, 1995), ezért tartósításra inkább ez utóbbi rendszer alkalmasabb.

CÉLKITŰZÉSEK

Mint ahogy a bevezetőben említettem, egyre több azoknak a mikroorganizmusoknak a száma, amelyek rezisztenciát fejlesztettek ki különféle antibiotikumokkal, sőt sok esetben a kombinált antibiotikus 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 fermentlévével *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 enzimről 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.)

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

1. A fehérjék tisztítása, jellemzése

Kísérleteinkben egy ipari penicillin-termelésben felhasznált, *Penicillium chrysogenum* (NCAIM 00237) törzs folyékony, rázatott, minimál táptalajon (2 % szacharóz és 0,3 % nitrát) felnövesztett tenyészeit használtuk. A fehérjék tisztítása 72 órás tenyészetből történt ultraszűrővel, ioncserés kromatográfiával vagy kromatofókuszálással, és gélszűrővel. A fehérjék tisztaságát SDS-PAGE gélen ellenőriztem (Laemmli, 1970). A GOX szekvenálását Edman-lebontással, a fehérje identifikálását az első 14 aminosav alapján protein-protein homológia-kereső program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) segítségével végeztük. A glükóz-oxidáz aktivitásának meghatározása módosított glükóz „rate assay”-vel történt (Leary és munkatársai, 1992). 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. Szubsztrátként D-glükózt, D-xilózt, D-fruktózt, D-galaktózt és D-arabinózt használtunk.

2. A fehérjék hatásspektrumának vizsgálata

Az antimikrobiális hatást Lee és munkatársai (1999) módszerét követve mikrotiter lemezen határoztuk meg. A tesztelt mikroorganizmusokat YPD tápközegben 12-14 órás korig felnövesztve 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.), 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 µl 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. A fehérjék hatásmechanizmusának vizsgálata

A PAF hiperpolarizációs hatását a szenzitív törzsekre di-8-ANEPPS feszültségérzékeny festékkel mutattuk ki és konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal (Zeiss, LSM 510; Zeiss, Jena, Germany) tanulmányoztuk. A PAF G-proteinnel kapcsolt hatásának kimutatására G-proteinben sérült mutánsokat (*Aspergillus nidulans fadA^{G203R}* és *A. nidulans ΔflbA*) és guanidin nukleotid analógokat (GTPγS, GDPβS és ATPγS) alkalmaztunk. A ROS detektálása *Aspergillus nidulans*ban 2',7'-dikloro-dihidrofluoreszcein diacetát festéssel (H₂DCFDA, Molecular Probes, Eugene, USA), a mitokondriumok kimutatása MitoTracker Green FM (Molecular Probes, Eugene, USA) fluoreszcens festéssel történt. A mintákat konfokális lézermikroszkóppal vizualizálták (Dr. Florentine Marx és munkacsoportja). Az apoptózis vizsgálatokhoz *Aspergillus nidulans* protoplasztokat állítottunk elő (Vágvölgyi és Ferenczy, 1991). Az apoptotikus markerek kimutatására Alexa Fluor 488 annexin V festést (a foszfatidil-szerin transzlokációjának kimutatására), DAPI festést és TUNEL festést (a DNS fragmentációjának kimutatására) alkalmaztunk. Ezenkívül a hifák szerkezetét transzmissziós elektronmikroszkóppal is vizsgálták (Dr. Florentine Marx és munkacsoportja). A PAF citotoxicitásának vizsgálata ezenkívül emlőssejteken történt.

A GOX esetleges lokalizációját *Aspergillus nidulans*ban immunfestéssel vizsgáltuk. A GOX/kataláz rendszerben a steady-state H₂O₂ koncentráció meghatározása a konszekutív enzimreakciókra vonatkozó számítások alapján történt (Keleti, 1985).

EREDMÉNYEK

1. A *Penicillium chrysogenum* kis móltömegű fehérjéje (PAF)

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

A PAF a szenzitív gombákon, így az általunk vizsgált *Aspergillus nidulans*on 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, több apoptotikus markert mutattunk ki PAF jelenlétében:

- a DNS fragmentációját,
- a sejtmagvak torzulását,
- a sejtmembránban található foszfatidil-szerin transzlokációját a membrán külső felületére,
- a sejtmembrán fodrosodását és mikrovezikulák, vakuólumok megjelenését (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 terápiás és mezőgazdasági növényvédelmi célokra.

2. A *Penicillium chrysogenum* glükóz oxidáza (GOX)

A *Penicillium chrysogenum* NCAIM 00237 törzs szacharóz és nitrát tápközegekben 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 µg/ml-es koncentrációban alkalmazva is hatékonynak bizonyult az élesztők és fonalas gombák széles spektrumával szemben, de a tesztelt gombák GOX-érzékenysége eltérő mértékű. A humán patogén *Candida* fajok növekvő szenzitivitást mutatnak a következő sorrendben: *C. albicans*≅*C. dubliniensis*<*C. parapsilosis*<*C. glabrata*≅*C. krusei*. Az *Aspergillus* fajok is eltérő mértékben érzékenyek a GOX-ra a következő sorrendnek megfelelően: *A. giganteus*<*A. niger*≅*A. terreus*<*A. nidulans*. 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 H₂O₂ koncentráció sem magyarázza a GOX nagy mértékű antimikrobiális hatását. Minden bizonnyal a két enzim az oldott oxigén gyors eliminálása révén olyan anaerob miliőt teremt, amely másodlagos antimikrobiális hatást eredményez.

IRODALOM

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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

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.

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

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.

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.

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 and Chemother.* **47**: 3598-3601.

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.

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.

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

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.

KÖZLEMÉNYEK

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 Arch 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, poszterek

(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)