

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

A BÉTA-LAKTAMÁZ ENZIM SZEREPÉNEK ÉS A BÉTA-LAKTÁM ANTIBIOTIKUMOK HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA A *STREPTOMYCES GRISEUS* NRRL B-2682-ES TÖRZSBEN

Készítette:

Dr. Bartalné Deák Eleonóra

Biológus, gyógyszerész



Témavezetők:

Dr. Penyige András

Egyetemi docens

és

Dr. Szabó István

Tudományos főmunkatárs

DEBRECENI EGYETEM
ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM
HUMÁNGENETIKAI INTÉZET

2004

Mindenkinek, akit szeretek....



Streptomyces telepek
(www.sanger.ac.uk)

TARTALOMJEGYZÉK

BEVEZETÉS	1. oldal
IRODALMI ÁTTEKINTÉS	2. oldal
A prokaryota differenciálódás	2. oldal
A <i>Streptomyces</i> -ek jelentősége	3. oldal
<i>A Streptomyces</i> -ek életciklusa	3. oldal
Szekunder metabolit termelés	6. oldal
<i>A S. griseus</i> differenciálódásának szabályozása	6. oldal
A baktériumok sejthatára	9. oldal
<i>A peptidoglikán sejtfa szerkezete</i>	10. oldal
<i>A peptidoglikán bioszintézise</i>	12. oldal
A béta-laktám antibiotikumok	15. oldal
A penicillin-kötő fehérjék (PBP)	17. oldal
A baktériumok lízise	19. oldal
A béta-laktám antibiotikumokkal szemben kialakuló rezisztencia	23. oldal
A béta-laktamáz enzim jellemzése	26. oldal
A béta-laktamáz enzim termelés és a sejtfa metabolizmus kapcsolata	29. oldal
ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	32. oldal
Baktérium törzsek	32. oldal
Táptalajok	32. oldal
Tenyésztési körülmények	33. oldal
<i>A S. griseus</i> NRRL B-2682 törzs tenyésztése	33. oldal
<i>A S. griseus spoI⁻, spo2⁻, spo3⁻</i> törzsek tenyésztése	34. oldal
Spóra szuszpenzió készítése	34. oldal
Gradient plate készítése	34. oldal
Agar diffúziós teszt kivitelezése	35. oldal
Enzimaktivitások meghatározása	35. oldal
<i>A béta-laktamáz aktivitás mérése a nitrocefin hidrolizisével</i>	35. oldal
<i>A D-aminopeptidáz enzim aktivitásának mérése</i>	36. oldal
<i>A glutamin szintetáz aktivitás mérése</i>	37. oldal
<i>A fehérje tartalom meghatározása</i>	37. oldal
Analitikai módszerek	39. oldal

<i>A S. griseus törzs béta-laktamáz enzimeinek tisztítása</i>	39. oldal
<i>SDS-poliakrilamid gélelektroforézis</i>	41. oldal
<i>Elektroblott technika</i>	42. oldal
Egyéb módszerek	43. oldal
<i>A béta-laktám antibiotikumok minimális inhibitor koncentrációjának meghatározása</i>	43. oldal
<i>A béta-laktamáz enzim szubsztrát profiljának meghatározása</i>	43. oldal
<i>A béta-laktamáz enzim gátlási profiljának vizsgálata</i>	43. oldal
<i>A béta-laktamáz inhibitorok K_I értékének meghatározása</i>	44. oldal
<i>Protoplasztok preparálása</i>	45. oldal
<i>Az autolitikus enzim aktivitásának mérése a S. griseus micéliumában</i>	46. oldal
<i>A membránpotenciál mérése fluoreszcens technikával</i>	46. oldal
<i>Fáziskontraszt mikroszkópos vizsgálat</i>	47. oldal
<i>Reprodukálhatóság</i>	47. oldal
<i>Felhasznált vegyszerek</i>	47. oldal
<i>Kutatási költségek finanszírozása</i>	47. oldal
EREDMÉNYEK	48. oldal
<i>A S. griseus NRRL B-2682 törzs élelciklusának jellemzése</i>	48. oldal
<i>A béta-laktamáz enzimtermelés alakulása a S. griseus vad típusú és nem spórázó mutáns törzsek élelciklusa során</i>	49. oldal
<i>A béta-laktamáz enzim tisztításához szükséges optimális tenyésztési körülmények meghatározása</i>	53. oldal
<i>A béta-laktamáz enzim indukálhatóságának vizsgálata</i>	55. oldal
<i>A S. griseus vad típusú törzs membránhoz kötött és szekretált, valamint a mutáns törzs membránba lokalizált béta-laktamáz enzimének izolálása</i>	56. oldal
<i>A S. griseus NRRL B-2682 törzsből izolált extracelluláris béta-laktamáz enzim N-terminális szekvencia meghatározása</i>	62. oldal
<i>A S. griseus vad típusú törzs membránhoz kötött és szekretált, valamint a mutáns törzs membránba lokalizált béta-laktamáz enzimének jellemzése</i>	64. oldal
<i>A globomycin hatása a S. griseus NRRL B-2682 törzs és a <i>spoI⁻</i> törzs béta-laktamáz enzim termelésére</i>	68. oldal
<i>A béta-laktamáz enzim termelés befolyásolása a S. griseus NRRL B-2682 törzsben</i>	71. oldal

A <i>S. griseus</i> NRRL B-2682 törzs morfológiai differenciálódásának befolyásolása szilárd felszínű tenyészetekben	74. oldal
Penicillin, Ac ₂ -L-Lys-D-Ala-D-Ala, az N-AcMur-L-Ala-D-isoglutamin (adjuváns peptid) és a tisztított és autolizinnel emésztett sejtfal fragmensek hatása a <i>S. griseus</i> NRRL B-2682 törzs differenciálódására folyadék tenyészetben	80. oldal
A béta-laktám antibiotikumok és ionofórok hatásának vizsgálata	83. oldal
A gramicidin D ionofór és a penicillin G hatása a <i>S. griseus</i> NRRL B-2682 törzs sejtfal turnover-ére és membránpotenciáljára	83. oldal
A penicillin G hatása a <i>S. griseus</i> NRRL B-2682 membránpotenciál-értékére	85. oldal
Az ampicillin és cephalosporin antibiotikumok hatása a <i>S. griseus</i> NRRL B-2682 protoplasztjainak $\Delta\Psi$ értékére	92. oldal
A penicillin G litikus hatásának potencírozása ionofór vegyületekkel	95. oldal
KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE	97. oldal
ÖSSZEFOGLALÁS	108. oldal
IRODALOMJEGYZÉK	109. oldal

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Penyige Andrásnak, hogy érdeklődésemet a téma felé irányította. Köszönöm a nélkülözhetetlen szakmai és emberi példamutatását, és a kísérleti eredmények értékelésében nyújtott értékes tanácsait.

Szeretném megköszönni Dr. Barabás György egyetemi tanárnak és Dr. Szabó Istvánnak, hogy lehetővé tették számomra a DEOEC Humángenetikai Intézetében a doktori munkám elkészítését.

Köszönet illeti Kálmáncz helyi Attilát, aki nélkülözhetetlen segítséget nyújtott a kromatográfiás, HPLC és FPLC technikák elsajátításában. Küzdelmes és nagyszerű éveket tölthettünk témavezetőnk, Dr. Penyige András mellett.

Köszönet illeti Dr. Matkó Jánost és Dr. Bodnár Andreát a spektrofluorimetriás mérések kivitelezésénél és értékelésénél nyújtott felbecsülhetetlen segítségéért.

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Gál Zsuzsának. Tőle tanultam az enzimkinetikai vizsgálati módszereket.

Köszönettel tartozom Dr. Szilágyi Istvánnénak, akitől megtanulhattam a *Streptomyces* törzsek tenyésztési technikáit, amelyek nagyon fontosak voltak a munkám során. Köszönöm a kísérleti munkámhoz nyújtott pótolhatatlan technikai segítségét.

A dolgozatban bemutatott ábrák szerkesztéséért és elrendezéséért csoporttársamat, Hollósi Simon Istvánt illeti köszönet.

Szeretném megköszönni családomnak a türelmüket és segítségüket.

BEVEZETÉS

Az antibiotikumok a fertőző betegségek kezelésének leghatékonyabb eszközei, azonban a sok éves antibiotikum használat kisselektálta a rezisztens törzseket. A penicillin és a cefalosporin antibiotikumokkal szemben létrejövő rezisztenciáért elsősorban a β -laktamáz enzim működése felelős, ezek a vegyületek hidrolizálják a β -laktám gyűrűt, hatástalanná téve az antibiotikumot. Az antibiotikumokkal szemben kialakuló rezisztencia a XXI. század elejére igen komoly probléma elé állította az antimikrobiális terápiát.

Egészen a 90-es évek elejéig úgy gondolták, hogy a β -laktamáz enzimek elsődleges és egyetlen szerepe az antibiotikumot termelő törzsekben a baktérium által termelt antibiotikummal szembeni saját rezisztencia biztosítása. A β -laktamáz enzim génje ugyanis, a többi rezisztencia génhez hasonlóan, az antibiotikum szintézisét végző génklaszterben található. Az antibiotikumot nem termelő törzsekbe géntranszferrel kerültek be a rezisztencia gének, ami szelekciós előnyt biztosított számukra. Az utóbbi évek tanulmányai azonban új megvilágításba helyezte a β -laktamáz enzimeket, azok szerepét. Az a felfedezés, hogy egyes β -laktamáz enzimek (pl. AmpC, AmpH) részt vesznek a peptidoglikán szintézisben és metabolizmusban, megerősíti azt a feltételezést, hogy egyes β -laktamáz családok sokkal fontosabb szerepet játszanak a morfogenezisben, mint azt korábban gondolták.

Munkánk során a következő feladatokat tűztük ki célul:

1. A β -laktamáz enzim termelés és lokalizáció vizsgálata a *Streptomyces griseus* NRRL B-2682 törzsben és ennek a nem spórázó, spontán mutáns *spoI⁻* törzsében.
2. A *S. griseus* NRRL B-2682 törzs és a *S. griseus spoI⁻* törzs β -laktamáz enzimének izolálása, az enzim jellemzése és N-terminális szekvenciájának meghatározása.
3. A β -laktamáz enzim esetleges fiziológiai szerepének tanulmányozása egy olyan törzsben, amely nem termel β -laktám antibiotikumot, és penicillinnel szemben nagymértékű rezisztenciát mutat. A *Streptomyces* törzseket a prokaryoták közötti szinte egyedülállóan bonyolult morfológiai változásokat mutató élelciklusuk a prokaryota differenciálódás tanulmányozásának kiváló modelljévé teszi. Külön érdekessé teszi az általunk vizsgált *S. griseus* törzset, hogy ez a törzs egy β -laktamáz inhibitor vegyületet is termel.

Bár a penicillint már a II. Világháború idején alkalmazták a fertőző betegségek gyógyításában, valójában az antibiotikum bakteriolitikus / baktericid hatása máig sem tisztázott.

A β -laktám antibiotikumok peptidoglikán sejtfa­l szintézisét gátló hatásának molekuláris mechanizmusa jól ismert, azt azonban nem tudjuk, hogy milyen mechanizmus útján okozzák a baktérium sejtek lízisét. Feltételezések szerint, a baktériumok sejt­lízisének kiváltásában egy fontos korai szignál a sejtmembránon keresztül kialakuló elektrokémiai-proton gradiens egyik komponensének, a membránpotenciálnak a változása. *Bacillus subtilis*-ban kimutatták, hogy azok az antibiotikumok és szétkapcsoló szerek, amelyek megváltoztatják a sejtmembrán ionokkal szembeni permeabilitását, azaz depolarizálják a $\Delta\Psi$ -t, az autolízist stimulálják és a sejtek halálát eredményezik (67,130). Ezen információk alapján feltételeztük, hogy a β -laktám antibiotikumok autolízist előidéző hatása mögött álló ismeretlen mechanizmus a sejtmembrán elektrofiziológiai állapotának β -laktámok hatására bekövetkező változása lehet.

Hipotézisünk bizonyítására két kísérleti rendszert dolgoztunk ki:

1. A β -laktám antibiotikumokkal és ionofór vegyülettel történő kezelésre bekövetkező bakteriolízis tanulmányozására.
2. Annak bizonyítására, hogy a sejtmembrán energia állapota fontos faktora az antibiotikum lítikus hatásának, kidolgoztunk egy módszert β -laktámoknak a sejtmembrán elektrofiziológiai állapotára való hatásának tanulmányozására a *Streptomyces griseus* NRRL B-2682 törzsben.

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A PROKARYOTA DIFFERENCIÁLÓDÁS

Az élőlények differenciálódását szabályozó mechanizmusok megismerése a biológia egyik igen érdekes és fontos feladata. Az eukaryota differenciálódás legismertebb tanulmányozott modelljei a *Saccharomyces*, *Drosophyla* és *Coenorhabditis* fajok, míg prokaryotákban a *Bacillus*, *Myxococcus* és a *Streptomyces* fajok életciklusáról áll a legtöbb információ a rendelkezésünkre. Kiemelkedő jelentőségűek ebből a szempontból a *Streptomyces*-ek, hiszen ezekben a baktériumokban sok, eddig csak eukaryota sejtekre jellemzőnek tartott szignáltranszdukciós folyamatban résztvevő fehérjét, pl. kináz és foszfatáz enzimeket, valamint munkacsoportunk által kimutatott GTP-kötő fehérjét és enzimeket találunk (117). A leggyakrabban vizsgált prokaryota modellekben (*Bacillus*, *Streptomyces*) a differenciálódási folyamat 2 részre osztható: a morfológiai differenciálódásra, ami a spóráképzés folyamatát foglalja magában, és a biokémiai differenciálódásra, amikor a szekunder metabolitok termelődnek. Mivel az antibiotikumok és egyéb szekunder metabolitok termelése életciklus

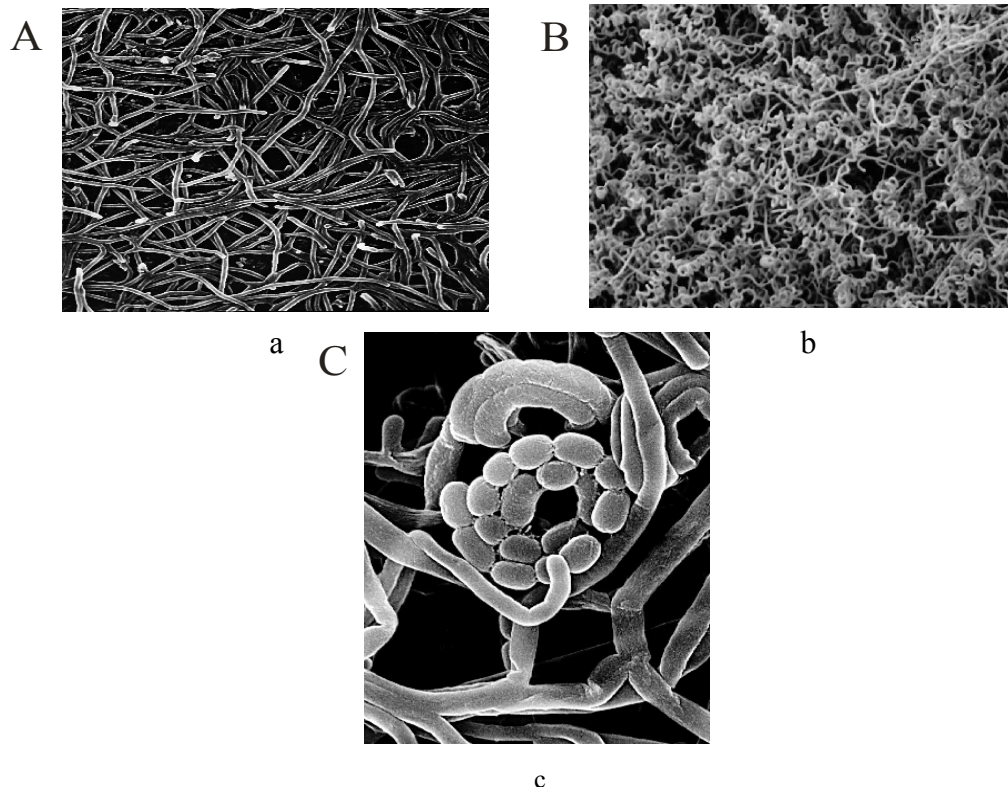
függő, ezért a morfológiai és a biokémiai differenciálódás korai szakasza feltehetően közös reguláció alatt áll (28). A differenciálódási folyamat megismerése tehát fontos információkkal szolgálhat a szekunder metabolit termelés szabályozásáról.

A STREPTOMYCESEK JELENTŐSÉGE

A *Streptomyces*ek Gram-pozitív, fonalas, talajlakó, obligát aerob, szaprofita, bonyolult morfológiai differenciálódási folyamattal rendelkező prokaryoták. A Gram-pozitív baktériumokat DNS-ük GC tartalma alapján egy alacsony és egy magas GC tartalmú csoportba soroljuk. A *Bacillus*, *Staphylococcus* és *Streptococcus* speciesek az előbbi, míg az Actinomycetes-ek az utóbbi csoportba tartoznak. Az Actinomycetes-eknek több, eltérő morfológiát mutató nemzetsége ismert, mint pl. a kettéosztódással szaporodó *Corynebacterium*-ok, a fonalas növekedésű, majd fragmentálódó *Mycobacterium*-ok és *Nocardia*-k, valamint a szintén fonalas növekedésű, de spóráképző *Streptomyces*-ek (40). Az Actinomycetes csoporton belül az Actinomycetales rend Streptomycetaceae családjába tartozó *Streptomyces* nemzetség az egyik legtöbbet tanulmányozott genus. Jelentőségüket nemcsak az általuk termelt farmakológiailag aktív anyagoknak (féreg ellenes, daganat ellenes szerek, a gyógyászatban használt antibiotikumok közel 80%-át ők termelik) köszönhetik, hanem az iparban és a mezőgazdaságban alkalmazott egyéb szekunder metabolitjaiknak és extracelluláris enzimjeiknek is. A *Streptomyces*-ek igen nagy számban fordulnak elő a talajban, ahonnan könnyen izolálhatóak. A talajban való széles elterjedésüket szaprofita életmódjuknak is köszönhetik, képesek megemészteni és hasznosítani számos relatíve stabil, oldhatatlan szerves polimert (cellulóz, kitin). Növekedésük során elágazó hifák szövedékét - micélium - hozzák létre, a hifák csúcsa behatol a talajba, ahol szekretált vagy sejtfelszínhez kötött enzimjeik segítségével lebontják a szerves molekulákat, így olyan tápanyagokat állítanak elő, amit a micélium képes felvenni, és metabolizálva azt biomasszává alakítani. Mivel extracelluláris enzimjeik, hidrolázaik révén részt vesznek a talaj szerves szennyeződéseinek lebontásában is, így még ökológiai szempontból is kiemelt fontosságúak (94). A *Streptomyces griseus* törzset 3 figyelemreméltó tulajdonsága emeli ki a többi *Streptomyces* fajok közül: 1. A streptomycin antibiotikumot (bár utóbbi időben kemoterápiás felhasználása háttérbe szorult) ebben a törzsben fedezték fel; 2. Ez a species, eltérően sok más *Streptomyces* genustól, folyadék kultúrában is képez spórákat, ezért a morfológiai differenciálódás folyamata könnyen vizsgálható (33); 3. A *S. griseus* termel egy kis molekulatömegű, diffúzibilis autoregulátor hatású vegyületet, az A-faktort, ez az extracelluláris szignál molekula szükséges a spóráképzéshez és a streptomycin termeléshez is (78).

A *Streptomyces*ek életciklusa

A *Streptomyces*-ek életciklusa eltérőnek mutatkozik, ha szilárd vagy folyékony táptalajon növesztjük a sejteket. A talajban, és mesterséges szilárd táptalajon az életciklus a spórák csírázásával kezdődik, a spórákból kifejlődő csíracsővekből apikálisan növekvő elágazó hifák jönnek létre, melyek szövedéke alkotja a vegetatív vagy szubsztrát micéliumot (1/a ábra) (20, 21). A micéliumban a hifák sejtjei citoplazma hidakon keresztül kapcsolatban állnak egymással, mivel a harántfalak csak a növekedés későbbi fázisában alakulnak teljesen ki. Az életciklus következő szakaszában a vegetatív micéliumból többszöri elágazás után a talajból kiemelkedő fehér színű lég- vagy reproduktív micélium jön létre (1/b ábra). A légmicélium gyorsan növekszik, a növekedéshez valószínűleg a szubsztrát micélium lízise során felszabaduló tápanyagokat hasznosítják (19, 21). A reproduktív micéliumban már záródnak a harántfalak, egy egy genomot tartalmazó kompartmentekre osztva így a légmicéliumot. A keresztfalak megvastagszanak, a sejtek szárazanyag tartalma megnő és a légmicélium csúcsán kialakuló sporangiumokban megjelennek a spórák (1/c ábra).



1. ábra: A *S. griseus* életciklusa szilárd táptalajon

Morfológiai differenciálódásban defektes, nem sporuláló mutáns törzsek analízise azt mutatja, hogy *Streptomyces*-ekben valószínűleg kevesebb spórázásra specifikus gén található, mint *Bacillus*-okban (21, 22). A morfológiai differenciálódás lépéseinek génszintű szabályozásáról a *S. coelicolor*-ban áll rendelkezésünkre a legtöbb információ (21, 22). A *S. coelicolor* differenciálódási mutánsainak két nagy csoportja ismert. Az egyik csoportba azok az ún. *bld* vagy kopasz mutánsok tartoznak, amelyek nem képeznek légmicéliumot, így természetesen spórákat sem. Közel 8-10 *bld* gén (*bld A,B,C,D,E,F,G,H,I*) ismert ebben a törzsben, a *bldA* gén terméke a ritka leucin kodon, az UUA tRNS-e (84, 86). Az ismert *bld* mutánsok a *bldB*, *bldI*, és *bldF* kivételével valamennyien kondicionális mutánsok, de egyikük sem csak a légmicélium képzésben defektes, hanem a szekunder metabolit termelésben is (95). A *bldA,D,G* és *H* kondicionális mutánsok glükózt tartalmazó táptalajon kopasz fenotípust mutatnak, mannit szénforrást hasznosítva már spóráznak, de csak a *bldH* törzsben áll vissza az antibiotikum termelés is ilyen körülmények között (21). A *bld* mutánsok normál növekedést mutatnak a vegetatív fázisban, feltételezhető, hogy a TTA kodonok hiányoznak a növekedéshez szükséges génekből. A szekunder metabolizmusban résztvevő regulátor és rezisztencia gének azonban gyakran tartalmaznak TTA kodonokat a *S. coelicolor*-ban, és más *Streptomyces* fajokban, a mutánsokban a TTA tripletteket tartalmazó gének expressziója gátolt (24). A *bldA* génnel homológ szakasz a *S. griseus* genomjában is kimutatható, ennek a génnek a mutációja a *S. coelicolor* kopasz mutánsához hasonló fenotípust eredményez ebben a törzsben (95). A spórázásban defektes mutánsok másik nagy csoportját *S. coelicolor*-ban az ún. *whi* mutánsok alkotják. Ezek a mutánsok képeznek ugyan fehér légmicéliumot, de ebből nem alakulnak ki a szürke, érett spórák. Eddig 8 *whi* lokuszt mutattak ki a kromoszómán, többségük a sporuláció korai szakaszában blokkolt (23).

A legtöbb *Streptomyces* faj laboratóriumi körülmények között tenyésztethető folyékony táptalajban is, a megfelelő oxigénellátás biztosításával (rázott tenyészet). Ebben az esetben más jellegű az életciklus, itt ugyanis még azon fajok esetében sem jön létre légmicélium, amelyek spóráznak folyadék tenyészetben, hanem a vegetatív micéliumból kialakult reproduktív micélium képez spórákat az életciklus végén.

Szekunder metabolit termelés

Az Actinomycetes-ek nagyon fontos szekunder metabolit termelő baktériumok, termékeik között sok fontos antibiotikumot, enzim inhibitor és daganatellenes szert is találunk. A *Streptomyces*-ek által termelt antibiotikumok többsége nem az aktív kolónianövekedés idején szintetizálódik, hanem akkor, amikor a sejtek növekedése lelassul. A szilárd felszínen növekedő telepek esetén ez az időpont egybeesik a légmicéliumok képzésével, folyékony kultúrában pedig az exponenciális fázisból a stacioner fázisba történő átlépéskor. Feltételezik, hogy az antibiotikum termelés ily módon történő időzítése segíti a termelő szervezetet a vele azonos ökológiai niche-ért kompetícióban lévő, "támadó" mikroorganizmusokkal szemben, amelyek egyébként elvonnák a gazdaszervezet elől a szubsztrát micélium lízisekor felszabaduló tápanyagokat (20).

Az antibiotikumok kémiaiag nagyon heterogén csoportot alkotó szekunder metabolitok. A kísérleteinkhez használt vad fenotípusú *S. griseus* törzsek az aminoglikozid típusú streptomycin antibiotikumot termelik. A streptomycin bioszintézisének szabályozása nagyon összetett, az általános regulációs hatások (a sejtek növekedési sebessége, a szén és nitrogénforrás típusa, a PO_4^{3-} mennyisége, a guanin nukleotidok koncentrációja) mellett pleiotróp regulátorok (56), és a StrR szabályozó fehérje működése is fontos tényezője a streptomycin termelésnek (122). Ezeken a regulátorokon kívül *S. griseus*-ban egy, a törzs által termelt hormonszerű autoregulátor, az A-faktor kontrollálja a génexpresszió szintjén a streptomycin termelését (58). (Az A-faktor hatását részletesen ismertetem egy következő fejezetben). A primer és a szekunder metabolizmus közti átkapcsolásért felelős fiziológiai és genetikai faktorok még nem teljesen tisztázottak.

A *Streptomyces griseus* differenciálódásának szabályozása

1. Gamma-butyrolakton, mint autoregulátor

Több mint 30 évvel ezelőtt, a *S. griseus* streptomycin antibiotikumot nem termelő és spórát nem képző pleiotróp mutánsait tanulmányozva fedezték fel az autoregulátor molekulát, az A-faktort. A legtöbb ismert, differenciálódási folyamatban defektes mutánsban, szintetikus A-faktor hozzáadásával visszaállítható a vad fenotípus, az antibiotikum termelés és a vele szembeni rezisztencia is. Az autoregulátor molekulát megtisztították, szerkezetét meghatározták mint-2-(6'-metil-heptanoil)-3R-hidroximetil-4-butanolidot, és szintetikusán is előállították (46,

77, 79). Az A-faktor az eukaryota hormonokhoz hasonlóan már kis, 10^{-9} M koncentrációban is kiváltja a streptomycin termelését, a streptomycin rezisztencia kialakulásához szükséges gének expresszióját, valamint a légmicélium képzést *S. griseus*-ban. Az A-faktor pleiotróp hatásához speciális receptor fehérjét igényel, így inkább mikrobiális hormonnak tekintjük (9, 56). Az A-faktor hatása életciklus függő, a közép exponenciális növekedési szakasz után adott exogén A-faktor már hatástalan, a nem termelő mutáns törzsben nem állítja vissza a vad fenotípust, a streptomycin termelést és rezisztenciát sem (56, 57, 58).

A sejtek konstitutívan termelik az A-faktort, így folyamatosan akumulálódva az A-faktor szenzitív fázis során elér egy kritikus koncentráció értéket, és a genetikai regulációs események meghatározott sorrendjét iniciálja. Az általunk vizsgált vad típusú *S. griseus* NRRL B-2682 törzsben az exponenciális növekedési fázis végéig az A-faktor kb. 100 nM végkoncentrációt ér el. Valószínű, hogy a szubsztrát micélium sejtjei által termelt A-faktor gyorsan szétdiffundál a szeptum nélküli hifákban és az extracelluláris térben, és szinkronizálja a telep sejtjeinek légmicélium képzését. Ilyen megközelítésben a rendszer működése az eukaryota hormonokkal mutat analógiát. A fonalas növekedésű *Streptomyces*-ek micéliumai elég közel vannak egymáshoz, így lehetséges, hogy az A-faktor szignál molekulaként szolgál a szomszédos fonalak kémiai kommunikációjában (60, 110). Az egész populáció egyöntetű, gyors sporulációja, amit a diffúzibilis endogén A-faktor indukál, előnyös lehet az ökoszisztémában való túléléshez. Az A-faktorhoz nagyon hasonló szerkezetű és szerepű molekulákat kimutatták egyéb *Streptomyces*, *Nocardia* és *Actinomyces* fajokban (49, 55, 56, 144).

2. Az A-faktor bioszintézise és hatásmechanizmusa

Az A-faktor glicerinnél és egy 10 szénatomos, béta-keto- sav intermedierből szintetizálódik. Az A-faktor termeléséért felelős gént, az *afsA*-t már azonosították (4), az enzim által katalizált pontos kémiai reakció azonban még nem ismert. Érdekes módon A-faktort nem termelő, spontán mutáns *S. griseus* törzseket, melyek nem képeznek légmicéliumot, és nem termelnek streptomycint sem, 1%-os gyakorisággal lehet izolálni. Az A-faktor termelés instabilitása az *afsA* gén lokalizációjával magyarázható. Az *afsA* gén ugyanis a lineáris kromoszóma végéhez közel helyezkedik el, ebben a régióban gyakran történik spontán delécio, ez a lokalizáció azonban ritka a *Streptomyces* speciesek között (87).

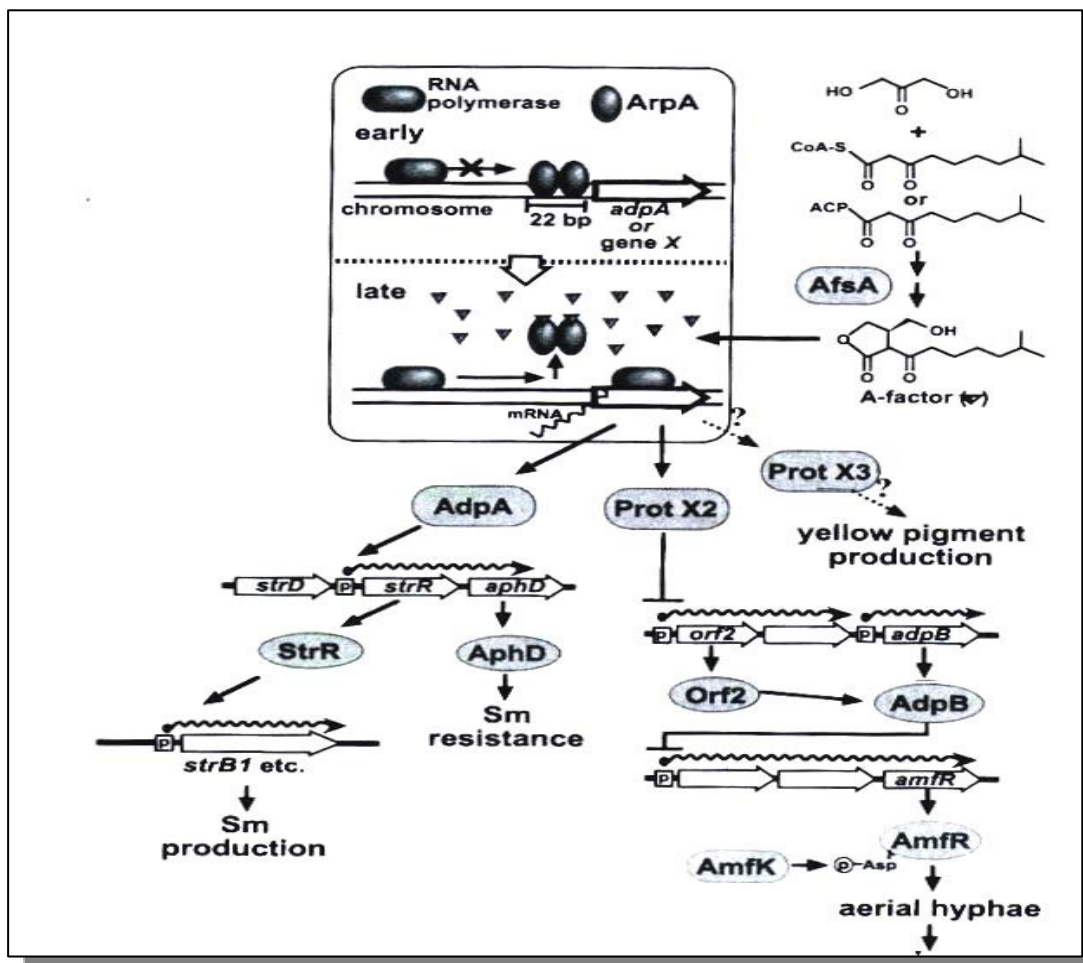
S. griseus törzs citoplazma frakciójából egy olyan 37 kDa molekula tömegű receptor fehérjét (ArpA) izoláltak, amely nagyon nagy affinitást mutat az A-faktorhoz, az A-faktort 1:1 arányban köti (96, 97). Az ArpA citoplazmatikus lokalizációja alátámasztja azt az elképzelést,

hogy az A-faktor sejtfelszíni receptorokhoz való kötődés nélkül, szabadon diffundál a hifákban és a szomszédos micéliumokba. Az ArpA a növekedés igen korai szakaszában keletkezik, és represszálja a streptomycin antibiotikum termelését és a spóráképzést is (97).

Az A-faktor felismerésétől a streptomycin termelésig és spóráképzésig vezető szabályozó mechanizmus nem azonos (2. ábra) (57). Az ArpA A-faktor hiányában egy 22 bázispárból álló palindrom szekvenciát ismer fel a DNS-en, és homodimer formában kötődik ehhez a konszenzus szekvenciához, megakadályozva így a transzkripció aktivátor *adpA* génnek az átírását (113). Az A-faktor intracelluláris koncentrációjának növekedésével az azt kötő ArpA ledisszociál a DNS-ről, megindítva így a differenciálódáshoz és az antibiotikum szintézishez szükséges szabályozó gének expresszióját.

Amint az ArpA leválik a DNS-ről, megkezdődik az *adpA* gén átírása, megjelenik a transzkripció aktivátor fehérje, az AdpA, ami az *strR* gén expresszióját aktiválja. Az *strR* gén terméke az StrR, az ún. útvonal-specifikus transzkripció aktivátor, ami ezután elindítja a streptomycin bioszintézisében résztvevő gének expresszióját (122). Az *strR*-rel kotranszkripcióra kerülő *aphD* a streptomycinnel szemben kialakuló rezisztenciáért felelős streptomycin-6-foszfotranszferáz enzimet kódolja (122).

Az A-faktor által kontrollált gének között eddig több olyan gént (*amfR*, *A*, *B*, *adsA*, *ssgA*, *ssfR*, *sgmA*) sikerült azonosítani, melyek az A-faktor szignált közvetítik a légmicélium- és spóráképzésért felelős génekhez. A-faktort nem termelő mutáns törzsbe nagy kópiaszámban klónozva ezeket a géneket, csak a vad fenotípust állítják vissza, az antibiotikum szintézist nem (137). Az *amfR* egy kétkomponensű szignál továbbító rendszer választ továbbító (response) regulátorát kódolja (138), és döntő szerepe van a légmicélium képzésében. Az AmfA és az AmfB az ATP függő szekréciós fehérjék Hly családjába tartozik (59). A légmicélium képzéséért felelős, eddig ismeretlen funkciójú *x2* gén szintén az ArpA kontrollja alatt áll. A *sgmA* egy olyan metalloendopeptidáz enzimet kódol, ami szerepet játszik a szubsztrátmicélium proteinjének lebontásában (74). Az *adsA* a légmicélium képzéshez szükséges egyik RNS-polimeráz szigma-faktorát kódolja (145, 146), az *ssgA* mutáns *whi* fenotípust mutat, az *ssfR* feltételezhetően szabályozó gén (66, 139, 146).



2. ábra: Az A-faktor által szabályozott útvonal. Ez a modell illusztrálja, hogyan szabályozza a pozitív A-faktor szignál a streptomycin bioszintézis időpontját és a légmicélium képzést.

A *Streptomyces* törzsek minden bizonnyal törzs specifikus receptor fehérje és gamma-butyrolakton autoregulátor rendszert használva fejlődtek ki. Egy ilyen rendszer hasznos a különböző kémiai szignálok megkülönböztetésében, megelőzve a téves kommunikációt az ökoszisztémában levő különböző *Actinomyces*-ek között.

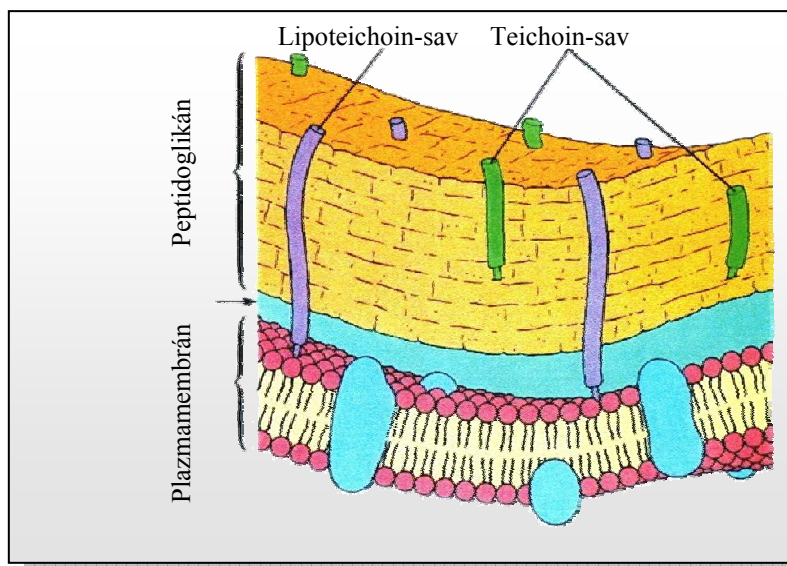
A BAKTÉRIUMOK SEJTHATÁRA

A baktérium sejteket körülvevő sejthatár permeabilitási és mechanikai barrierként működik. Védi a baktériumsejtet a külvilág káros hatásaival szemben, és lehetővé teszi a nagy belső ozmotikus nyomás fenntartását. A sejthatárnak egyben flexibilisnek is kell lennie, hogy biztosítsa a sejtosztódás és növekedés során bekövetkező morfológiai változásokat, illetve lehetővé tegye a baktériumsejtbe és onnan kifelé történő transzportfolyamatokat. A baktérium

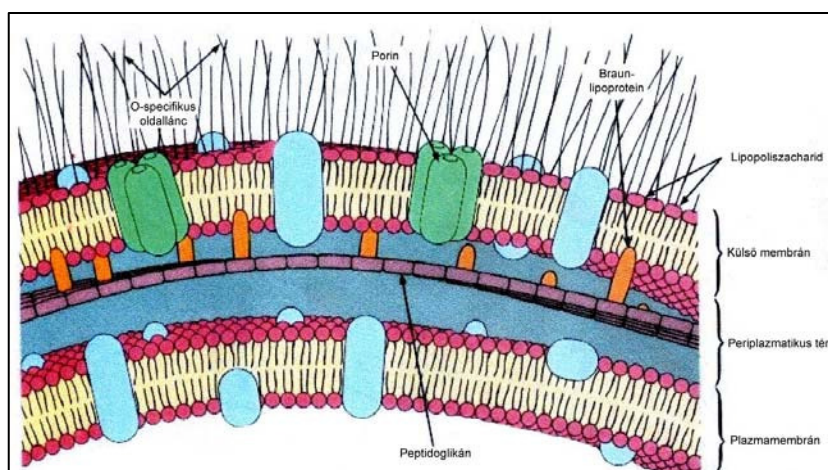
sejthatár e két fontos tulajdonságáért a sejthatár két fő építő komponense a felelős: a sejtfal és az abban található peptidoglikán a mechanikai integritást biztosítja, míg a citoplazma membrán permeabilitási barrierként szolgál.

A peptidoglikán sejtfal szerkezete

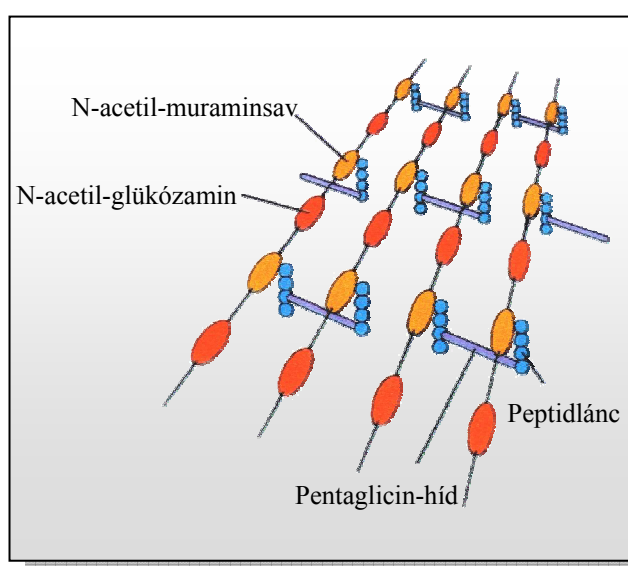
A baktériumok sejtfalát felépítő peptidoglikán egy specifikus szerkezetű, esszenciális makromolekula, ami a *Mycoplasma* fajok és néhány halofil törzs kivételével mindenütt megtalálható a prokaryota élőlények világában (37). Gram-pozitív baktériumokban a többrétegű peptidoglikán a citoplazma membránon kívül (3. ábra), míg Gram-negatív baktériumokban a többnyire egyrétegű peptidoglikán a periplazmatikus térben található (4. ábra) (35). Bár a peptidoglikán részletes kémiai szerkezete eltéréseket mutat, az alapfelépítés megegyezik a különböző baktériumokban. A glikán láncokat egymással alternáló, β -1-4 piranozid kötással kapcsolódó N-acetil-glükózamin (NAG) és N-acetil-muraminsav (NAM) molekulák építik fel (5. ábra). A glikán láncok NAM molekulájának D-laktil-karboxil csoportjához tetrapeptidek kapcsolódnak. A szomszédos glikán láncokhoz kötődő tetrapeptidek kovalens kötással kapcsolódnak egymáshoz penta-glicin peptid hidakon keresztül (5. ábra) (35). A tetrapeptid láncban, a természetben előforduló peptidek többségétől eltérően, a D-aminosavak találhatóak, illetve a glutamin a γ -karboxil csoportjával is részt vesz peptidkötés kialakításában. A tetrapeptid általános képlete: L-Ala- γ -D-Glu-L-R3-D-Ala, *S. griseus* esetében az L-R3 származék a diaminopimelinsav (DAP) (35). Az egyrétegű peptidoglikánban minden negyedik peptid hozhat létre keresztkötést két szomszédos láncsal, míg a többrétegű elrendeződésben szterikus okok miatt több kereszthíd létrejötte lehetséges. Ezért található több keresztkötés (70-90 %) a Gram-pozitív baktériumokban, mint a Gram-negatívokban (25-30 %) (35).



3. ábra: A Gram-pozitív baktériumok sejthatára



4. ábra: A Gram-negatív baktériumok sejthatára



5. ábra: A peptidoglikán struktúrája

A peptidoglikán bioszintézise

A peptidoglikán bioszintézise egy három szakaszból álló, a sejtben 3 különböző kompartmentben – a citoplazmában, a plazmamembránban és a sejtfalban – zajló komplex folyamatsor (6. ábra) (35).

I. szakasz:

Az első, intracelluláris szakaszban keletkezik a sejtfal alapegysége az uridin-difoszfát(UDP)-NAM-pentapeptid. Az első két lépésben az uridin-monofoszfát (UMP) és az UDP foszforilálódik ATP felhasználásával, a keletkező uridin-trifoszfát (UTP) az α -D-NAG-1P-tal reakcióba lépve UDP-NAG-ot hoz létre, ami a foszfoenol-piruváttal (PEP) kapcsolódva az UDP-NAG-3-piruvil-éterre alakul. A foszfonomycin antibiotikum a PEP szubsztrátanalógja, egy szulfhidril csoporttal kovalensen kötődik a fenti reakciót katalizáló transzferáz enzimhez és irreverzibilisen inaktíválja, megakadályozva így a az UDP-NAM keletkezését UDP-NAG-ból (1). A következő, redukciós lépésben kialakul az UDP-NAM. Az UDP-NAG és az UDP-NAM a glikán lánc aktivált építőkövei. Az UDP-NAM laktil csoportjához a 4. lépésben ATP felhasználásával sorrendben a következő aminosavak kapcsolódnak: L-Ala, D-Glu, *meso*-DAP és végül a már előzetesen létrejött dipeptid, a D-Ala-D-Ala, létrehozva így az UDP-NAM-pentapeptid prekuzort. A cikloserin antibiotikum, amely a D-Ala szerkezeti analógja, kompetitív inhibitora a D-Ala-D-Ala szintézisét katalizáló D-Ala racemáz illetve szintetáz enzimeknek, az enzimműködés gátlása a sejtfalszintézis károsodásához vezet (1).

II. szakasz:

Ebben a plazmamembránban zajló szakaszban az aktivált építőkövekből a β -1-4-NAG-NAM-pentapeptid egységek jönnek létre. A prekuzorokat a peptidoglikán bioszintézis egyik kulcsfontosságú komponense, az undekaprenil-foszfát (undPP vagy bactoprenol) membrán-lipid-karrier szállítja a membránon keresztül a polimerizáció helyére. Ez a hordozó molekula egy 11 izoprén egységből felépülő, C₅₅ izoprenoid alkohol, mely csak foszforilált állapotban funkcióképes (1).

A NAM-pentapeptid transzlokációja:

A transzfoszforilációs reakció során az UDP-NAM-pentapeptidről egy foszfo-NAM-pentapeptid kerül az undekaprenil karrierre, az UMP leválik és und-PP-NAM-pentapeptid keletkezik. A vancomycin és más glikopeptid antibiotikumok a pentapeptid D-Ala-D-Ala végződéséhez H-kötéssel kapcsolódva gátolja a polimerizációt és a további keresztkötések kialakítását (1).

A NAG transzlokációja:

A transzglykozidációs reakcióban az UDP-NAG NAG komponense kapcsolódik az und-PP-NAM-pentapeptidhez, így UDP és undekaprenil-PP-diszacharid-pentapeptid jön létre.

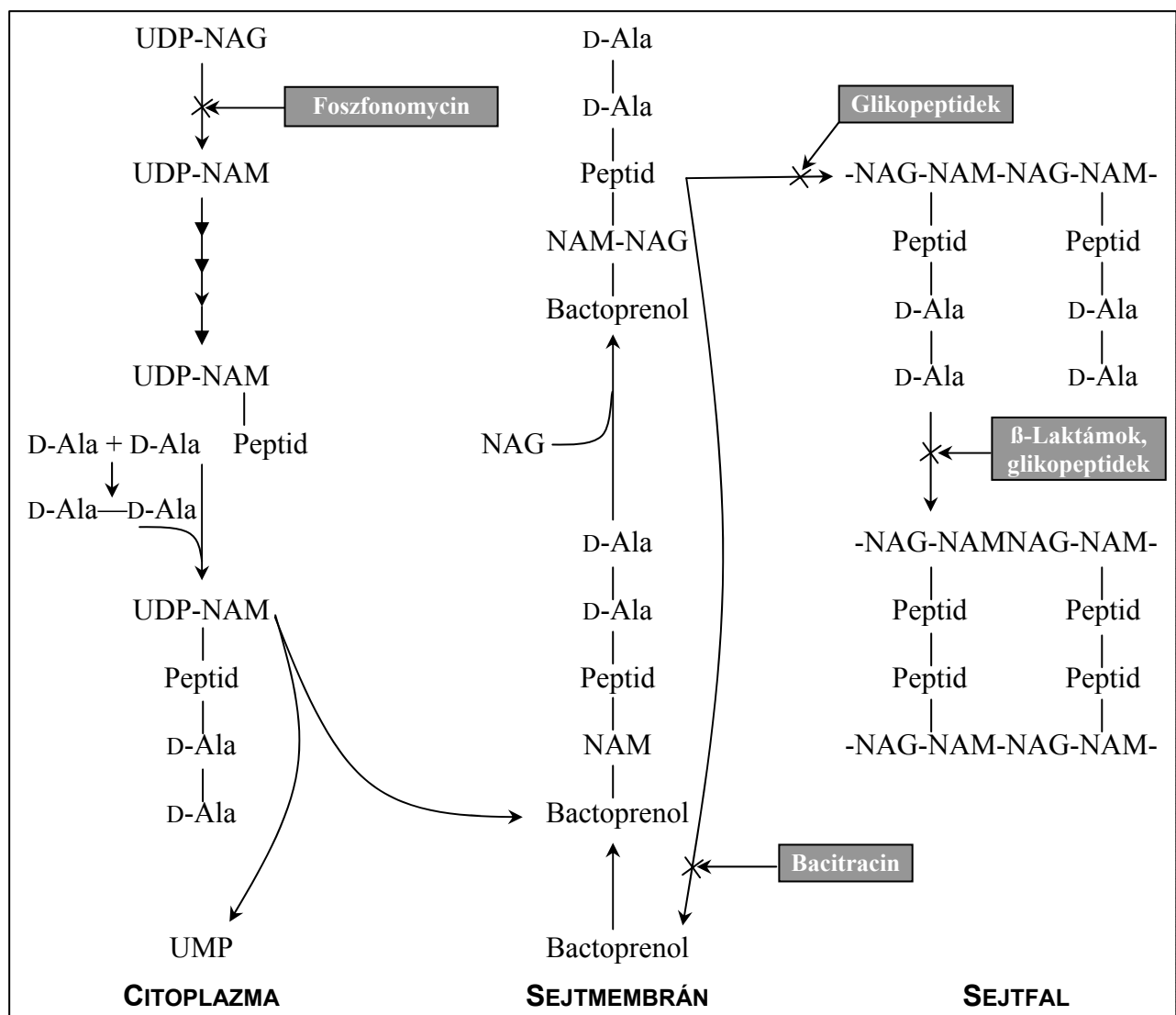
A diszacharid-pentapeptid egység transzlokációja:

A befejező lépésben az und-PP-karrierről a diszacharid-pentapeptid egység beépül a növekvő sejtfalba, ez a folyamat már a bioszintézis harmadik szakaszának bevezető lépése (35).

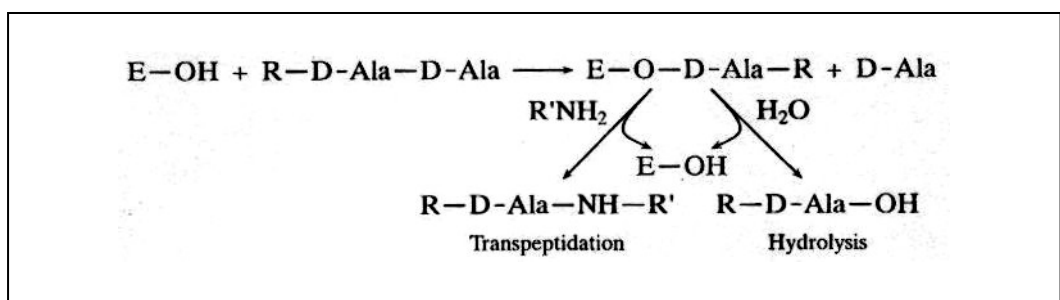
III. szakasz:

A diszacharid-pentapeptid egységek az und-PP lipid karrierről a már meglévő sejtfal egy akceptor csoportjához kapcsolódnak, így épülnek be a növekvő sejtfalba. Az akceptor feltételezhetően egy NAG nem redukáló vége. Ezt követően az undekaprenil-PP hordozó defoszforilálódik és P_i valamint undP, C_{55} izoprenoid alkohol keletkezik, s ez a karrier újabb diszacharid-pentapeptid egység szállításában vehet részt. A sejtfalszintézist gátló bacitracin antibiotikum az undekaprenil hordozó defoszforilálását végző foszfatáz enzim inhibitora (1). A prekursorok inszercióját követően, vagy azzal párhuzamosan alakulnak ki a peptidoglikán polimer glikán láncai közti keresztkötések. A glikán láncokhoz kapcsolódó peptideket pentaglicin hidak kötik össze, a keresztkötések kialakítását a DD-transzpeptidáz enzim katalizálja. A transzpeptidációs reakció hasonlít más, aktív centrumukban szerin aminosavat tartalmazó peptidázok működéséhez, acilációs és deacilációs lépést is magában foglal (7. ábra). A transzpeptidáció a *Streptomycesek* többségében a következő mechanizmus szerint megy végbe: a transzpeptidáz enzim lehasítja a donor pentapeptid terminális D-Ala-ját, a peptidkötés a donor peptid C-terminális D-Ala-ja és az akceptor peptid *meso*-DAP D-karbonil atomja között jön létre. A karboxipeptidáz enzim keresztkötések kialakítása nélkül hasítja le a terminális D-Ala-t, a keresztkötések számát tehát a transzpeptidáz/karboxipeptidáz aktivitás aránya határozza meg. A lehasadó D-Ala-t a baktérium felhasználja a peptidoglikán vagy a teichoinsav szintéziséhez (1).

A bioszintézis utolsó lépése a potenciális antibakteriális szerek egyik kedvelt célpontja, hiszen a citoplazma membrán külső felszínén megy végbe, így nem kell az antibiotikumnak a szelektív permeabilitású barrieren átjutnia. A penicillinek, cefalosporinok és egyéb β -laktám antibiotikumok a DD-transzpeptidáz enzim aktív centrumában levő szerint acilálják, stabil, kovalensen kötött acil-enzim intermediert képeznek, így gátolják ezen enzimek működését, és a sejtfalszintézist is (35).



6. ábra A peptidoglikán bioszintézise



7. ábra : A transzpeptidáció mechanizmusa

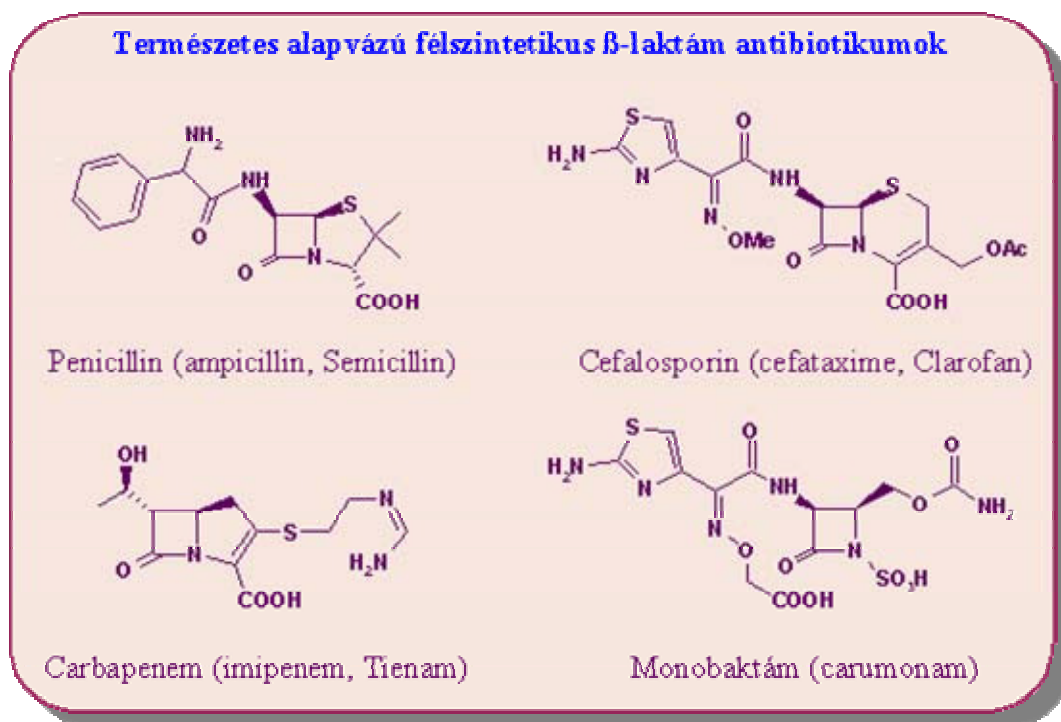
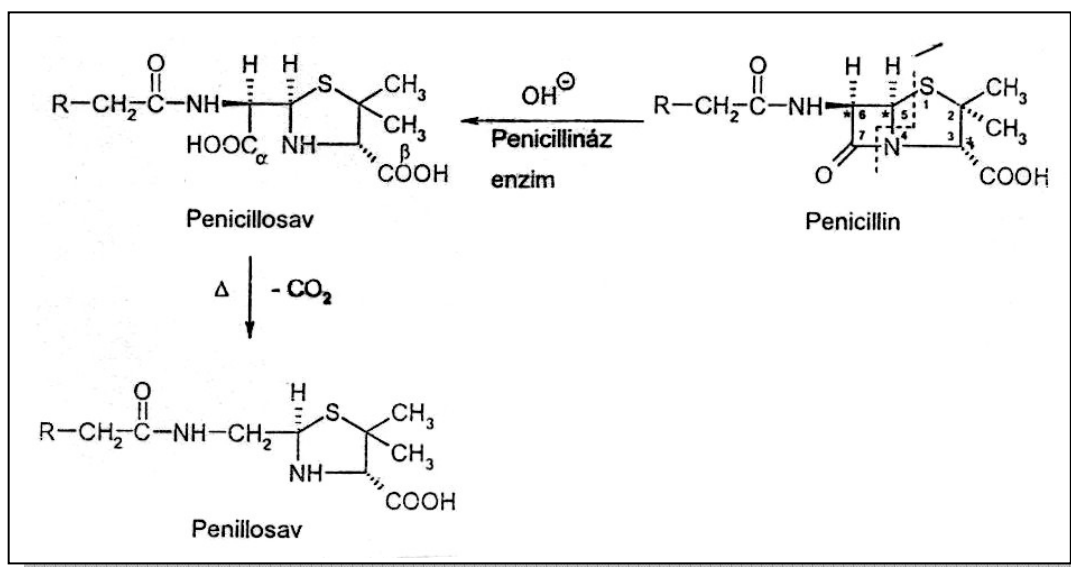
A β -LAKTÁM ANTIBIOTIKUMOK

A β -laktám antibiotikumok nevüket a négytagú β -laktám gyűrűjükről kapták, ami valamennyi ebbe a családba tartozó vegyületben megtalálható. Közismert, hogy a penicillin volt az első β -laktám antibiotikum, amit az 1940-es évektől kezdve széleskörűen alkalmaztak fertőző betegségek kezelésében.

A penicillint Sir Alexander Fleming brit bakteriológus fedezte fel 1928-ban. Megállapította, hogy az antibiotikus anyagot egy, a *Penicillium* családba tartozó penészgomba termeli, hatóanyagát ezért penicillinnek nevezte el. Felfedezése akkoriban nem keltett igazán nagy érdeklődést (51).

A penicillin izolálása a nagyfokú bomlékonysága miatt évekig eredménytelen volt, csak 1940-ben sikerült először Ernst Boris Chainnek, Howard Walter Floreynak és munkatársaiknak a penicillint tisztított és koncentrált formában előállítani. Kiderült, hogy a tenyészlében több, hasonló szerkezetű anyag van és ezek mind a 6-amino-penicillánsav származékai, a 6-amino-penicillánsav egy tiazolidin és egy β -laktám gyűrűből kondenzált biciklusos vegyület (131). A penicillinek tulajdonképpen a 6-amino-penicillánsav különböző savakkal acilezett származékai (8. ábra). A biológiai hatásért a penicillin alapváza a felelős, ha szerkezetében változás történik, akkor antibakteriális hatása elvész (131). A β -laktám antibiotikumokkal szemben kialakuló rezisztencia leggyakoribb típusa a β -laktamáz enzim termelésén alapul, a baktériumok által termelt β -laktamáz enzim a β -laktám antibiotikumok hatócsoportját, a β -laktám gyűrűt bontja el, ami a molekula hatástalanításához vezet (36) (9. ábra).

A penicillinen kívül a cefalosporinok, monobaktámok és carbapenémek tartoznak a β -laktám antibiotikumok családjába, melyek közös jellemzője a 3 C és 1 N atomból felépülő β -laktám gyűrű (131). A cefalosporinok a dihidrotiazin és a β -laktám gyűrűből kondenzált 7-amino-cefalosporánsav származékai (8. ábra). A monobaktám antibiotikumok egyetlen β -laktám-gyűrűből állnak, amelyhez hatásfokozó oldalláncok kapcsolódnak, első képviselőjük az aztreonám (8. ábra). A carbapenémek a S atom és az 5-tagú gyűrű kettős kötésének elhelyezkedésében különböznek a penicillintől (8. ábra) (35).

8. ábra A β -laktám antibiotikumok családja9. ábra : A β -laktám gyűrű bontása β -laktamáz enzimmel

Penicillineket és cefalosporinokat rengeteg mikroorganizmus termel, köztük a fonalas gombák, sok Gram-pozitív és néhány Gram-negatív baktérium. Ezekben a törzsekben a β -laktám antibiotikumok ugyanazon a bioszintetikus útvonalon keresztül szintetizálódnak, a szintézisben résztvevő gének a kromoszómán lokalizálódnak és koordináltan kerülnek expresszióra. Összehasonlító szekvencia analízisek a bioszintetikus gének nagyfokú szekvencia homológiáját bizonyították (2), közvetett bizonyítékok alapján feltételezik, hogy ezek a gének horizontális gén-transzferrel kerültek a baktériumokból a gombákba (2).

A β -laktám antibiotikumok növekvő baktériumokra kifejtett letális hatása egy nagyon komplex jelenség. Ezek az antibiotikumok kettős, *baktericid* és *bakteriolitikus* hatással is rendelkeznek. A baktérium tenyészet a penicillinnel való kezelés után röviddel elpusztul, míg a lízis egy lényeges lag-periódus után következik be. A penicillin növekedési fázistól függő hatást mutat, csak az exponenciális növekedési szakaszban levő sejteket pusztítja el. Amint a baktérium belép a stacioner fázisba, a baktériumsejtek túl tudják élni a penicillinnel való kezelést. Terápiás, baktericid hatásuk alapja, hogy gátolják a peptidoglikán sejtfa szintézisét. A sejtfa szintézis gátlásának molekuláris mechanizmusa jól ismert, a β -laktám antibiotikumok inaktíválják a sejtfa szintézisének utolsó lépéseit katalizáló, a peptidoglikán lánc aminosav oldalláncai közti keresztkötéseket kialakító transzpeptidáz enzimet. A penicillinek a peptidoglikán molekula D-Ala-D-Ala részével mutatott konformációs hasonlósága alapján kötődnek a transzpeptidáz enzimhez, acilálják az enzim aktív centrumában levő szerin aminosavat, stabil, kovalensen kötött acil-enzim intermediert képezve (35, 36, 53, 54, 121, 148). Azonban ezen antibiotikumok bakteriolitikus hatása még máig is tisztázatlan. A β -laktám antibiotikumok kötődnek más, a peptidoglikán szintézisében résztvevő ún. penicillin-kötő fehérjékhez (PBP) is.

A PENICILLIN-KÖTŐ FEHÉRJÉK

A β -laktám antibiotikumokat kovalensen kötő fehérjék két nagy csoportba sorolhatóak: a peptidoglikán szintézisében résztvevő esszenciális penicillin-kötő fehérjék (PBP), és a β -laktamáz enzimek (36). A PBP-nek molekulatömegük alapján két osztályát különböztetjük meg: a kis molekulatömegű (LMW-PBP) és a nagy molekulatömegű (HMW-PBP) penicillinkötő fehérjéket (36).

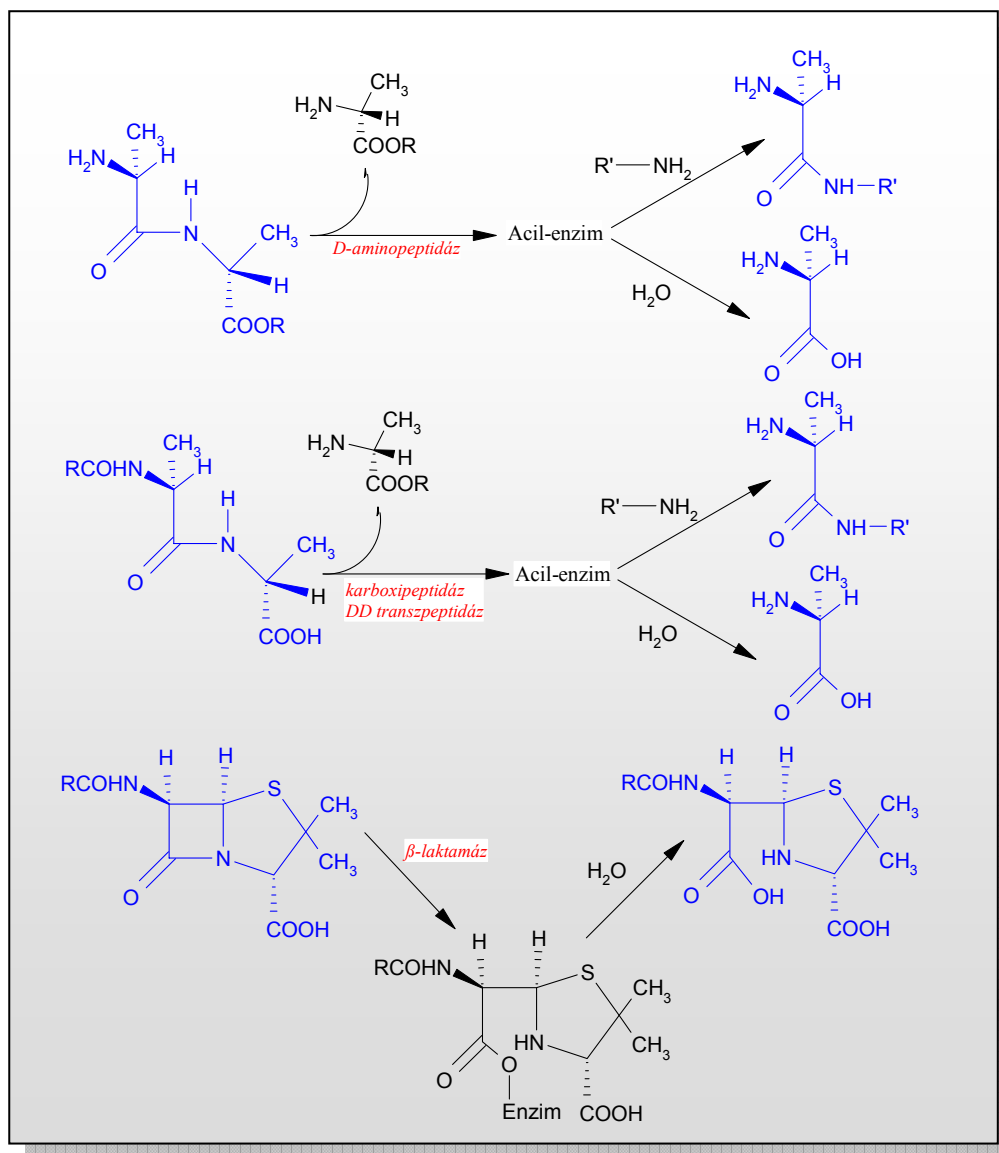
LMW-PBP jellemzése:

A LMW-PBP-ek lehasítható szignál peptiddel kezdődve szintetizálódnak, általában a C-terminális amfifil hélixszel rögzülnek a plazmamembránhoz vagy kiválasztódnak az extracelluláris térbe. *In vitro* többnyire DD-karboxipeptidázként és/vagy transzpeptidázként funkcionáló enzimek, amelyek aktív centrumában szerin aminosav található. A D-Ala-D-Ala végződésű peptidek, így a nascent peptidoglikán pentapeptid prekursorjainak C terminális végén levő D-Ala-D-Ala közti peptidkötést hidrolizálják (7. ábra). Az enzimek működése a sejt növekedése során a peptidoglikán szerkezetének átalakításában és a keresztkötések számának szabályozásában fontos (37).

HMW-PBP jellemzése:

A HMW-PBP-ek nem preproteinként szintetizálódnak, a plazmamembránhoz az N-terminálison levő hidrofób szignál peptiddel kapcsolódnak. Ezek a fehérjék a szomszédos peptid oldalláncok közötti keresztkötések kialakításáért felelősek. A két funkcionális doménnel rendelkező fehérjéknek az N-terminális domén sajátosságai alapján A és B alosztályát különböztetik meg (32). Mindkét alosztályba tartozó PBP-nek a C-terminális régiója felelős a transzpeptidáz aktivitásért, az enzimnek ez a része köti a penicillin antibiotikumot. Az A alosztályba tartozó PBP-nek az N-terminális doménje a glikánlanc elongációját is katalizálja. A B alosztályba tartozó PBP-k N-terminális doménje feltehetően intramolekuláris chaperonként a C terminális régió foldingjában segít (39). A HMW-PBP-nek esszenciális szerepük van a morfogenezisben, a sejtosztódás során a szeptum képzéséhez szükségesek (88, 147).

Egy újabb csoportosítás szerint a penicillint felismerő fehérjék egy olyan szupercsaládot alkotnak, amelybe a következő enzimek sorolhatóak be: β -laktamázok, D-Ala-karboxipeptidázok és D-aminopeptidázok (7). Ennek a csoportosításnak az az alapja, hogy ezek az enzimek hasonló reakciót katalizálnak vizes közegben (10. ábra), aktív centrumukban szerin aminosav található, D-aminosavat tartalmazó peptidek a szubsztrátjaik, és β -laktám szerkezetű vegyületekkel valamint N,N-diacetil-L-Lys-D-Ala-D-Ala-val gátolható a működésük. A β -laktamázok és a DD-karboxipeptidázok az N-terminálison D-Ala-D-Ala származékot hordozó peptidekkel szemben is aktívak, de a D-aminopeptidázoknak nem szubsztrátjai ezek a molekulák (6,7).



10. ábra: A D-aminopeptidáz, a DD-karboxipeptidáz és a β-laktamáz enzim által katalizált reakciók

A BAKTÉRIUMOK LÍZISE

Több mint 70 évvel a felfedezése után a penicillin bakteriolitikus hatásának mechanizmusa még mindig nem tisztázott. A penicillin lítikus hatását magyarázó első hipotézis Tippetől és Stromingertől származik. Feltételezték, hogy a β-laktám antibiotikumok sejtfalszintézist gátló hatása következtében úgy meggyengül a sejtfal, hogy nem bírja el a rá nehezedő ozmotikus és mechanikai nyomást, s ez vezet a sejtek líziséhez (133). Ez a magyarázat éveken keresztül elfogadott volt, amíg be nem bizonyították, hogy a penicillin indukált lízis enzimműködés következménye (124, 134).

A bakteriolízis feltételezhetően az autolitikus enzimek szabályozatlan működésének az eredménye. A sejtfal autolizinek endogén enzimek, amelyek a peptidoglikán réteg specifikus kötéseit bontják. Ismerünk N-acetilmuramidáz, N-acetilglükózaminidáz, NAM-L-Ala-amidáz és peptidáz autotolizineket (54, 127). A legtöbb tanulmányozott baktériumban több, különböző aktivitású peptidoglikán hidroláz enzim is megtalálható (30, 54, 72, 127).

Mivel az autolizinek jelen vannak a gyorsan osztódó sejtekben, feltételezik, hogy fontos szerepük lehet a baktériumok életsiklusa során (128). Az autolizineknek a következő fiziológiai folyamatokban tulajdonítanak szerepet: 1. Akceptor helyet biztosítanak az új prekursor beépüléséhez a murein molekulában. 2. Lehetővé teszik az új prekursor biztonságos inszercióját a "make before break" stratégiának megfelelően (54). 3. Az előzetesen elkészült sejtfal átépítése/átalakítása. 4. A sejtosztódás során biztosítják az utódsejtek szétválását. 5. A peptidoglikán sejtfal turnover-ében és újra-hasznosításában. 6. A spóráképzésben és a csírázás során (54).

A baktériumsejt növekedése során a sejtfal integritását a peptidoglikán szintézis és lebontás közti dinamikus egyensúly biztosítja. Mivel az autolitikus enzimek a polimer teljes degradációjára képesek, ezeknek a potenciálisan szuicid enzimeknek a működése szigorúan kontrollált és a baktériumsejtek metabolikus folyamataival (növekedés, stringent response) is szinkronizált (13, 54, 135, 136). Az autolizinek szabályozása több szinten történik: 1. Transzkripciós szinten. 2. Az enzim sejtfelszínre történő transzportja során. 3. A szubsztrátjához való kötődés alatt. 4. Az enzim zimogén formájának proteolitikus hasításakor. 5. Endogén inhibitorok inaktíválhatják őket (34, 43, 54, 72, 103, 128).

A murein-szintetázok és hidrolázok szigorúan kontrollált aktivitásának biztosítására az enzimek komplexképzése lehet a legelőnyösebb. Kimutatták, hogy számos peptidoglikán hidroláz kapcsolatba lép penicillin-kötő fehérjékkel (PBP) (53, 72, 128), a PBP-kel történő komplex kialakításához a murein hidrolázoknak a peptidoglikán réteg megfelelő helyére kell kerülniük. Az autolizineknek többféle elhelyezkedése ismert: a sejtmembrán külső felszínéhez kapcsolódhatnak, közvetlenül kötődnek a peptidoglikán molekulában levő szubsztrátjukhoz (128, 140), illetve Gram-negatív baktériumokban a periplazmatikus térben helyezkednek el (72).

Eddig az volt az általánosan elfogadott nézet, hogy a β -laktámok által kiváltott bakteriolízis a peptidoglikán szintézis gátlásának indirekt következménye. A penicillin és egyéb rokon vegyületek lítikus hatását két hipotézis magyarázza. Az egyik elképzelés szerint a lízis egy morfogenetikai hiba következménye. A β -laktám antibiotikumok megszüntetik a sejtfal normális metabolizmusában közreműködő szintetikus enzimek és az endogén autolizinek, az endogén peptidoglikán hidrolázok kiegyensúlyozott normál működését. A hidrolázok kontrollálatlan

aktivitása következtében a peptidoglikán 3 dimenziós struktúrájának integritása és stabilitása megbomlik, az előzetesen elkészült sejtfalon kialakuló lyukakon keresztül a belső nagy turgor nyomás következtében a citoplazma membrán kitüremkedik, s ez vezet végül a sejt líziséhez (38, 62). Egy újabb elképzelés egy, a peptidoglikán hidrolázokat aktiváló mechanizmust feltételez (127, 128). Ez az elmélet a bakteriofágok által generált sejtlízis eredményeit felhasználva próbálja megmagyarázni a sejtfal lízis folyamatát. Tudjuk, hogy a bakteriofágok illetve a penicillin letális hatása megelőzi az általuk indukált lízis folyamatát, és a fágok illetve a penicillinek által indukált lízis gátlódik a stacioner növekedési fázisban. Ismert, hogy a bakteriofágok által iniciált lízis során a specifikus fág proteinek, a holinok, amelyek önmagukban nem mutatnak hidrolitikus aktivitást, aktiválják a gazdaszervezet autolitikus enzimjeit (41, 44, 89, 91). A holinok transzmembrán fehérjék, amelyek a sejtmembránban egy gyűrű alakú struktúrát alakítanak ki, és lehetővé teszik, hogy a murein hidrolázok hozzáférjenek a szubsztrátjukhoz, a peptidoglikánhoz (41, 89). A holinok működését velük homológ, ún. antiholin proteinek gátolják (141). A murein hidrolázok e regulátoraival erős homológiát mutató szabályozó fehérjéket találtak baktériumokban is, pl. a *Serratia marcescens* NucE fehérjéje holinként működik *E. coli*-ban (12). A holinok aktivitását szabályozó mechanizmusról nagyon kevés ismeret áll rendelkezésünkre, ám egy legutóbb megjelent közleményben egy olyan, a *lytS* és *lytR* gének által kódolt, kétkomponensű szabályozó rendszert írtak le *S. aureus*-ban, amely szerepet játszik a murein hidroláz enzimek aktivitásának regulációjában (10). A *LytS* és a *LytR* fehérjék az őket kódoló génekhez közel eső, két másik gén a *lrgA* és *lrgB* transzkripcióját aktiválják (15). Az *LrgAB* szekunder szerkezete a bakteriofágok holin / antiholin fehérje családjával mutat hasonlóságot. Az *lrgAB* operon a korai növekedési szakaszban alig expresszálódik, az *LrgA* fehérje a stacioner fázisba való belépéskor termelődik a legnagyobb mennyiségben. (43). Ezen ismeretek birtokában Bayles és munkatársai feltételezik, hogy az *LrgA* a holin / antiholin proteinekhez hasonló funkciót tölt be, szabályozva a baktérium murein hidroláz enzimjeinek, feltehetően valamilyen extracelluláris szignálra bekövetkező, a sejtfelszínre történő exportját. Az *lrgAB* régióban történő mutáció megnöveli a murein hidrolázok aktivitását. Bayles hipotézise szerint az *LrgA* fehérje, mint antiholin gátolja a murein hidrolázok sejtfelszínre történő transzportját, hasonlóan a λ fág S107 antiholinjához (10). Az *lrgA,B* homológjait különböző baktériumokban (*E.coli*, *B. subtilis*, *Pyrococcus. Furiosus*) is megtalálták (10). Egy legutóbb megjelent közleményben egy, az *lrgAB*-val homológ *cidAB* operont írtak le *S. aureus*-ban, ami a korai-exponenciális növekedési szakaszban expresszálódik, megnöveli az extracelluláris murein-hidroláz aktivitást és a penicillinnel szembeni érzékenységet (123). Mivel a *cidAB* gének terméke holinszerű struktúrát mutat, Bayless és munkatársai

feltételezik, hogy a CidAB fehérje holinként működik, és a *lrgAB* operon termékei gátolják működésüket (123).

A sejtfalszintézist gátló vegyületeken kívül számos egyéb tényező is indukálhat lízist, mint pl. a monovalens kationok, (K^+ , Li^+ , NH_4^+), tiocianátok, ozmotikus sokk, EGTA kezelés, míg a kétértékű kationok (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+}) gátolják azt (130). Kimutatták, hogy a sejtek energetikai állapota is fontos tényező az autolizinek működésének szabályozásában, *Bacillus subtilis*-ban az oxidatív foszforiláció és az elektron szállító lánc szétkapcsolása a baktériumsejt gyors líziséhez vezet (38, 67). Egyes nem tipikus tetraciklinek, amelyek megváltoztatják a baktériumsejtek membránpotenciálját, szintén lízist okoznak (112).

A metabolikusan aktív baktériumokban az elektron-szállítólánc működése következtében a citoplazma membrán két oldalán nagy proton gradiens, “ H^+ motiv force” (PMF) alakul ki. Az elektrokémiai proton gradiensnek két összetevője a membránon keresztüli feszültség különbség ($\Delta\psi$), azaz a membránpotenciál és a pH gradiens (ΔpH). Baktériumokban a sejtmembránon keresztül mérhető elektromos potenciál fő összetevője a pH gradiens. A citoplazma membrán energetizált állapota az anyagtranszporton és a sejtek energia állapotának fenntartásán kívül szerepet játszhat a környezetből származó stimulusok feldolgozásában és továbbításában, úgy, mint az eukaryota sejtekben (48). A baktériumok plazmamembránjának ezt, a szignál-transzdukcióban betöltött szerepét eddig még alig tanulmányozták.

Egy tipikus baktérium sejtben a membrán belső oldala kb. 100-200 mV-tal negatívabb a külsőhöz képest (48). Számos olyan anyag ismert, amely megváltoztatja a membránpotenciált, ezek közé tartoznak az ionofór vegyületek és a szétkapcsoló szerek is (48). A $\Delta\psi$ értékének csökkenése depolarizációnak, növekedése hiperpolarizációnak felel meg. Érdekes módon néhány újonnan közölt kísérleti eredmény arra utal, hogy a holin fehérjék konformációja szintén érzékeny a $\Delta\psi$ értékére, annak változására, ezért a membránpotenciál az autolitikus aktivitás potenciális regulátorának tekinthető (10, 99). Moreillon szerint, aki kimutatta, hogy a penicillinek által okozott sejtpusztulás és a lízis két különböző folyamat, penicillin jelenlétében a holin fehérjék léziókat hoznak létre a membránban, ami a membránpotenciál felborulását okozva a sejtek pusztulásához vezet (98). Ez a sejtpusztulás intakt sejtfal jelenlétében is végbemegy, bizonyítva, hogy a penicillinek letális hatásukat murein hidrolázok működése nélkül, a lízist megelőzve fejtik ki. Amint a baktériumsejtek belépnek a stacioner növekedési szakaszba, megnő az LrgA,B antiholin koncentrációja, s megakadályozza a holin fehérjék csatornaképzését a membránban, így a sejtek toleránsak maradnak penicillinnel szemben, s a „ H^+ -motiv force” sem változik meg (10).

A baktériumok membránpotenciáljának a mérésére számos technikát alkalmaznak, az optikai membránpotenciál próbák közül a cianin festékek a legszélesebb körben alkalmazott fluoreszcens molekulák (93, 104). Ez az ionos festék a Nernst egyenletnek megfelelően oszlik meg az extra- és intracelluláris kompartmentek között, így fluoreszcens intenzitása a sejtek membránpotenciáljával arányos (93). Ezeknek az optikai próbáknak igazi előnye, hogy a membránpotenciál értékében bekövetkező kis változásokra is nagyon érzékeny és azonnali választ adnak. A 3,3-dihexil-oxakarbocianin-jodid [DiOC₆(3)] is ezek közé a festékek közé tartozó kationos festék, fluoreszcens intenzitása nő a depolarizációval és csökken a hiperpolarizációval. (93). Napjainkban gyakran használják ezeket a fluoreszcens próbákat annak tanulmányozására, hogy milyen hatékonyak az egyes vegyületek a baktérium sejtekkel szemben (99, 104, 142, 148).

A β -LAKTÁM ANTIBIOTIKUMOKKAL SZEMBEN KIALAKULÓ REZISZTENCIA TÍPUSAI

Az antibakteriális kemoterápia a XX. századi orvostudomány egyik legjelentősebb eredménye. Amikor az 1940-es, 1950-es években megkezdtek az első antibiotikumok, mint pl. a penicillin klinikai használatát, valóságos csodagyógyszernek tartották. Penicillinekkal súlyos fertőző betegségeket, tbc-t, pneumónia-t tudtak kezelni, s így emberek ezreinek mentették meg az életét. Az 1950-es évekig elképzelhetetlennek tartották, hogy a baktériumok ellenállóak legyenek a terápiában használt antibiotikumok ellen. Bár E. P. Abraham és E. Chain már 1940-ben kimutattak egy, a β -laktám gyűrű hidrolízisét katalizáló enzimet, s előre jelezték az enzim esetleges interferenciáját az antibiotikum terápiával, felfedezésüknek senki sem tulajdonított jelentőséget. Ekkor még nem ismerték a különböző fajok közötti, species specifitás nélküli genetikai információ kicserélődésének mechanizmusait, a rezisztenciához vezető mutációk frekvenciája pedig igen alacsony volt. A penicillin bevezetése után néhány évvel azonban ismertté vált, hogy a baktériumok rezisztencia kialakulásával képesek reagálni az antibiotikumok hatására. A XXI. század elején szinte egy „orvosi katasztrófa”-val állunk szemben, a baktériumok a legtöbb, ellenük használt antibiotikummal szemben ellenállóak lettek. Az egyre szélesebb körben elterjedő rezisztencia azonban újabb nagy kihívást jelent a kutatók és a gyógyszerészek számára.

A mikroorganizmusok sokféle mechanizmussal képesek ellenállóvá válni az ellenük használt antibiotikumokkal szemben. Megállapíthatjuk, hogy a természetben előforduló antibiotikumokkal szembeni rezisztencia többnyire olyan gének működésének a következménye,

amelyeknek termékei: 1. hidrolizálják az antibiotikumot; 2. megváltoztatják a targetjét; 3. kipumpálják az antibiotikumot a baktériumsejtből (71). Egyes feltételezések szerint a rezisztenciagének évmilliókkal ezelőtt a talajlakó baktériumokban alakultak ki, hogy megvédjék magukat más, a talajban élő mikroorganizmus vagy a saját maguk termelt antibiotikumokkal szemben (14).

A β -laktám antibiotikummal szemben kialakuló rezisztencia típusai:

1. Az antibiotikum inaktiválása enzimatis hidrolízissel

A β -laktamáz enzim termelésén alapuló rezisztencia a β -laktám antibiotikumokkal szemben kialakuló rezisztencia leggyakoribb típusa. A baktériumok által termelt β -laktamáz enzim a β -laktám antibiotikumok hatócsoportját, a β -laktám gyűrűt bontja el, ami a molekula hatástalanításához vezet. A rezisztencia evolúciójában, ebben az esetben nagy szerepe van a mutációnak. A β -laktamáz génben bekövetkező egyszerű báziscserével az enzim megváltoztatja szubsztrátspecifitását, s így az oldalláncukban módosított β -laktám gyűrűt is képes hidrolizálni az enzim. Ilyen típusú rezisztencia különösen gyakori az *Enterobacteriaceae* családban. A β -laktamáz génnek feltehetően azért van sok mutáns változata, amelyeknek változatlan a hidrolitikus aktivitása, mert az enzimnek egyetlen aktív centruma van, és nem igényli egyéb kofaktorok közreműködését a katalitikus reakció során (71). A rezisztencia kivédésére megoldás lehet a β -laktám struktúranalóg β -laktamáz inhibitorok (klavulánsav, szulbaktám) alkalmazása a terápiában. Ezek a vegyületek nem baktericidek, de β -laktám struktúrájuk révén az enzim aktív centrumába kötődnek, s így megakadályozzák, hogy a β -laktamáz enzim elbontsa az antibiotikumot. Bár a β -laktamáz inhibitorok alkalmazása kiszélesítette az antimikrobás spektrumot, lehetővé téve néhány régebben használt antibiotikum (ampicillin) alkalmazását, mára újabb mechanizmust fejlesztettek ki a mikrobák a β -laktám - β -laktamáz inhibitor keverékkel szemben. A β -laktamázt kódoló kromoszómális gének duplikációja révén olyan magas β -laktamáz szintet érnek el, hogy az enzim csak egy részéhez kötődik a klavulánsav, a többi β -laktamáz inaktiválja az antibiotikumot.

2. Az antibiotikumot kötő fehérjéknek, a PBP-nek a módosulásával kialakuló rezisztencia

Néhány baktérium faj úgy válhat rezisztenssé a β -laktám antibiotikumokkal szemben, hogy módosul a sejtfalban levő targetjének, a PBP-nek (köztük a transzpeptidáz enzimnek) az

elsődleges szerkezete, s ennek eredményeképpen csökken vagy megszűnik az antibiotikum kötődésének lehetősége, így a penicillin nem tud kapcsolódni az enzimhez, és nem tudja kifejteni a hatását. A penicillinekkal szemben kialakuló rezisztencia ez a típusa általában azokban a baktériumokban fordul elő, amelyekben nem található meg a β -laktamáz enzim génje, kisebb gyakorisággal mind a Gram-pozitív (*Streptococcus*, *Enterococcus*), mind a Gram-negatív (*Hemophilus influenzae*, *Nisseria gonorrhoeae*) mikróbák között előfordul (14). A PBP által mediált rezisztencia ritkábban fordul elő, mint a β -laktamáz enzim termelődésén alapuló.

3. A baktérium membrán permeabilitás változásán alapuló rezisztencia

Az antibiotikumok enzimatis lebonása/módosítása, vagy az antibiotikum targetjének megváltoztatása a specifikus védelmi mechanizmusok közé tartozik. Ezek a mechanizmusok szelektívek az adott antibiotikumra illetve antibiotikum családra. Az antibiotikumokkal szembeni rezisztencia egy sokkal általánosabb típusa, amikor a biológiai membrán, mint permeabilitási barrier megakadályozza az adott molekula transzportját. A Gram-negatív baktériumokban általában a PBP-k csökkent affinitása mellett a külső membrán permeabilitásának a csökkenése is szerepet játszik a rezisztencia ilyen típusú kialakításában (52). A peptidoglikán sejtfaon kívül levő külső membrán nagyon speciális felépítésű, a külső oldalán olyan lipopoliszacharidokat (LPS) tartalmaz, amelyekben csak telített zsírsavak találhatók, az aszimmetrikus felépítésű külső membrán nagyon hatékony barrierként működik.

3. β -laktám antibiotikumokkal szemben kialakuló új típusú rezisztencia:

Pneumococcusokban mutatták ki, hogy a β -laktám antibiotikumok hatástalanításához vezető folyamatban különböző, nem PBP-ket kódoló gének is szerepet játszanak (42). *S. pneumoniae* cefotaxim rezisztens mutánsaiban a *ciaH* gén terméke (45), piperacillin rezisztens törzsekben a *cpoA* gén terméke hozzájárul a β -laktám antibiotikumokkal szembeni rezisztencia kialakításában (42). A *ciaH* és a *cpoA* allélok azokban a törzsekben közvetítik a rezisztenciát, amelyekben a PBP gének nem hordoznak mutációt. A CiaH egy hisztidin-protein-kináz, a CpoA funkciója ismeretlen. A CpoA olyan doméneket tartalmaz, amely a glikozil-transzferáz enzimekkel mutat homológiát (42). Az eredeti funkciója az, hogy a cukorszármazékokat szállítja a membránban levő akceptormolekulákhoz, amelyek végül a sejtmembrán külső felszínén lokalizálódnak. Grebe és munkatársai feltételezik, hogy a *cpoA* génekben bekövetkező

mutáció megváltoztatja a teichoinsav polimer szintézisét, így módosul a sejthatár, ami az antibiotikummal szemben kialakuló rezisztenciához vezethet (42).

A β -LAKTAMÁZ ENZIM JELLEMZÉSE

β -laktamáz enzimek megtalálhatóak mind a Gram-pozitív, és a Gram-negatív baktériumokban is. Ezen enzimek egyetlen közös tulajdonsága, hogy hidrolizálják a β -laktám antibiotikumok β -laktám gyűrűjét, antibakteriálisan inaktív penicilloesav származékot képezve így (9. ábra). A patogén baktériumok többségében a β -laktamáz enzim jelenléte a felelős a β -laktám antibiotikumokkal szemben kialakuló rezisztenciáért. Bár β -laktamáz enzimet a nem patogén mikroorganizmusok, köztük a *Streptomyces* fajok is termelnek. A β -laktamáz enzimeket a gén lokalizációja alapján két típusra lehet felosztani. A gyakoribb és epidemiológiai szempontból fontosabb az extrakromoszómálisan kódolt rezisztencia, hiszen a plazmidon kódolt gén könnyen átkerülhet egyik baktériumból a másikba, és így a rezisztencia igen gyorsan terjedhet. A másik típusú β -laktamáz enzim a baktérium kromoszómáján kódolt, ez jellemző a *S. griseus* 2682 törzsre is. A különböző antibiotikumokat termelő baktériumokban, a termelt antibiotikummal szemben kialakuló rezisztenciáért felelős enzimek génjei az antibiotikum bioszintézisét kódoló génklaszterben találhatóak a kromoszómális rezisztencia gének esetében (26, 120).

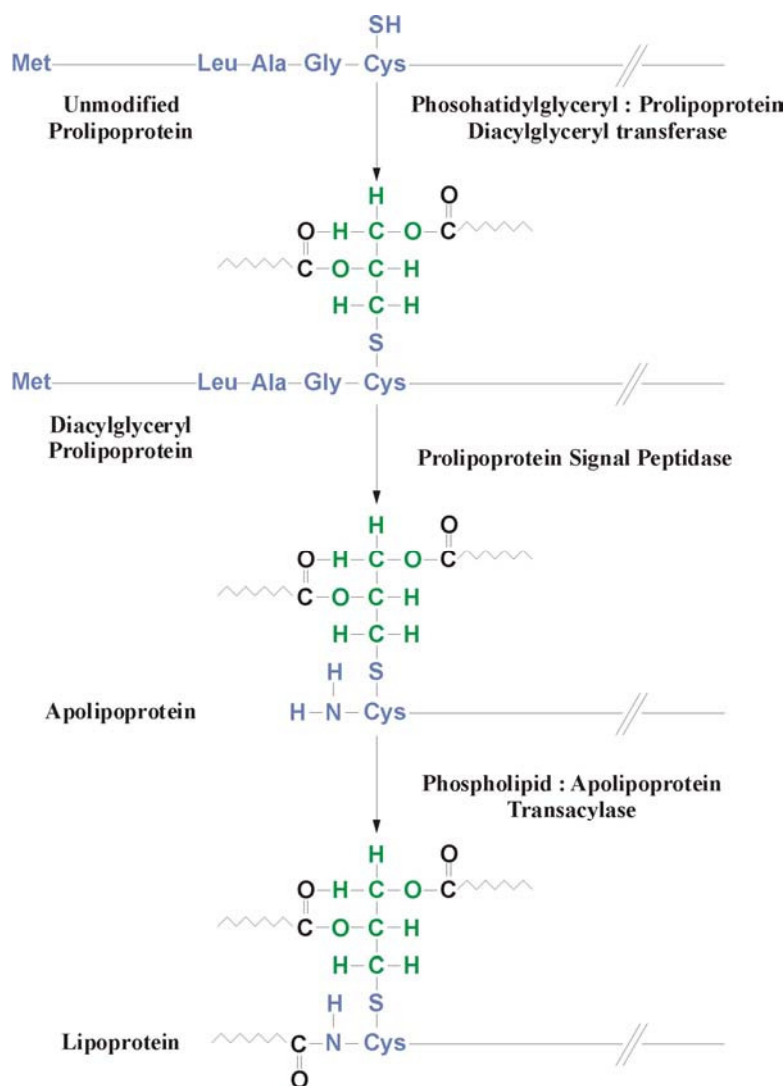
A β -laktamáz enzimeket szubsztrátspecifitásuk, molekulatömegük, valamint szekvencia homológia és evolúciós szempontok alapján 4 különböző osztályba soroljuk: A, B, C, D osztályba (25). Az A osztályba tartozó enzimek kb. 30000 Da molekulatömegűek, elsősorban penicillinekkal szemben aktívak és egymással szekvencia homológiát mutatnak. Ebbe az osztályba sorolhatóak például a Gram-pozitív organizmusok, *Bacillus licheniformis* és a *B. cereus* I típusú kromoszómán kódolt, szekretált penicillináz enzimei, a *Staphylococcus aureus* plazmidon kódolt enzime és a Gram-negatív *Escherichia coli* pBR322 plazmid kódolt penicillináz enzime. A B osztályba a Zn igényes, kb 23000 Da-os molekulatömegű, cefalosporinnal szemben aktív metallothioenzimek tartoznak, mint pl. a *B. cereus* II. típusú enzime. A C osztályba a Gram-negatív baktériumok, *E.coli*, *Pseudomonas aeruginosa* nagy, kb. 39000-es molekulatömegű, kromoszómán kódolt cefalosporináz enzimei sorolhatóak, míg a D osztály az oxacillint hidrolizáló enzimeket tartalmazza.

A legújabb rendszerezés a β -laktamáz enzimeknek a működésükre jellemző tulajdonságok alapján 4 nagy csoportját különbözteti meg. Az 1. osztályba azok a cefalosporináz

enzimek tartoznak, amelyek működését nem gátolja a klavulánsav. A 2. csoportot penicillináz, cefalosporináz és széles spektrumú β -laktamáz enzimek alkotják, közös jellemzőjük, hogy a β -laktamáz inhibitorok jó gátlószereik. Ide tartoznak a klasszikus A és D osztályú enzimek. A 3. csoportba azok a metalloenzimek sorolhatóak, amelyek hidrolizálják a penicillineket, cefalosporinokat és a karbapenemeket is, és a klasszikus β -laktamáz gátló vegyületek nem hatnak rájuk. A 4. csoportnak azok a penicillináz típusú enzimek a tagjai, amelyeknek nem gátlószere a klavulánsav (18).

A β -laktamáz enzimek többnyire extracelluláris fehérjék, amelyek a Gram-pozitív baktériumokban a médiumba választódnak ki, míg a Gram-negatív baktériumokban a periplazmatikus térben akkumulálódnak (101, 115). A Gram-pozitív *B. licheniformis*-ban és *B. cereus*-ban, valamint *S. aureus*-ban kimutattak olyan β -laktamáz enzimet, amelynek membránhoz kötött hidrofób és szolubilis exoenzim formája is ismert (61, 101, 102, 143). A *Streptomyces* fajok közül a *S. coelicolor* genomja ismert, amelyben 3 β -laktamáz enzim gént és 3 β -laktamázzal rokon fehérjét találtak, de *Streptomycesekben* eddig csak az extracelluláris térben akkumulálódó β -laktamázoikat írtak le.

A membránhoz kötött lipoproteinek N-terminálisukon szignál peptidet hordozó, módosítatlan prolipoproteinként szintetizálódnak, melyek különböző kovalens módosuláson mennek keresztül (50, 83, 143). A prolipoprotein N-terminális közelében lévő ciszteinjéhez egy diacil-glicerid csoport kapcsolódik tioéter kötéssel. A keletkező diglicerid-prolipoproteinről a szignál peptidáz II enzim hasítja le a szignál peptidet. Ez a hasítás egy konszenzus szekvenciánál /Leu-(Ala-Ser)-(Gly-Ala)-Cys/ történik. Ismert egy antibiotikum, a globomycin, ami a szignál peptidáz II enzim specifikus inhibitora, s meggátolja a baktériumokban a prolipoproteinek processzingsjét (63). A szignál peptid leválása után képződött diglicerid-lipoprotein ugyanazon, N-terminálison levő ciszteinjéhez a következő lépésben egy hosszú szénláncú zsírsav kapcsolódik amid kötéssel, kialakítva így a kész lipoproteint (11. ábra). A lipoproteinek membránhoz való kapcsolódásáért az N-terminális régió lipofil módosulást hordozó részét tartják felelősnek. Ezek a lipoproteinek a Gram-pozitív baktériumokban a plazmamembrán külső felszínéhez kapcsolódnak, és hasonló funkciót töltenek be, mint a Gram-negatív baktériumok periplazmatikus fehérjei. A membránhoz kötött, lipiddel módosított fehérjéket az életciklus késői, általában stacioner növekedési fázisában nem specifikus proteázok hasítják le (100). A Gram-pozitív baktériumok lipoproteinjeit, köztük a penicillináz enzimeket is Lampen és munkatársai *Bacillusok*-ban tanulmányozták a legrészletesebben (83, 101, 102).



11. ábra: A membránhoz kötött lipoproteinek szintézise

A β -laktamáz enzimnek eddig egyetlen ismert funkciója a β -laktám gyűrű hidrolízise, és ezáltal az antibiotikum inaktiválása (9. ábra). Az ismert β -laktamázok többsége (A, C és D osztály) szerin aminosavat tartalmaz az aktív centrumában, β -laktám vegyületekkel reakcióba lépve szintén acilenzim intermediert képeznek, ám a DD-peptidázokkal ellentétben ez az intermediér gyorsan hidrolizál és az inaktív antibiotikum felszabadul (37). A β -laktamáz enzimek nem mutatnak DD-peptidáz aktivitást. Egészen az 1990-es évekig úgy gondolták, hogy a β -laktamázok, ellentétben a LMW-PBP-vel, nem szükségesek a peptidoglikán sejtfal metabolizmusához (36). Egy lehetséges mechanizmus, amely a β -laktamázok kialakulását megmagyarázza az, hogy a β -laktám antibiotikummal kapcsolatba került baktériumok LMW-PBP-DD peptidáz enzimei kiválasztásra kerültek, és a detoxikáló mechanizmus újabb lépéseként a vízdékony penicillinkötő fehérjék átalakultak β -laktám gyűrűt hidrolizáló enzimekké (36).

A legtöbb *Streptomyces* species, beleértve a penicillint és cephalosporinokat termelő illetve nem termelő törzseket is, különösen rezisztensek nagy penicillin koncentrációkkal szemben. Érdekes módon ezekben a törzsekben a β -laktamáz enzim rezisztenciában betöltött szerepe ezért kérdéses, mert nincs korreláció az enzimtermelés mértéke és a rezisztencia foka között. Ráadásul *Streptomyces*-ekben a β -laktám szerkezetű vegyületekkel szembeni legfőbb védelmi mechanizmus valószínűleg nem az enzimtermelés, hanem olyan PBP-ek jelenléte, amelyek kis affinitást mutatnak a β -laktám molekulákkal szemben (107, 108, 109).

A β -laktamáz enzim fiziológiai szerepe, különösen a nem patogén és β -laktám antibiotikumot nem termelő baktériumokban, mint pl. a *Streptomyces* fajokban, azonban máig is tisztázatlan. Feltételezik, hogy a β -laktamáz enzim termelés kapcsolatban állhat a sejtfal metabolizmusával, amint azt a Gram-negatív baktériumokban kimutatták (64, 65).

A β -LAKTAMÁZ ENZIM TERMELÉS ÉS A SEJTFAL METABOLIZMUS KAPCSOLATA

β -laktamáz enzim indukciója, mint a szignál transzdukció és a gén reguláció egy lehetséges modellje

A baktériumban a β -laktamáz enzim/ek szintézise lehet konstitutív, de sok esetben β -laktám antibiotikumokkal indukálni lehet az enzim termelődését. Mivel ez az antibiotikum nem lépi át a citoplazma membránt, a baktériumokban működnie kell egy olyan mechanizmusnak, ami jelzi a baktérium számára az antibiotikum jelenlétét. A környezetében levő antibiotikum felismerésére és a rezisztencia gének transzkripciójának bekapcsolására a baktériumok egyedülálló szignáltranszdukciós mechanizmust fejlesztettek ki. Az alábbiakban 3 különböző enzimindukciós mechanizmust szemléltetünk.

*β -laktamáz indukciója *Citrobacter freundii*-ban: a gram-negatív modell*

A Gram-negatív *C. freundii*-ban legalább négy gén (*ampR*, *ampG*, *ampD*, *ampE*) játszik szerepet a C osztályba tartozó AmpC β -laktamáz enzim termelésének regulációjában, és a peptidoglikán recycling szintén a β -laktamáz indukcióhoz kapcsolódik (15. ábra) (64, 65). Az AmpC β -laktamázt kódoló gén expresszióját a DNS-kötő fehérje, az AmpR kontrollálja, amely induktor hiányában represszorként, induktor jelenlétében az *ampC* transzkripció aktivátoraként működik. Az *ampG* gén egy integráns membrán fehérjét, az 1,6-anhidro-MurNAc-tripeptid permeázt

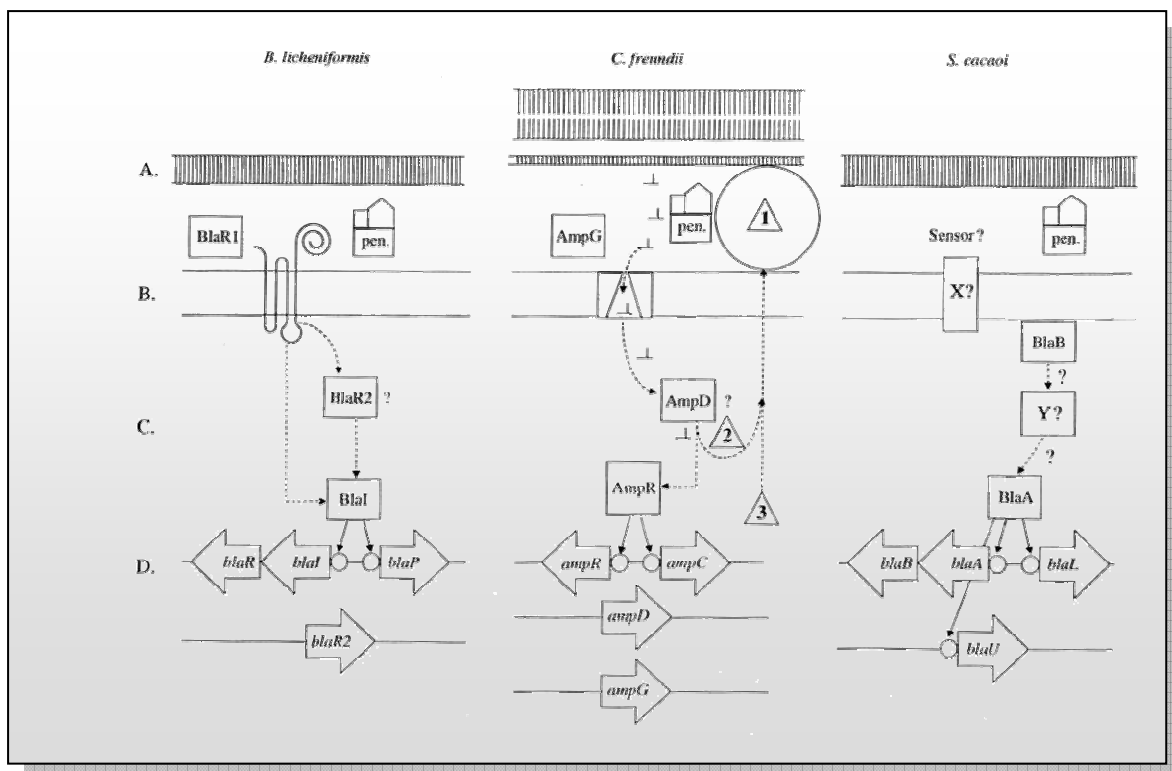
kódolja (126). Az *ampD* egy amidázt kódol, ami a peptidoglikán degradációs termékeinek újrahasznosításában vesz részt (ezek az AmpG segítségével lépnek be a sejtbe) (64, 65). Antibiotikum hiányában, a citoplazmában található peptidoglikán prekursor, az UDP-NAM-pentapeptid a represszorként működő AmpR-hez kapcsolódik. Penicillin jelenlétében (amikor a sejtfalszintézis károsodott) a fő metabolit, feltehetően az 1,6-anhidro-MurNAc-tripeptid, citoplazmatikus koncentrációja elegendő ahhoz, hogy az UDP-NAM-pentapeptid ligand kizorításával visszaállítsa az AmpR aktivátor tulajdonságát. Ebben az esetben tehát az *ampC* gén transzkripciójának kontrollja a peptidoglikán prekursorok és a degradációs termékek koncentrációja közti kényes egyensúlyon alapszik. Ezek alapján feltételezhető, hogy ez a rendszer a sejtfalszintézis monitorozásában és a baktérium növekedése alatt a murein bioszintézis és lebontás közti egyensúly fenntartásában játszik szerepet.

Bacillus licheniformis: a Gram-pozitív modell

A *B. licheniformis* indukálható BlaP β -laktamázának expresszióját három, a kromoszómán elhelyezkedő gén, a *blaI*, a *blaR1* és a *blaR2* szabályozza (47, 80, 149). A BlaI egy DNS-kötő fehérje, a *blaP* gén transzkripció represszora. A BlaR1 egy membránfehérje, és penicillin szenzorként működik. A BlaI β -laktám antibiotikum hiányában három operátor régióhoz kötődik, és csak nagyon alacsony szintű β -laktamáz enzimtermelést tesz lehetővé. Penicillin jelenlétében a BlaI inaktív konformációt vesz fel, nem tud az operátor régióhoz kapcsolódni, derepresszálva így a β -laktamáz enzim termelését. Penicillin jelenlétében a BlaR1 által a citoplazma membránon át indított szignál természete még nem ismert. A BlaR2 szerepe szintén ismeretlen.

*β -laktamáz enzim indukciója *Sterptomyces*-ekben*

A *Sterptomyces* fajok kb. 75 %-a termel β -laktamáz enzimet, általában konstitutív módon. Egyik kivétel a *S. cacaoi*, amelynek két struktúrgénje a *blaL* és a *blaU* két különböző, az A osztályba tartozó β -laktamáz enzimet kódol (70, 85). Mindkét gén (*blaU*, *blaL*) egy regulátor génpár a *blaA* és a *blaB* szabályozása alatt áll (70). BlaA egy transzkripciós aktivátor, a BlaB a citoplazma membrán belső felszínén lokalizált, β -laktám molekulát felismerő proteinekhez hasonló, de pontos szerepe a *blaL* expressziójában és indukciójában nem ismert. A BlaB nem mutat sem β -laktamáz, sem D-aminopeptidáz aktivitást, és nem is PBP.



12. ábra: A β -laktamáz enzimindukciós modellek

Forsman és munkatársai a β -laktamáz enzimek molekuláris analízise alapján feltételezik, hogy a *Streptomyces*-ek A osztályba tartozó β -laktamáz enzimeit a Gram-pozitív baktériumok génjeinek egy olyan szupercsaládját képezik, amelyekből a Gram-negatív baktériumok A osztályú enzimeit származhatnak (Forsman Ph. D. tézis, University of Uppsala).

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

BAKTÉRIUM TÖRZSEK

Az általunk használt *S. griseus* NRRL B-2682 egy talajból izolált, vad fenotípusú, streptomycin antibiotikumot termelő törzs. Ezt a törzset J. C. Ensign és munkacsoportjától kaptuk (Department of Bacteriology, University of Wisconsin-Madison, USA).

A *S. griseus* *spoI*⁻, *spo2*⁻, *spo3*⁻ törzsek a *S. griseus* NRRL B-2682 nem spórázó, antibiotikumot nem termelő, spontán mutáns törzsei, amelyeket mi izoláltunk a laboratóriumunkban. A *spoI*⁻, *spo2*⁻, *spo3*⁻ törzsek érzékenyek az AF-ra, AF hatására normál differenciálódásuk, és az antibiotikum termelésük is visszaállítható.

TÁPTALAJOK

Kísérleteink során a *S. griseus* NRRL B-2682 és a nem spórázó, mutáns törzset a következő táptalajokban tenyésztettük:

1. *DM minimál médium*: 25 mM Tris-HCl (pH 7.2), 50 mM glükóz, 5 mM NH₄Cl, 0.5 mM MgCl₂, 10 mM KH₂PO₄, 0.05 % kazein hidrolizátum (CH) és 0.4 % nyomelem oldat (pH 7.2). A nyomelem oldat összetétele a következő: TS: 17 mM CaCl₂, 5 mM FeSO₄, 20 mM MnSO₄, 0.3 mM ZnSO₄. Kísérleteink egy részében a DM táptalajt 0.5 % CH-mal egészítettük ki, mert ilyen körülmények mellett gátolni lehet a vad típusú törzs légmicélium képzését és a sporulációját is.
2. *E9 médium*: 10 mM CaCO₃, 47 mM NaNO₃, 12 mM K₂HPO₄, 6 mM KCl, 2 mM MgSO₄, 50 mM glükóz, 0.5 % (m/v) Bacto-pepton, 0.5 % (m/v) élesztő-kivonat (pH 7.3).
3. *Glicerín-kazein (GC) táptalaj*: 86 mM NaCl, 10 mM CaCO₃, 4 mM MgSO₄ × 7 H₂O, 57 mM K₂HPO₄, 3 mM FeSO₄ × 7 H₂O, 35 mM KOH, 0.05 % (m/v) kazamínosav (pH 7.6).
4. *Szűrt szójasz táptalaj*: 20 g szóját, 2 g CaCO₃-ot, 3 g NaCl-ot és 6 g kukorica lekvárt 1 liter csapvízben 1 órán át főzni, leszűrni és pH-t 7.8-ra állítani. Az így készített

táptalajt 1.3 atm-án 1 órán keresztül autoklávozni, leoltás előtt táptalaj 100 ml-ét 10 ml 10 % glükóz oldattal kiegészíteni.

A protoplasztok előállítására a következő, módosított Okanashi P táptalajt használtuk (111):

5. *Protoplasztáló P táptalaj*: 103 g szacharózt, 0.25 g K_2SO_4 -ot, 2.03 g $MgCl_2 \times 6 H_2O$ -t és 2.0 ml nyomelem oldatot annyi desztillált vízben oldottunk, hogy az oldat végtérfogata 800 ml legyen, és kisterileztük. Autoklávozás után a következő steril oldatokat mértük a rendszerhez: 90 ml 25 mM Tris HCl puffer (pH 7.2), 10 ml 0.5% KH_2PO_4 , és a csapadék kiválás elkerülésére lassan csepegtetve 100 ml 3.68 % $CaCl_2 \times 2 H_2O$. A nyomelem oldat összetétele 1000 ml-re: 200 mg $FeCl_3 \times 6 H_2O$, 10 mg Cu-acetát, 10 mg $MnCl_2 \times 4 H_2O$, 10 mg $Na_2B_4O_7 \times 10 H_2O$, 10 mg $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \times 4 H_2O$, 80 mg $ZnSO_4 \times 7 H_2O$

TENYÉSZTÉSI KÖRÜLMÉNYEK

1. A S. griseus NRRL B-2682 törzs tenyésztése

Folyadék táptalajban

1. A *S. griseus* vad típusú törzsének mélytenyésztését olyan spóra szuszpenzióval indítottuk, amelyet DM agar médiumról, az ebben a fejezetben leírtak szerint nyertünk.
2. A mélytenyésztetek esetében 500 ml-es Erlenmeyer lombikba mért, 100 ml táptalajra 300 μ l spóra szuszpenziót oltottunk le, és a tenyészetet 27 °C-on, rázógépből inkubáltuk 250-es fordulatszám mellett.

Szilárd táptalajon

1. Szilárd táptalajként 2 % (m/v) Bacto agarral kiegészített DM médiumot használtunk, egy Petri csészébe 25 ml táptalajt öntöttünk.
2. A Petri csésze agar felszínére 150 μ l spóra szuszpenziót szélesztettünk, és 27 °C-on termosztátban tenyésztettük a *S. griseus* NRRL B-2682 törzset.

2. A *S. griseus* *spo1⁻*, *spo2⁻*, *spo3⁻* törzsek tenyésztése folyadék és szilárd táptalajon

A nem spórázó, mutáns *S. griseus* törzs tenyésztését az AF segítségével létrehozott spóra szuszpenzióval indítottuk mély és szilárd felszínű tenyészetekben egyaránt. A spórákat a következő módon nyertük.

1. DM szilárd médiumra leoltottuk a mutáns törzset.
2. Steril papírkorongokra 10 µl-t mértünk az AF 100 µM-es törzsoldatából, és leoltáskor ezeket a papírkorongokat a Petri csésze közepére helyeztük. A tenyészetet 27 °C-on, termosztátban növesztettük.
3. A 40 órás korú tenyészetben, az AF hatására képződött spórákból szuszpenziót készítettünk (lásd a módszertani fejezetben), és az így nyert spórákkal indítottuk a mutáns törzsek mély és szilárd felszínű tenyésztését. A tenyésztés egyéb körülményei teljesen azonosak voltak a vad típusú törzsnél alkalmazottakkal.

3. Spóra szuszpenzió készítése

1. A *S. griseus* NRRL B-2682 törzset Petri csészében, szilárd DM agar táptalajon termosztátban 27 °C-on növesztettük.
2. A 40 órás tenyészet spóráit steril üveggyöngyökkel ráztuk le, és steril fiziológiás sóoldattal lemosva a gyöngyöket, spóra szuszpenziót készítettünk. A szuszpenziót úgy hígítottuk meg, hogy kb. 10⁶ ml⁻¹ spóraszámot kapjunk, s ezt a szuszpenziót használtuk a *S. griseus* törzs tenyésztéséhez.
3. A *S. griseus* *spo1⁻* törzs tenyésztésében AF hatására képződött spórákból az itt leírtakkal teljesen azonos módon készítettünk szuszpenziót.

4. Gradiens lemez „gradient plate” készítése

1. A gradiens lemez készítéséhez 0.5 % CH-mal készített DM agar táptalajt kiegészítettünk penicillin G törzsoldatával, hogy az antibiotikum koncentrációja 100 µgml⁻¹ volt a táptalajban.
2. Az antibiotikum tartalmú táptalajból 15 ml-t öntöttünk Petri csészébe, és az agar médiumot ferdén dermesztettük meg (31).
3. A megszilárdult agarlemezt 0.5 % CH-ot tartalmazó 10 ml DM táptalajjal fedtük le, és a *S. griseus* NRRL B-2682 törzs spóráiból 150 µl-t szélesztettünk az így keletkező, antibiotikum koncentráció gradiens tartalmú agar táptalajra.

5. Agar diffúziós teszt kivitelezése

1. A β -laktám antibiotikumokból, a sejtfalszintézist gátló vegyületekből és a vizsgálni kívánt sejtfalat alkotó peptidekből különböző koncentrációjú törzsoldatokat készítettünk desztillált vízzel, és G5-ös szűrőn sterilre szűrtük.
2. A *S. griseus* vad típusú törzs spóráit leoltottuk DM agar táptalajra Petri csészébe.
3. Steril papírkorongokat átitattunk a különböző törzsoldatok 5 vagy 10 μ l-es részletével, s ezeket a Petri csésze közepére helyeztük. A tenyészeteket 27 °C-on, termosztátban tenyésztettük.
4. A sejtfalszintézist gátló, de nem β -laktám szerkezetű antibiotikumok hatásának tanulmányozásakor az agarlemez közepére vájt lyukakba mértük a törzsoldatokat.

ENZIMAKTIVITÁSOK MÉRÉSE

1. A β -laktamáz enzim aktivitásának mérése a nitrocefin hidrolízisének mérésével

A nitrocefin (NC) egy olyan cefalosporin származék, amelynek 7.0 pH értékű vizes oldatban 390 nm-nél van a fő abszorpciós maximuma, ha a β -laktám gyűrűje intakt. Ha a β -laktamáz enzim megbontja az amidkötést, a gyűrű felnyílásával ez a csúcs eltűnik, és egy új csúcs jelenik meg 486 nm-nél. Ez teszi lehetővé a β -laktamáz aktivitás gyors meghatározását (105).

A β -laktamáz aktivitás mérése

1. A nitrocefinből (NC) törzsoldatot készítettünk, 5 mg NC-t 0.5 ml dimetilszulfoxidban oldottunk, majd rögtön meghígítottuk 9.5 ml 0.1 M foszfát pufferrel (pH 7.0).
2. A β -laktamáz enzimforrást (50 vagy 100 μ l) és a 0.05 M foszfát puffert (900 vagy 850 μ l) (pH 7.0) tartalmazó reakcióelegyet 5 percig 37 °C-on inkubáltuk, majd hozzámértük az 50 μ l NC törzsoldatot.
3. Az 1 ml végtérfogatú reakció elegyet pontosan 10 percig inkubáltuk 37 °C-on, majd jégbe helyeztük a mintákat.
4. A reakcióelegy fényelnyelését $\lambda = 485$ nm-en, Beckman típusú spektrofotométerben mértük. Egységnyi aktivitást mutat az az enzimmennyiség, ami a fenti körülmények mellett 1 μ mól NC-t hidrolizál el (105).

5. A β -laktamáz enzim aktivitását a NC-re jellemző moláris abszorpciós koefficiens, a $\Delta\epsilon$ (λ) ismeretében számítottuk: (ϵ_{485} 16700 M⁻¹ cm⁻¹). Az egyes minták fehérjetartalmát Folin reagenssel határoztuk meg, és az enzimforrást tartalmazó minta fehérje mennyiségének ismeretében adtuk meg az enzim specifikus aktivitását.

*A különböző lokalizációjú β -laktamáz aktivitás méréséhez szükséges enzimfrakció
nyerése*

1. Az **extracelluláris β -laktamáz** aktivitás méréséhez a *S. griseus* törzs DM táptalajon tenyésztett kultúrájából a meghatározott időpontokban 1 ml-es mintákat vettünk, centrifugáltuk 14000 g-vel 4°C-on 10 percig, és az így nyert felülúszóból kivett 50 vagy 100 μ l-es mintákat használtuk az enzimaktivitás méréséhez NC szubsztrát mellett.
2. A kísérleteink egy részében a **membránhoz kötött β -laktamáz** aktivitás méréséhez sejtkivonatot (crude extract) készítettünk (lásd ebben a fejezetben), és ebből 50 μ l-t mértünk a reakcióelegyhez az enzimaktivitás meghatározások során.
3. A **totál β -laktamáz aktivitás** meghatározásához a *S. griseus* törzs tenyészetének 5 ml-es részletét feltártuk ultrahanggal 50 %-os cikluson, 0 °C-on, 5 percig ultrahangozva a mintát. Az így kapott preparátum 50 μ l-es részletében mértük a β -laktamáz aktivitást.

2. A D-aminopeptidáz enzim aktivitásának mérése

Az aminopeptidáz aktivitást az Asano és munkatársai által leírt spektrofotometriás módszerrel mértük (6). Az aminopeptidáz aktivitás meghatározásához D-Ala-*p*-nitroanilid szolgál szubsztrátként, amelyből az enzim lehasítja a D-Ala-t, az így képződő *p*-nitroanilid mennyiségét abszorbancia növekedés jelzi.

1. 100 mM Tris-HCl pufferben (pH 8.0) oldottunk annyi D-Ala-*p*-nitroanilidet, hogy a koncentrációja az 1 ml végtérfogatú reakcióelegyben 5 mM legyen.
2. Az így készített 900 μ l pufferhez hozzámértünk 100 μ l részlegesen tisztított enzimfrakciót.
3. A reakció 30 °C-on, 1 ml végtérfogatban 10 percig ment végbe.
4. Az aminopeptidáz aktivitást Shimadzu UV 3000 spektrofotométerrel, a reakciót $\lambda=405$ nm-en követve határoztunk meg. Egységnyi aktivitást mutat az az

enzimmennyiség, amely 1 perc alatt 1 μmol D-Ala keletkezését katalizálja a D-Ala amid szubsztrátból ($\epsilon_{405} 10600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

3. A glutamin szintetáz enzim aktivitásának mérése

A glutamin szintetáz (GS) aktivitás méréséhez a γ -glutamiltranszferáz esszét alkalmaztuk (11). Első lépésben sejtkivonatot készítettünk a *S. griseus* DM médiumban, mélytenyészetben rázatott, 32 órás micéliumtömegéből.

3.a Sejtkivonat (crude extract) preparálása

1. A *S. griseus* NRRL B-2682 törzset DM folyadék táptalajban tenyésztettük, a 32 órás tenyészetet centrifugáltuk 6000 g-n, 20 percig 4 °C-on.
2. Ezt követően a kiülepedett sejteket szuszpendáltuk 25 mM TRIS-pufferrel (pH 7.0), majd feltártuk ultrahanggal (Branson Sonifer model 250) 50 %-os ciklussal, 0 °C-on 2 percig.
3. Az így nyert szuszpenziót centrifugáltuk 12000 g-n, 4 °C-on, 20 percig, s az így kapott felülúszót, mint crude extract-ot használtuk GS aktivitás és membránhoz kötött β -laktamáz aktivitás méréséhez.

3.b A GS aktivitás meghatározása

1. A törzsoldatokat a következő sorrendben mértük össze: 753 μl H_2O , 225 μl 1 M imidazol-hidroklorid, 37 μl 0.8 M hidroxilamin-hidroklorid, 4.5 μl 0.1 M MnCl_2 , 150 μl 0.28 M K-arzenát (pH 7.15), 15 μl 40 mM $(\text{Na})_2\text{ADP}$ (pH 7.0), 150 μl CTAB (1 mg/ml). Az így készített elegy pH-ját 7.5-re állítottuk.
2. A fenti puffer 400 μl -éhez mértünk 50 μl enzimforrást és 50 μl 0.2 M L-glutamint, és 37 °C-on, 30 percig inkubáltuk.
3. A reakciót 1 ml stop oldattal állítottuk le, a stop oldat összetétele 1000 ml-re: 55 g FeCl_3 , 20 g TCA, 21 ml cc. HCl.
4. A mintát centrifugálni (4000 g, 4 °C, 20 perc)
5. Az oldat fényelnyelését 540 nm-en mértük. A vak oldat készítéséhez a $(\text{Na})_2\text{ADP}$ -ot és a K-arzenátot nem mértük a mintához. Egységnyi aktivitást az az enzim mennyiség mutat, ami egy perc alatt 1 μmol glutamil-hidroxamát keletkezését katalizálja. 1 μmol glutamil-hidroxamát 0.532 abszorbanciát ad.

4. A fehérje tartalom meghatározása

Az enzimaktivitási adatok specifikussá tételéhez a mért értékeket a minta összfehérje tartalmára vonatkoztattuk. A fehérje tartalmat Lowry módszerrel határoztuk meg, a kalibrációhoz Bovin serum albumint (BSA) használva (90).

1. A frissen készített „A reagens” 1 térfogatnyi I. oldatot (összetétele 1 literre vonatkoztatva: 100 g NaCO_3 , 1 g $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$, 2 g Na-tartarát), 2 térfogatnyi SDS oldatot (50g/l), és 1 térfogatnyi 0.8 M-os NaOH oldatot tartalmazott.
2. A „B reagens” 2 N „Folin and Ciocalteu’s phenol reagent” és desztillált víz 1 : 5 arányú elegye.
3. Az 5-100 μg fehérje / ml koncentrációra hígított minták 1 ml-hez 1 ml „A reagenst” adtunk, 25 $^\circ\text{C}$ -on 10 percig inkubáltuk, majd 0.5 ml „B reagenst” mértünk az oldathoz a színreakció létrejöttéhez.
4. Az oldatokat szobahőmérsékleten 30 perc után $\lambda=750 \text{ nm}$ -en fotometráltuk.

ANALITIKAI MÓDSZEREK

1. A *S. griseus* törzs β -laktamáz enzimeinek tisztítása1.a Az extracelluláris β -laktamáz enzim izolálása a vad típusú törzs tenyészetéből

1. A *S. griseus* vad típusú törzsből nyert spóra szuszpenzióból 1-1 ml-t oltottunk le 400-400 ml E9 médiumot tartalmazó, 2 literes Erlenmeyer lombikokba (összesen 2000 ml), és rázógépből 250 rpm mellett, 27 °C-on növesztettük a tenyészeteket.
2. A 40 órás micéliumtömeget 4000 g-vel, 30 percig 4 °C-on centrifugáltuk.
3. Az így kapott felülúszót AMICON Hollow Fiber M=10000 molekulatömegű szűrőn megközelítőleg 100 ml-re bekoncentráltuk, és ebből a mintából 15 % (m/v) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -tal kicsaptuk az oldat fehérjéinek egy részét.
4. A centrifugált (4000 g-vel, 20 percig 4 °C-on) mintából NC szubsztrát felhasználásával megvizsgáltuk a precipitátum, és a felülúszó β -laktamáz aktivitását, a β -laktamáz a felülúszóban volt kimutatható.
5. A következőkben a felülúszót 70 % (m/v) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -tal egészítettük ki, 4000 g-vel, 20 percig 4 °C-on centrifugáltuk, ekkor a β -laktamáz enzim is a precipitátumba került, a felülúszóban nem volt mérhető az enzimaktivitás.
6. Következő lépésként a precipitátumot 0.075 M Tris-HCl pufferben (pH 9.4) szuszpendáltuk, majd ebből 1 ml-es mintákat Bio-Gel P6 oszlopra (Bio-Rad, 10 × 100 mm) vittünk fel. Az oszlopot szintén 0.075 M Tris-HCl pufferrel mostuk, 1 ml-es frakciókat gyűjtöttünk, s így só-mentesítettük a mintáinkat.
7. Az enzim izolálásának következő lépéseként **kromatofókuszálás** következett. Ezt az elválasztási lépést FPLC készülékkel (Waters 650 E), Pharmacia MonoP HR 5/20 oszlopot használva végeztük el. A kromatofókuszálás start puffereként 0.075 M Tris-HCl oldatot, eluensként Polybuffer 96 / CH_3COOH (pH 6.0) (Pharmacia) oldatot használtunk. A pH gradienst a tízszeresére hígított Polybuffer 96 oldattal alakítottuk ki, a pH az elválasztás során 9.4 és 6.0 között változott. A start és az eluáló puffer esetében is 1ml×perc⁻¹ áramlási sebességet választottunk.
8. A kromatofókuszálás során 1 ml-es frakciókat szedtünk, a frakciók β -laktamáz aktivitását NC szubsztráttal mértük. A magas β -laktamáz aktivitást mutató mintákat összegyűjtöttük (kb. 4 ml), és 4 °C-on ultraszűrővel 1 ml végtérfogatra koncentráltuk Millipore NMWL 10000 membránszűrőn keresztül.

9. Az így kapott mintát tovább koncentráltuk Centricon YM szűrőn 4 °C-on 1000 fordulatszámmal centrifugálva, míg elértük a 200 µl végső térfogatot.
10. A bekonzentrált mintákat a tisztítás következő lépéseként FPLC **géliszűrő** oszlopra (Waters SW 200, 0.8 × 300mm) vittük fel. A gélfiltráció során 0.05 M Tris-HCl (pH 7.0) puffert használtunk, 1 ml×perc⁻¹-re állítva a puffer áramlási sebességét. A géliszűréssel szintén 1 ml-es frakciókat szedtünk, és ebből 100 µl-t kivéve, a NC hidrolízis mérésével határoztuk meg a β-laktamáz enzimet tartalmazó frakciókat.
11. A β-laktamáz aktivitást mutató mintákat (kb. 3 ml) újból bekonzentráltuk Millipore NMWL 10000 filteren keresztül 1 ml-re, majd Centricon YM szűrőn 4 °C-on 1000 fordulatszámmal centrifugáltuk 200 µl végtérfogatig, és ezt a mintát vittük fel SDS poliakrilamid gélre.

1.b A vad típusú és a mutáns törzs membránhoz kötött β-laktamáz enzimének tisztítása

Membrán preparálás

A membránhoz kötött enzim izolálásához membránt preparáltunk a *S. griseus* vad típusú és a mutáns törzsének tenyészetéből is a Barabás és munkatársai által leírt módszert követve (8).

1. A *S. griseus* törzs spóráit és a *spo I⁻* törzs AF hatására képződött spóráit (1 ml) 2 literes Erlenmeyer lombikba mért, 400 ml GC folyadék táptalajra oltottuk le, és 27 °C-on rázógépből tenyésztettük.
2. A 20 órás korú tenyészetből 4000 g-n, 4 °C-on, 25 percig tartó centrifugálással gyűjtöttük össze a micéliumtömeget. Ezeket a sejteket kétszer átmostuk 10 mM Tris-HCl pufferrel (pH 7.5).
3. Következő lépésben az átmosott sejteket olyan 10 mM Tris-HCl pufferben szuszpendáltuk, amit 1 mg×ml⁻¹ lizozimmal és 25 % (m/v) szacharózzal egészítettünk ki. A sejtfal lizozimmal történő emésztése egy éjszakán keresztül 4 °C-on ment végbe, az így nyert protoplasztokat centrifugálással gyűjtöttük össze (2000 g, 4 °C, 5 perc).
4. Ezt követően a protoplasztokat olyan 0.05 M koncentrációjú Tris-HCl pufferben (pH 7.2) vettük fel, amely 5 mM koncentrációban MgCl₂-ot is tartalmazott. A protoplasztokat kétszer átmostuk ugyanezzel a pufferrel, majd 1100 g-vel 4 °C-on 12 percig centrifugáltuk. A felülúszóból 40000 g-vel, 4 °C-on, 30 percig tartó centrifugálással nyertük a sejtmembrán frakciót.

A β -laktamáz enzim leemésztése a sejtmembránból

A β -laktamáz enzim sejtmembránból történő kinyeréséhez a Kharroubi és munkacsoportja által leírt limitált tripszines emésztést választottuk (76).

1. A *S. griseus* törzs tenyészetéből az előzőekben leírt módszerrel nyert membrán szuszpenziót (kb 10 ml) 1 mM MgCl_2 -ot, 5 % (v/v) glicerint és 6.75 mg tripszint is tartalmazó, 45 ml 40 mM-os Na-foszfát pufferben (pH 7.0) inkubáltuk 10 percig, 37 °C-on.
2. Ezek után a szuszpenziót kiegészítettük 6.75 mg tripszin inhibítorral, majd 40000 g-vel 30 percig 4 °C-on centrifugáltuk, az így kapott üledéket felvettük 10 ml 0.05 M foszfát pufferben (pH 7.2).

A membránhoz kötött β -laktamáz enzim tisztításának lépései

A tripszines emésztéssel nyert mintákból az előzőekben leírt, az extracelluláris enzim tisztításánál alkalmazott eljárásokkal (kromatofókuszálás, koncentráció, gélszűrés) teljesen azonos módon izoláltuk a membránhoz kötött β -laktamáz enzimet a *S. griseus* vad és mutáns törzséből.

2. SDS-poliakrilamid gélelektroforézis

A *S. griseus* NRRL B-2682 törzs membránjából és az extracelluláris teréből, valamint a *S. griseus* *spoI*⁻ törzs membránjából izolált β -laktamáz enzimeket a kromatofókuszálást és gélszűrést követően SDS-poliakrilamid gélen futtattuk meg.

1. A gélszűrő oszlopról eluált, β -laktamáz aktivitást mutató 200 μml -re bekoncentrált mintákat 125 μmol deoxicholátot is tartalmazó 10 % (v/v) triklóracetát (TCA) oldattal kezeltük 30 percig.
2. Az így kicsapott fehérjéket minta-pufferben (82) újra oldottuk, és 80 °C-on 5 percig melegítettük.
3. Ezt követően a mintáinkat 13 %-os SDS-poliakrilamid gélen (SDS-PAGE) futtattuk meg (82). A gélelektroforézist 35 mA konstans áramerősség mellett, 4 °C-on hajtottuk végre. Az enzim molekula tömegének meghatározásához a mintával együtt futtatott SDS-7 (Sigma) mólsúlystandard mixet használtunk.
4. Az elektroforézist követően az SDS gél Comassie-Brilliant-Blue festékkel 5 percig megfestettük, majd a gél többször festékmentesítettük 400 ml MeOH-t, 70 ml

jégecet és 500 ml desztillált vizet tartalmazó fixáló oldattal. A Comassie-Brillant-Blue festék összetétele: 1.25 g festék 500 ml fixáló oldatra.

5. A blottolásra kerülő gél nem festettük meg, hanem a gélelektroforézist követően elektroforetikusan átblottoltuk immobilizációs membránra.

3. Elektroblott

Az SDS-PAGE-t követően a fehérjéket a gélből elektroforetikusan ProBlott™ (Applied Biosystems) immobilizációs membránra blottoltuk „semi-dry” rendszerben. A blottolás során a következő puffereket használtuk:

Anód puffer I: 10 % MeOH-t tartalmazó 0.3 M Tris (pH 10.4).

Anód pufferII: 25 mM Tris, amelyben a MeOH koncentrációja 10 % (pH 9.4).

Katód puffer: 10 % MeOH és 192 mM glicint is tartalmazó, 25 m M Tris/HCl (pH 9.4)

1. Három szűrőpapírt átitattunk a katód pufferrel.
2. Erre helyeztük az anód II pufferrel ekvilibrált gél és a filtert.
3. Három szűrőpapírt átitattunk az anód I pufferrel, és ezzel borítottuk le a filtert.
4. A protein transzfert 2 mA cm^2 konstans áramerősség mellett, 4°C -on egy órán keresztül végeztük, majd a membránt megfestettük Comassie-Brillant-Blue festékkel.
5. A megfestett ProBlott membránt cc. MeOH-lal mentesítettük a festéktől, és az így készített filtert használtuk a β -laktamáz enzim N-terminális szekvenciájának a meghatározásához. Az N-terminális szekvencia meghatározását a DE Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézetében Dr. Tózsér József és Dr. Boros Péter végezték.

EGYÉB MÓDSZEREK

1. Különböző, β -laktám szerkezetű antibiotikumok minimális inhibítor koncentráció (MIC) értékének meghatározása

A *S. griseus* NRRL B-2682 törzs β -laktám antibiotikumokkal szembeni MIC értékét a leves-hígítási módszerrel határoztuk meg.

1. Az antibiotikumokból foszfát pufferrel (pH 7.0) feles hígítási sort készítettünk úgy, hogy az antibiotikumok végkoncentrációja $0.125 \mu\text{gml}^{-1}$ -től $128 \mu\text{gml}^{-1}$ -ig alakuljon az egyes tenyészetekben.
2. A törzs 10 μl spóra szuszpenzióját oltottunk le 5 ml Müeller-Hinton táptalajba és az antibiotikumot megfelelő koncentrációban tartalmazó kémcsövekbe, és a tenyészeteket 27°C -on inkubáltuk.
3. A makrodilúciós eljárást követve, az 5 ml térfogatú tenyészetben vizuálisan, az élőszámot vizsgálva határoztuk meg a törzs adott β -laktám vegyülettel szembeni MIC értékét. Valamennyi antibiotikum esetében három párhuzamos kísérletet indítottunk.

2. A β -laktamáz enzim szubsztrát profiljának meghatározása

A β -laktamáz enzim szubsztrát profiljának felvételéhez a Samuni által leírt UV-spektrofotometriás technikát választottuk (125). Enzimforrásként minden esetben kromatofókuszálással és gélszűrőssel tisztított preparátumot használtunk. A hidrolízis 0.05 M-os foszfát pufferben (pH 7.0), 1 ml végtérfogatú reakcióelegyben $100 \mu\text{M}$ szubsztrátkoncentráció mellett 10 percig ment végbe. A mérést egy termosztálható, Shimadzu UV 3000 spektrofotométeren kiviteleztük 37°C -on. Az antibiotikumok hidrolízisének sebességét az alábbi, $\Delta\epsilon (\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}) / \lambda (\text{nm})$ értékek segítségével határoztuk meg: benzilpenicillin: $1.14 / 233$, ampicillin: $0.9 / 372$, cefaloridin: $10.2 / 260$, cefomandol: $10.3 / 274$, cefuroxim: $8.54 / 262$, cefotaxim: $6.73 / 262$, ceftazidim: $10.3 / 265$. Az egyes szubsztrátok bontásának sebességét a leggyorsabban hidrolizáló antibiotikumhoz viszonyítottuk.

3. A β -laktamáz enzim gátlási profiljának vizsgálata

A *S. griseus* NRRL B-2682 és a *spo*^{I-} törzsek membránhoz kötött, és a vad típusú törzs szekretált β -laktamáz enzimének a különböző, enzimműködést gátló vegyületekkel szemben mutatott érzékenységét a következő módon vizsgáltuk (17).

1. A különböző inhibitorokból 0.05 M foszfát pufferrel törzsoldatokat készítettünk, s ezekből annyit mértünk 0.05 M foszfát pufferhez (pH 7.0), hogy a gátlószerek a következő koncentrációban legyenek jelen a mérések során: 100 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 1mM pCMB, 1 mM APBA.
2. Az eltérő lokalizációjú enzimformák géliszűrését követően összegyűjtöttük a β -laktamáz aktivitást mutató mintákat, és ezekben Folin reagenssel meghatároztuk a fehérjetartalmat.
3. Ezek a közel homogenitásig tisztított minták szolgáltak enzimforrásként a mérések során. Ezekből 100-100 μ l-t mértünk a gátlószert megfelelő koncentrációban tartalmazó 850 μ l foszfát pufferhez.
4. A β -laktamáz aktivitást NC szubsztráttal a módszertani fejezetben leírtak szerint határoztuk meg 1 ml végtérfogatú reakcióelegyben.
5. Kontrollként olyan mintákat használtunk, amelyek nem tartalmaztak gátlószert, és amelyeket az előzőkkel teljesen azonos módon kezeltünk.
6. Minden mintában meghatároztuk a β -laktamáz enzim specifikus aktivitását, és ezt a gátlószerral nem kezelt, kontroll enzimműködéshez viszonyítottuk. A β -laktamáz enzim *p*-CMB-vel és EDTA-val való gátlóhatóságát szenzitív (+) illetve rezisztens (-) megjelöléssel szokták jellemezni. (Szenzitivitás esetén a specifikus aktivitás a kontrollban meghatározott aktivitás maximálisan 80 %-a.)

4. A β -laktamáz inhibitorok K_i értékének meghatározása

1. A β -laktamáz gátló vegyületek közül a klavulánsav, a szulbaktám, a cloxacillin és az aztreonám hatását teszteltük a *S. griseus* spórázó és nem spórázó törzsében (17).
2. A β -laktamáz gátló vegyületekből 0.05 % foszfát pufferrel (pH 7.0) törzsoldatokat készítettünk, és öt eltérő koncentrációban vizsgáltuk az enzimműködésre gyakorolt hatásukat. A klavulánsav 0.5, 0.8, 1, 1.5, 2 μ molml⁻¹, a cloxacillin, a szulbaktám és aztreonám egyaránt 2, 4, 6, 8, 10 μ molml⁻¹ koncentrációban volt jelen az egyes mérések során.
3. A különböző lokalizációjú β -laktamáz enzimek esetében a géliszűrő oszlopról eluált, a β -laktamáz aktivitást hordozó frakciókban a Folin reagenssel mértük a protein tartalmat.
4. A közel homogén enzimpreparátumból 100-100 μ l-t mértünk a gátlószert megfelelő koncentrációban tartalmazó foszfát pufferhez (pH 7.0).

5. A β -laktamáz aktivitást 1 ml végtérfogatú reakcióelegyben, NC szubsztrát mellett mértük (Lásd ebben a fejezetben).
6. Az inhibitor koncentrációjának függvényében ábrázoltuk a NC bontás sebességének reciprokát, ahol az egyenes az y tengelyt metszi kijelöli a $-K_I$ értékét (29).

5. Protoplasztok preparálása

A protoplasztokat módosított Okanishi (111) módszerrel állítottuk elő a *S. griseus* NRRL B-2682 törzs tenyészetéből.

1. A *S. griseus* törzset DM folyékony médiumban tenyésztettük a korai-exponenciális növekedési fázisig (kb. 10 óra), majd a micéliumot centrifugálással gyűjtöttük össze. Centrifugálási körülmények: 5000g, 4°C-on 20 percig.
2. Az üledéket kétszer mostuk 0.1 M Tris-HCl pufferben (pH 7.2), majd újra szuszpendáltuk protoplasztáló (P) médiumban (111), amit 0.1 mM glükózzal, 0.05% CH-mal és 1 mg $\times$ ml⁻¹ lizozimmal egészítettünk ki.
3. A szuszpenziót 25 °C-on inkubáltuk gyenge kevertetés mellett, majd a keletkezett protoplaszt szuszpenziót kétszer átszűrtük steril vattán, és lizozimmentes, friss P-médiummal mostuk át.
4. A protoplasztokat 1000g-vel, 4 °C-on 10 percig centrifugáltuk és újra szuszpendáltuk P-médiumban. A protoplasztok számát a mintákban úgy állítottuk be, hogy kb. 2×10^8 protoplaszt legyen 1ml médiumban.

6. Az autolitikus enzim aktivitásának mérése a micéliumban

1. A *S. griseus* NRRL B-2682 törzset DM táptalajban tenyésztettük 27 °C-on, rázott tenyészetben.
2. A 10 órás, korai-exponenciális növekedési fázisban levő tenyészetet kiegészítettük 0,1 mM N-acetil-D-(1-³H)glükózammal (5 μ Ci/minta, 370 GBq/mmol).
3. Három órás inkubálás után a jelzett micéliumot centrifugálással gyűjtöttük össze, (5000 $\times$ g , 4 °C-on 10 percig), az üledéket kétszer mostuk 0.1 M Tris/HCl (pH 7.2) pufferrel és szuszpendáltuk friss, radioaktívan nem jelölt DM táptalajjal.
4. Ebből a kultúrából egyenlő mennyiségű mintákat vettünk, és kiegészítettük a megfelelő teszt reagensekkel. Ezeket a mintákat tovább tenyésztettük, 27 °C-on és 250 rpm sebességgel rázógépből (New Brunswick) rázatott tenyészetben.

5. A tenyészetből meghatározott időközönként 500 µl mintát vettünk és 20000 g-n 10 percig centrifugáltuk. A felülúszó 100 µl-es adagjaiban folyadék szcintillációs módszerrel megmértük a radioaktivitást. A mért értékeket az eredeti tenyészet nedves micélium tömegének 1 mg-jára normalizáltuk. Az ábrázolt adatok három független mérés eredményeinek átlagát mutatják.

7. A membránpotenciál ($\Delta\Psi$) mérése fluoreszcens technikával:

A fluoreszcens intenzitás mérését a DE Biofizika Intézetében egy termosztálható, Hitachi Perkin-Elmer MPF-4 spectrofluoriméterrel végeztük, 28 °C állandó hőmérsékleten. A mérések során a gerjesztési hullámhossz, $\lambda=475$ nm, az emissziós hullámhossz $\lambda=510$ nm volt.

1. A $\Delta\Psi$ szenzitív karbocianin festéket, a DiOC₆(3)-ot 2.5 ml P médiumba injektáltuk, ami 0.1 mM glükózt és 0.05% CH-ot is tartalmazott. A végső festék koncentrációt 100 nM-ra állítottuk be minden kísérletben (5).
2. A protoplasztokat gyenge kevertetés mellett adtuk a fenti oldathoz, a végső sejtszám kb. $1-2 \times 10^8$ protoplaszt/ml médium.
3. Miután a protoplasztokat hozzáadtuk a mintákhoz, megvártuk míg a rendszer egyensúlyi állapotba kerül, majd a teszt reagens (ionofórok, antibiotikumok) injektálása után folyamatosan regisztráltuk a fluoreszcens intenzitást.
4. Az agonisták DMSO-val vagy desztillált vízzel készült törzsoldatából 2-20 µl-es adagokat adtunk a mintákhoz. A gramicidin D ionofór DMSO-val készült törzsoldatából (2×10^{-3} mM) 2 µl-es adagokat használtunk minden kísérletben.
5. Maga az oldószer nem okozott detektálható változást a festék-protoplaszt rendszer egyensúlyi fluoreszcencia értékében. A fluoreszcens szignálokat a Sims és munkatársai által (129) a karbocianin festék származékokra javasolt „response” mechanizmus alapján értékeltük. Így a reagens injektálása után, a rendszer egyensúlyi fluoreszcens intenzitásának csökkenése hiperpolarizációt, míg az emissziós intenzitás növekedése a plazmamembrán depolarizációját jelenti. A membránpotenciál értékének kvantitatív meghatározása nem képezte kísérletünk részét.

8. Fáziskontraszt mikroszkópos vizsgálat

A *S. griseus* törzs mélytenyészetéből illetve a szilárd felszínű tenyészetekből vett mintákat fáziskontraszt mikroskóppal vizsgáltuk. A tárgylemezen levő mintára 1 csepp desztillált vizet cseppentettünk, immerziós olajat használva 1000-szeres nagyítással néztük a tenyészeteket.

9. Reprodukálhatóság

A bemutatott számszerű adatokat 3-7 független kísérlet átlagaként számítottuk. A növekedés mérésénél minden adat két kísérleten belüli mintavétel átlagából származik

10. Felhasznált vegyszerek

Munkáink során mindig analitikai tisztaságú vegyszereket használtunk, még a táptalaj összetevők esetében is. A finomvegyszerek többségét a Sigma-tól szereztük be (Sigma-Aldrich Kft., Budapest). Az N-acetil-D-(1-³H)glükózamin (spec. aktivitás: 105,1 GBq/mmól) Amersham termék. A penicilloesav és a cephotoxin a Biogal/TEVA, a kalvulánsav lítium-sója a Glaxo-SmithKline Beachem ajándéka.

11. Kutatási költségek finanszírozása

Munkánkat az OTKA T 020281 és az ETT 01254 kutatási pályázata támogatta. Nagy segítséget jelentett a doktori program nappali tagozatos ösztöndíjasainak nyújtott egyetemi támogatás is.

EREDMÉNYEK

A *S. griseus* NRRL B-2682 törzs életciklusának jellemzése

Kísérleteinket az *S. griseus* NRRL B-2682 törzzsel és ennek a törzsnek egy nem spórázó, spontán mutáns *spoI*⁻ törzsével végeztük. A *S. griseus* NRRL B-2682 egy talajból izolált, eredeti, vad fenotípusú, streptomycin antibiotikumot termelő törzs, amely sem az antibiotikum termelés, sem egyéb szempontok miatt nem volt soha szelekciós eljárásoknak kitéve. Bár ezzel a törzzsel több kutatócsoport is dolgozik, így ismert a törzs életciklusa, fontosnak tartottuk, hogy saját standard kísérleti körülményeink mellett végigkövessük a törzs differenciálódási lépéseit. Kísérleteinket minimál DM táptalajon (33) végeztük, mert véleményünk szerint ezek a körülmények közelítik meg legjobban a *Streptomyces*-ek eredeti élőhelyén levő feltételeket. Tenyészeinket mindig spóra szuszpenzióval indítottuk, hogy ismerjük a tenyészet pontos életkorát.

Eredményeink természetesen gyakorlatilag azonosak voltak Ensign és munkatársai által leírt differenciálódási lépésekkel (33, 75). Mélytenyészetben a sporuláció iniciációja a leoltás után 14-16 órával, a korai-exponenciális növekedési szakaszban történik meg, majd a *S. griseus* tenyészet 36 órás korban kezd spórázni. Érdekes módon szilárd minimál táptalajon (DM-agar) is hasonló életciklust mutat a törzs, a légmicélium a leoltás után 24 órával, az exponenciális növekedési szakasz végén alakul ki, és 36-38 órás korban jelennek meg a spórafüzérek.

Megvizsgáltuk az A-faktor (AF) hatását az általunk izolált, nem spórázó spontán mutáns törzsekre (*S. griseus spoI*⁻, *spo2*⁻) szilárd és folyadék tenyészetben egyaránt. Megállapítottuk, hogy az AF sporulációt indukáló hatása erősen korfüggő. Leoltást követő 18 órán belül 10^{-6} M végkoncentrációban adva az AF-t a tenyészetbe, az visszaállítja a normál differenciálódási folyamatot mélytenyészetben és szilárd felszíni tenyészetben is, bár a tenyészet öregedésével egyre nagyobb koncentrációban szükséges az AF a spórázás kiváltásához. Meg kell jegyezni, hogy az első 18 óra során bármikor is adtuk a nem spórázó, mutáns törzs tenyészetéhez az AF-t, ugyanakkor indult meg a spóráképzés, és a törzs életciklusának hossza is megegyezett a vad típusú törzsével. Azonban 18 óránál idősebb tenyészetet kezelve AF-val, az autoregulátor molekula teljesen hatástalannak bizonyult (ezeket a felvételeket itt nem mutatjuk be).

Eredményeink alátámasztják azt a megállapítást, hogy az életciklus korai-középső exponenciális szakaszában történnek meg azok a genetikai és biokémiai események, amelyek eldöntik a sejtek további sorsát, azaz differenciálódási folyamatát. Mivel a sejtek már a csírázás korai szakaszától kezdve konstitutívan termelik az AF-t, az AF koncentrációja folyamatosan

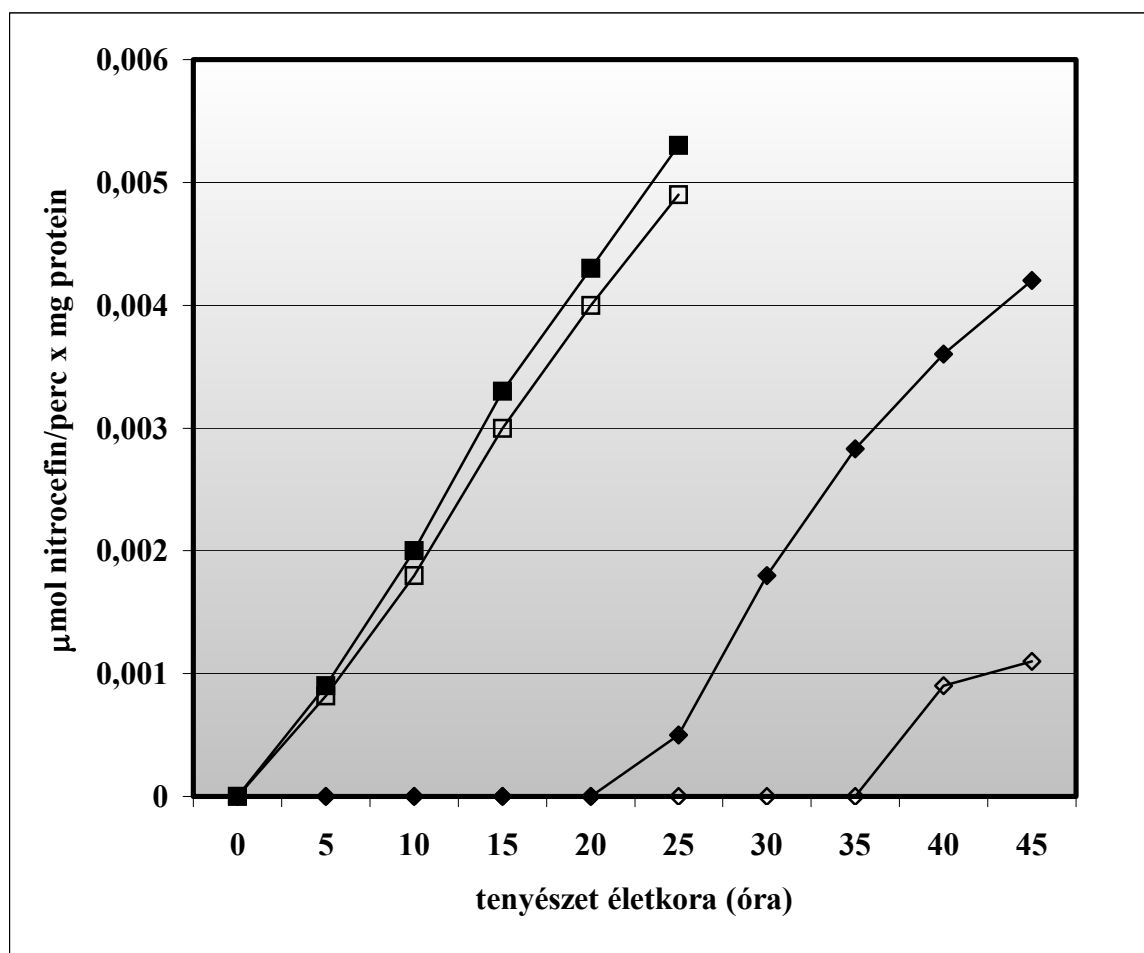
növekszik a tenyészetben, és az exponenciális növekedési szakaszban éri el a differenciálódás befolyásolásához szükséges koncentrációt.

A β -laktamáz enzim termelés alakulása *S. griseus* NRRL B-2682 vad típusú és a nem spórázó *spoI⁻* mutáns törzsek életciklusa során

Az ismert *Streptomyces* törzseknek több mint a fele termel β -laktamáz enzimet, amelyet kiválaszt az extracelluláris térbe (106, 107). Ezekben a fajokban azonban az enzimtermelés mértéke nincs korrelációban a β -laktám antibiotikumokkal szemben kialakuló, saját-rezisztencia mértékével, hiszen a törzsek többsége nem termel β -laktám antibiotikumot. Vizsgálódásunk célja, hogy választ találjunk arra, milyen szerepet játszhatnak ezek a fiziológiai funkcióval látszólag nem rendelkező β -laktamáz enzimek a Gram-pozitív, ezen belül a *Streptomyces* törzsek életciklusában. Először a β -laktamáz enzim expressziójának időbeli lefutását és az enzim lokalizációját vizsgáltuk meg a *S. griseus* NRRL B-2682 vad típusú törzsben, illetve ennek a törzsnek a nem sporuláló, spontán mutáns *spoI⁻* tenyészetében.

A *S. griseus* vad típusú törzset DM folyadék médiumban, mélytenyészetben növesztettük, az inokulációt követően 5 óránként 1 ml-es mintákat vettünk a tenyészetből, és vizsgáltuk a β -laktamáz működését az extracelluláris térben és a sejtmembránban egyaránt. Az extracelluláris β -laktamáz aktivitás mérésére a tenyészetből vett 1 ml-es mintákat Eppendorf centrifugában centrifugáltuk (10 perc, 4 °C, 10000 G), és a felülúszóban nitrocefín (NC) szubsztráttal mértük az enzimaktivitást az Anyagok és Módszerek fejezetben leírtak szerint. A membránhoz kötött β -laktamáz aktivitás meghatározásához a módszertani fejezetben leírt eljárással membránpreparátumot készítettünk, és abban határoztuk meg az enzimaktivitást. A vad típusú törzs tenyészetében már az 5 órás sejtek plazmamembránjában kimutatható a β -laktamáz enzim, de az extracelluláris térben ekkor még nem mérhető az enzimaktivitás. A β -laktamáz enzim extracelluláris formája csak a stacioner fázisban, a leoltás után 24 órával jelent meg a fermentlében (13. ábra). Azonos módszerrel és azonos körülmények mellett megvizsgáltuk a nem spórázó, *spoI⁻* spontán mutáns törzsben is a β -laktamáz enzimprodukción, és nagyon érdekes eredményt kaptunk. Az 5 órás korú mutáns sejtek membránjában már mérhető a β -laktamáz aktivitás, a vad típusú törzzsel ellentétben azonban a *spoI⁻* törzs tenyészetében csak a membránhoz kötött enzim volt jelen, az enzim extracelluláris formája nem volt kimutatható. Követve a membránhoz kötött enzim aktivitásának időbeli változását láthatjuk, hogy a vad és

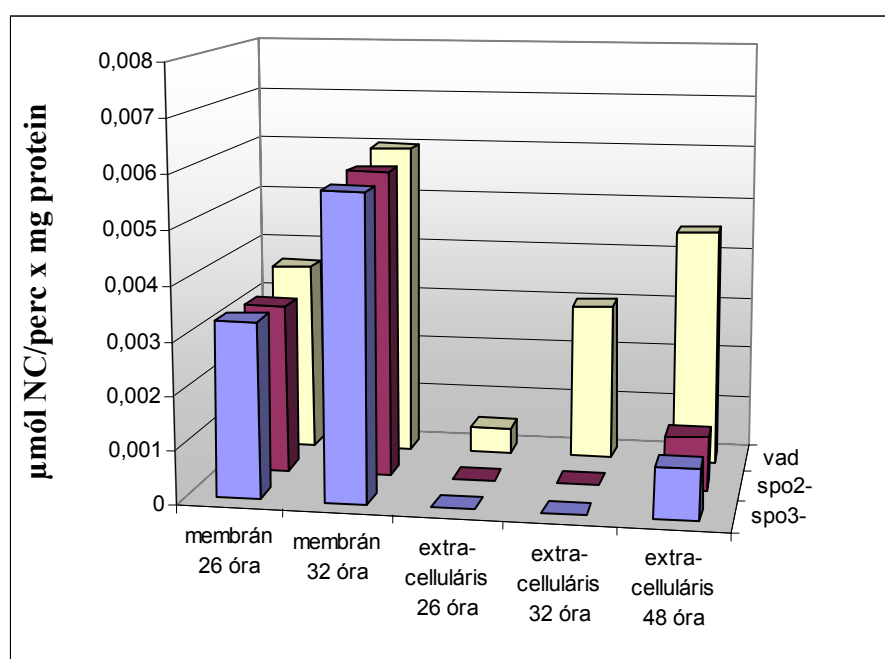
mutáns tenyészetek életciklusa során azonos időpontban jelent meg a membránba lokalizált enzim, és a mért specifikus aktivitások is körülbelül azonosak a két törzsben. Mint az a 13. ábráról leolvasható, a *spoI⁻* törzs 40 órás korú tenyészetében mérhető egy alacsony extracelluláris β -laktamáz enzimaktivitás, de feltételezzük, hogy ez a sejtek lízisének következménye.



13. ábra: A β -laktamáz enzim termelődésének összehasonlítása *S. griseus* NRRL B-2682 vad típusú és a nem spórázó, *spoI⁻* törzsben. Nitrocefin szubsztrátot használva mértük a β -laktamáz aktivitást a jelzett időpontokban a vad típusú törzs membránjában (■) és a felülúszóban (◆), valamint a mutáns törzsből izolált membránfrakcióban (□) és az extracelluláris térben (◇). Eredményeink három mérés átlagát reprezentálják.

Mivel más, nem sporuláló törzsek esetében hasonló jelenséget nem írtak még le, megpróbáltuk újabb kísérletekkel megerősíteni eredményeinket. Izoláltunk még két további spontán mutáns, nem spórázó törzset (*spo2⁻*, *spo3⁻*), és ezekben is megvizsgáltuk a β -laktamáz enzim lokalizációját és termelődésének időbeli profilját. A *spo2⁻* és a *spo3⁻* törzseket minimál DM táptalajon, folyadék kultúrában tenyésztettük, és a leoltást követő 26. és 32. órában is

meghatároztuk a membránhoz kötött, és a szekretált β -laktamáz aktivitást is NC szubsztrát felhasználásával (lásd módszertan). A 48 órás micéliumtömegből nem izoláltunk membránt, csak az extracelluláris térben mértünk enzimaktivitást, mivel ebben az életkorban DM médiumban ilyen körülmények mellett már spórázik a vad fenotípusú törzs, és kiválasztja az extracelluláris térbe az enzimet. Eredményeink teljesen hasonlóak voltak, mint a *spoI⁻* mutánszal kapott eredmények. Mindkét mutánsban (*spo2⁻*, *spo3⁻*) csak a plazmamembránba lokalizált enzimet tudtuk kimutatni, egyik törzs sem választotta ki az extracelluláris térbe a β -laktamáz enzimet (14. ábra). A *spoI⁻* törzshöz hasonlóan ebben a két nem spórázó törzsben is megjelent egy alacsony β -laktamáz aktivitás a 48 órás korú tenyészet felülúszójában (14. ábra). Ennek egy lehetséges magyarázata lehet, hogy ebben az időpontban már megkezdődik a sejtek lízise.



14. ábra: Az extracelluláris és a membránhoz kötött β -laktamáz enzim specifikus aktivitása a *S. griseus* NRRL B-2682 vad típusú (■), és a nem spórázó, *spo2⁻* (■), és a *spo3⁻* (■) törzsek 26, 32 illetve 48 órás tenyészetében. Az ábrázolt értékeket három párhuzamos mérés átlagából számítottuk.

Mint korábban említettük, a *S. griseus* termel egy autotoregulátor molekulát, az AF-t, amely szükséges a szabályos differenciálódáshoz és antibiotikum-termeléshez. Az AF-t nem termelő, mutáns törzsek tenyészetéhez adva az AF-t, az autoregulátor molekula vissza tudja állítani az eredeti, vad fenotípust és az antibiotikum termelést is. Kíváncsiak voltunk, hogy milyen hatással lehet az AF a nem spórázó, mutáns törzs β -laktamáz enzim termelésére, ezért a következő kísérletet végeztük el. Az AF-t nem termelő, *spoI⁻* törzset DM táptalajon,

mélytenyészetben növesztettük, és az inokulációt követő 6. órában hozzáadtuk a tenyészethez az AF-t 10^{-6} M végkoncentrációban. Kontroll kísérletben azonos körülmények között tenyésztettük a *S. griseus* vad típusú, és a mutáns *spoI⁻* törzsét is. A 26, 32, és 48 órás korú tenyészetekből vett 1ml-es mintákat Eppendorf centrifugában centrifugáltuk (10000 G, 4 °C, 10 perc), és a felülúszókban NC szubsztráttal, a módszertani részben leírtak szerint mértük a β -laktamáz aktivitást. Meglepő módon az AF nemcsak a normál fenotípust állította helyre, hanem ezzel párhuzamosan az enzim extracelluláris térbe történő szekrécióját is kiváltotta (1. táblázat). Az AF hatására a *spoI⁻* törzs tenyészetének felülúszójában mért specifikus β -laktamáz aktivitás körülbelül fele annak az aktivitásnak, mint amit az ugyanilyen korú, vad típusú törzsben mértünk.

A szekretált β -laktamáz enzim specifikus aktivitása a tenyészet életkorának függvényében ($\mu\text{mol NC} / \text{perc} \times \text{mg protein}$)			
Törzsek	Törzsek életkora		
	26 óra	32 óra	48 óra
<i>S. griseus</i> NRRL B-2682	1×10^{-3}	3×10^{-3}	5×10^{-3}
<i>S. griseus spoI⁻</i>	0	0	$1,2 \times 10^{-4}$
<i>S. griseus spoI⁻ +AF</i>	0	1.3×10^{-3}	2.7×10^{-3}
<i>S. griseus spo2⁻</i>	0	0	8.8×10^{-5}
<i>S. griseus spo3⁻</i>	0	0	9.4×10^{-5}

1. táblázat: A β -laktamáz enzim specifikus aktivitása a *S. griseus* NRRL B-2682 és a *S. griseus spoI⁻*, *spo2⁻*, *spo3⁻* mutáns törzsek tenyészeinek extracelluláris terében, és az AF hatása a *spoI⁻* törzs β -laktamáz enzim szekréciójára.

Ezen eredmények ismeretében természetesen felvetődött az a kérdés, hogy változik-e a vad típusú törzsben az enzimtermelés, ha meggátoljuk a spórázást. Az irodalomból ismert, hogy *S. griseus* mélytenyészetében felfüggeszthető a sporuláció, ha a DM táptalajt 0.5 % kazein hidrolizátummal (CH) egészítjük ki (33). Korábbi kísérleteinkben azt is kimutattuk, hogy a *m*-aminofenil-boronsav (APBA), mint a NAD⁺ glikohidroláz és az ADP-riboziltranszferáz enzimek gátlószere, kor és koncentrációfüggő módon meggátolja ebben a törzsben a spóráképzést szilárd és folyadék médiumban egyaránt (118). Így a következőkben külön-külön teszteltük 0.5 % CH és 15 μM APBA hatását a *S. griseus* NRRL B-2682 törzs differenciálódására és ezzel párhuzamosan a β -laktamáz enzim termelésére. A *S. griseus* vad típusú törzsének spóráit DM

folyadék táptalajra oltottuk le, és az inokulációt követő 5. órában hozzáadtuk a tenyészethez az APBA-t 15 μM koncentrációban. Párhuzamos kísérletben 0.5 % CH-mal kiegészített DM mélytenyészetben növesztettük a vad típusú törzset. Kontroll kísérletben a *S. griseus* spóráit folyadék DM médiumban növesztettük. Leoltást követő 26. és 32. órában megnéztük a β -laktamáz enzim lokalizációját a differenciálódásában gátolt törzsek tenyészetében és a kontroll mintában is. A membránhoz kötött és a szekretált β -laktamáz enzim aktivitását NC szubsztráttal, a módszertani fejezetben leírtakat követve határoztuk meg. A várakozásnak megfelelően mindkét vegyület gátolta a normál differenciálódást, a *m*-APBA-val és a CH-mal kezelt 36 órás tenyészetből vett mintákat fáziskontraszt mikroszkóppal vizsgálva nem látható spórák keletkezése, sőt a spóráképzés elmaradása mellett a β -laktamáz enzimaktivitás sem jelent meg a vad típusú törzs tenyészetének felülúszójában, aktivitás csak a membránban volt mérhető. Eredményeinket a 2. táblázatban foglaltuk össze.

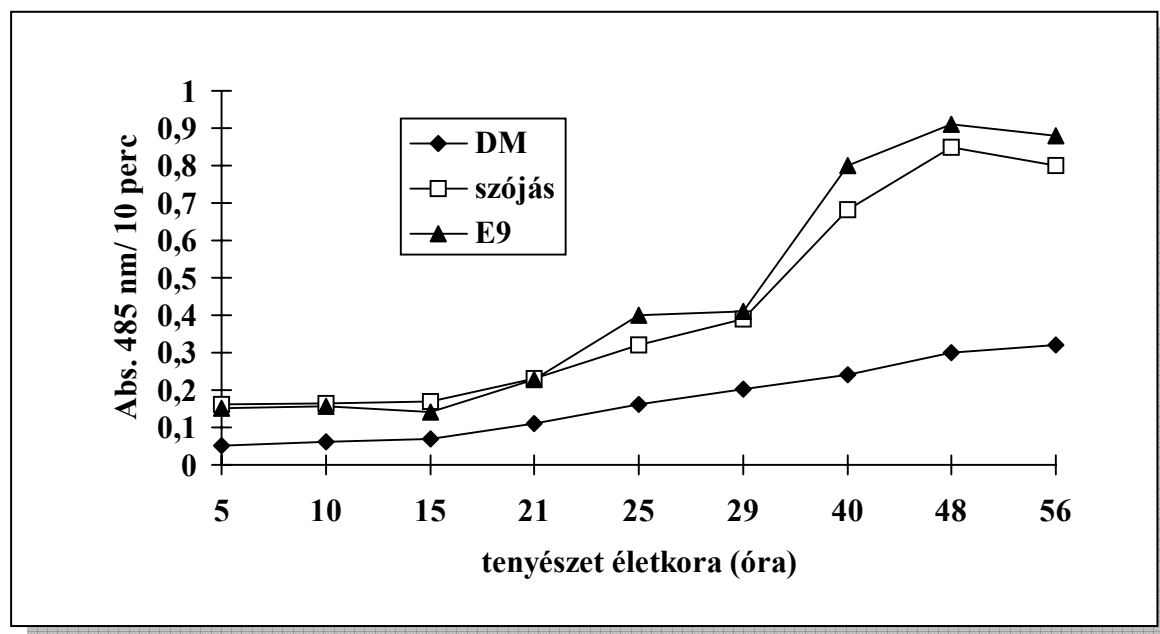
Életkor:	26 óra	26 óra	32 óra	32 óra
Lokalizáció:	Membrán	extracelluláris tér	membrán	extracelluláris tér
Kontroll	2.8×10^{-3}	5×10^{-4}	$4,5 \times 10^{-3}$	$1,8 \times 10^{-3}$
+ 0.5% CH	2.9×10^{-3}	0	4.7×10^{-3}	0
+ 15 μM APBA	3.1×10^{-3}	0	4.8×10^{-3}	0

2. táblázat: A *S. griseus* NRRL B-2682 törzs spórázását gátló *m*-aminofenil-boronsav (APBA) és 0.5 % kazein hidrolizátum (CH) hatása a törzs β -laktamáz enzim termelésére. A táblázatban feltüntetett adatokat három mérés átlagából számítottuk.

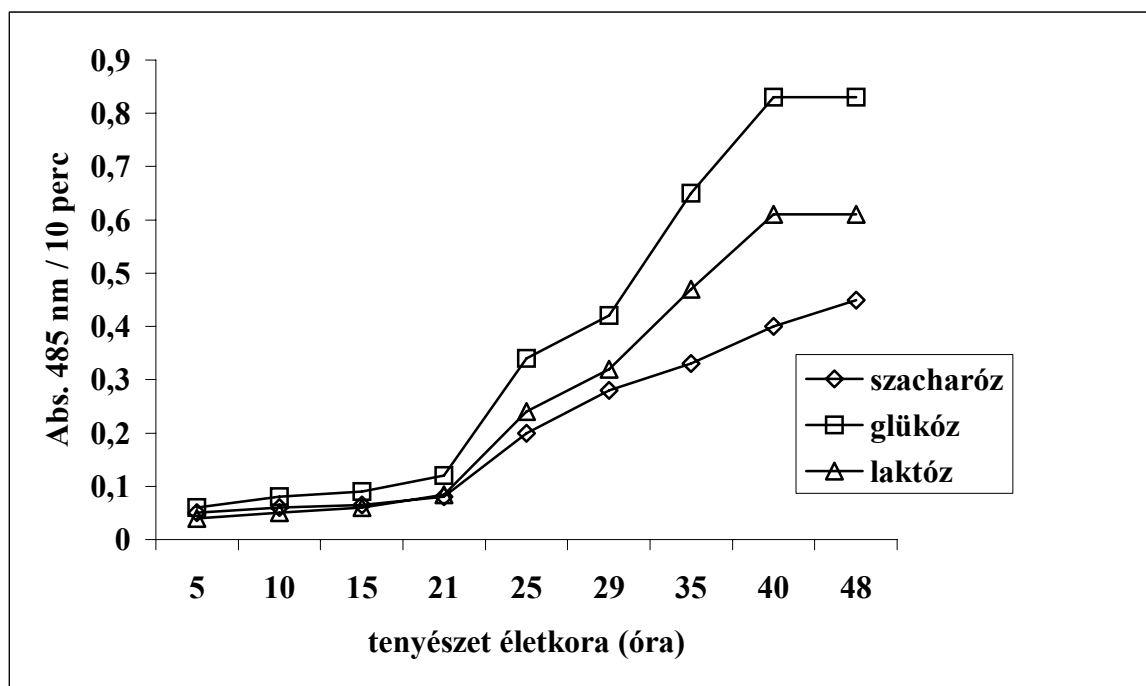
A β -laktamáz enzim megtisztításához szükséges optimális tenyésztési körülmények meghatározása

A következő lépésben azt tűztük ki célul, hogy megtisztítjuk a *S. griseus* törzs membránhoz kötött és a szekretált β -laktamáz enzimét. Elsőként természetesen ki kellett dolgozni azokat a feltételeket, amelyek mellett a legnagyobb β -laktamáz enzimprodukciónak mérhető, és amely feltételek a tisztítás szempontjából is a leghatékosabbak. Megvizsgáltuk hogyan hat az extracelluláris β -laktamáz enzim termelésére a tenyésztési paraméterek (táptalaj, szénforrás) változtatása. A *S. griseus* vad típusú törzsének spóráit 100-100 ml E9, szűrt szójas és DM folyadék táptalajra oltottuk le, majd ötóránként 1 ml-es mintákat vettünk a

tenyészetekből, és a felülúszóban NC szubsztrát felhasználásával megmértük a β -laktamáz aktivitást az Anyagok és Módszerek fejezetben leírtakat követve. A 15. ábrán látható, hogy a DM folyékony táptalajban még 48 órás korú tenyészetben is nagyon alacsony enzimaktivitás mérhető, szűrt szójas táptalajon jó az enzimprodukciónak, de maga a táptalaj sok fehérjét tartalmaz, ami megnehezítené az enzim megtisztítását. Az E9 táptalajon szintén magas β -laktamáz aktivitás volt mérhető a tenyészet extracelluláris terében, s mivel ez a médium nem tartalmaz szennyező fehérjét, ezen a táptalajon folytattuk tovább vizsgálatainkat. Következő lépésben megvizsgáltuk, hogy a különböző szénforrások alkalmazása mellett, milyen β -laktamáz enzimtermelés érhető el. A *S. griseus* törzset E9 folyékony táptalajban, szacharóz, laktóz és glükóz szénforrások mellett tenyésztettük, és az előbbiekkal teljesen azonos módon mértük a tenyészetek felülúszójában az enzimaktivitást. A 16. ábra mutatja, hogy a szacharózzal kiegészített táptalajon tenyésztett törzsben a β -laktamáz aktivitás közel fele, laktóz esetén körülbelül 2/3-a, mint amikor glükózt használtunk szénforrásként. Ezen ismeretek tükrében kísérleteinkhez E9 táptalajt használtunk és szénforrásként glükózt adtunk a médiumhoz.



15. ábra: A különböző táptalajokon (DM, E9, szűrt szójas) tenyésztett *S. griseus* NRRL B-2682 törzs tenyészetének felülúszójában mérhető β -laktamáz enzim aktivitás.



16. ábra: A különböző szénforrás (glükóz, szacharóz és laktóz) hatása az E9 táptalajon tenyésztett *S. griseus* NRRL B-2682 törzs extracelluláris β -laktamáz enzim termelésére.

β -laktamáz enzim indukálhatóságának vizsgálata

Egyes Gram-pozitív baktériumokban (*Bacillus*, *Staphylococcus*) a β -laktamáz enzim termelése indukálható különböző β -laktám szerkezetű vegyületekkel (69, 149), de az eddig vizsgált *Streptomyces* törzsek többségében a termelt β -laktamáz enzimek konstitutívan expresszált fehérjének bizonyultak. (106). Egy jól ismert kivétel a *S. cacaoi* 6-amino-penicillin savval (6-APA) indukálható β -laktamáz enzime, 6-APA adása után három órával kb. ötvenszeres enzimaktivitás növekedés mérhető az extracelluláris térben a *S. cacaoi* törzs tenyészetében (85).

Kísérleteink során számos β -laktám antibiotikumot teszteltünk, hogy képesek-e a *S. griseus* NRRL B-2682 törzsben a β -laktamáz enzim expresszióját indukálni. Először a leves-hígítási módszerrel, az Anyagok és Módszerek fejezetben leírtakat követve meghatároztuk a törzsre jellemző minimális inhibitor koncentrációt (MIC) a következő vegyületekkel szemben: benzilpenicillin, ampicillin, meticillin, oxacillin, cefalexin, cefamandol, cefoxitin, cefotaxim (3. táblázat). Ezt követően a *S. griseus* törzs spóráit DM mélytenyészetben ráztattuk, és a 4 órás tenyészethez MIC/3 koncentrációban hozzáadtuk az előbbi β -laktám antibiotikumokat. Kontrollként antibiotikummal nem kezelt, de teljesen azonos körülmények között rázatott *S. griseus* kultúra szolgált. A 26, 32 és 48 órás tenyészetekből vett minták felülúszójában mértük a

β -laktamáz aktivitást NC szubsztráttal (lásd módszertan). A β -laktamáz enzimprodukciónak egyik vegyület hatására sem növekedett a kontrollban mérhető értékhez képest ebben a törzsben. Ezt az eredményt táblázatban most nem mutatjuk be.

β -laktám antibiotikumok	MIC érték (μgml^{-1})
Benzilpenicillin	64
Ampicillin	32
Meticillin	16
Oxacillin	16
Cefalexin	16
Cefamandol	8
Cefoxitin	8
Cefotaxim	4

3. táblázat: A β -laktám antibiotikumok MIC értéke a *S. griseus* NRRL B-2682 törzsben. A MIC értékeket a leves-hígítási módszerrel, vizuálisan határoztuk meg.

A *S. griseus* NRRL B-2682 vad típusú törzs membránhoz kötött és szekretált β -laktamáz enzimének, valamint a *spoI* törzs membránba lokalizált β -laktamáz enzimének izolálása

Célul tűztük ki, hogy összehasonlítsuk a *S. griseus* NRRL B-2682 törzsből izolált extracelluláris és membránhoz kötött, valamint a *spoI* mutáns membránhoz kötött β -laktamáz enzimét. Ennek egy lehetséges módja az enzim megtisztítását követően az enzimre jellemző kinetikai paraméterek meghatározása. Így első lépésben közel homogenitásig tisztítottuk a β -laktamáz enzimet/et, a módszertani részben leírt eljárások felhasználásával.

Az extracelluláris β -laktamáz enzim tisztítása

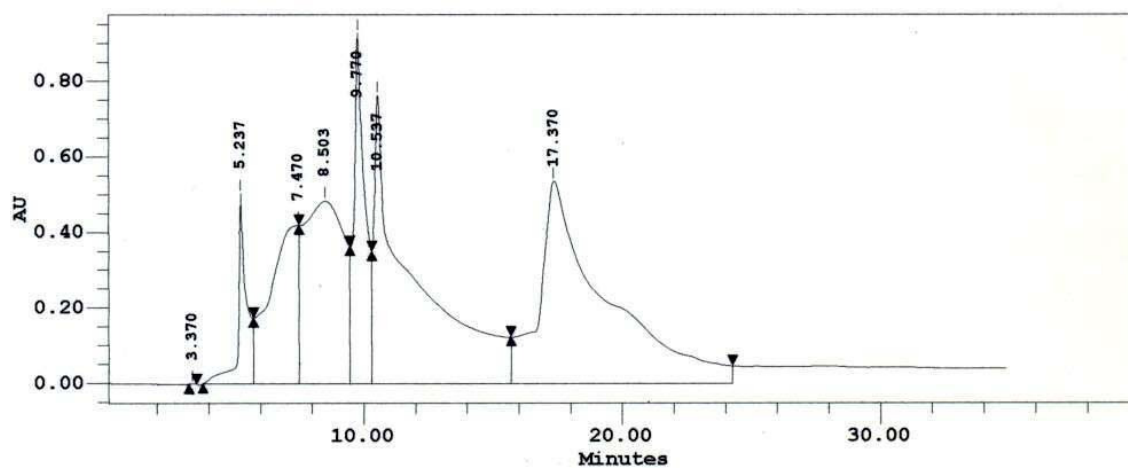
A vad típusú törzset a tisztítás szempontjából legideálisabbnak tartott E9 táptalajon, glükóz szénforráson növesztettük. A 40 órás korú tenyészetet centrifugáltuk (4000 G, 4 °C, 30 perc), és az így nyert, kb. 1500 ml felülúszóból indítottunk egy-egy tisztítási sorozatot. Az egyes lépések (koncentráció, fehérjék kicsapása $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -tal, kromatofókusálás, gélfiltráció) körülményeit az Anyagok és Módszerek fejezetben írtuk le.

*A membránhoz kötött β -laktamáz enzim izolálása**a *S. griseus* spórázó és nem spórázó törzsből*

A *S.griseus* NRRL B-2682 és a *spoI⁻* törzset GC folyékony táptalajon tenyésztettük, a 20 órás korú tenyészetből membránt preparáltunk, és ebből a mintából limitált tripszines emésztéssel nyertük a β -laktamáz enzimet tartalmazó preparátumot (lásd Anyagok és Módszerek fejezet). A vad és a mutáns törzs membránba lokalizált enzimét az extracelluláris enzim tisztításánál használt elválasztási technikákat (kromatofókuszálás, gélfiltráció) követve, teljesen azonos módon tisztítottuk.

1. kromatofókuszálás

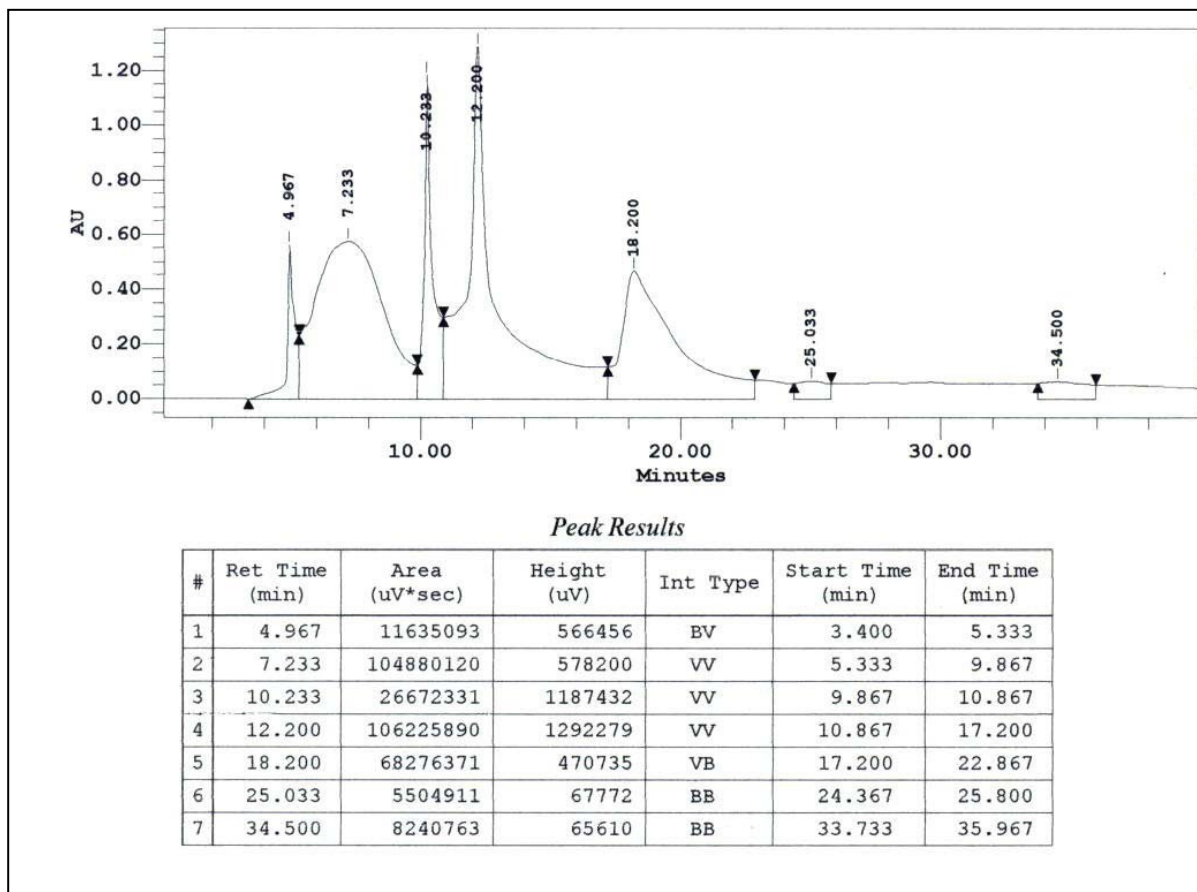
Első lépésben a *S. griseus* NRRL B-2682 törzs extracelluláris teréből nyert, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -tal, kicsapott, BioGel P6 oszlopon sómentesített, illetve a vad és a mutáns törzs membránjából tripszines emésztéssel kapott, β -laktamáz aktivitást mutató mintákat 0.075 M Tris/HCl pufferben vettük fel, és ebből 1-1 ml-t injektáltunk FPLC MonoP HR 5/20 kromatofókuszáló oszlopra (lásd Anyagok és Módszerek fejezet). A következőkben az eltérő lokalizációjú β -laktamáz enzimek kromatofókuszálással kapott kromatogramjait mutatjuk be. A vad típusú törzs szekretált β -laktamáza a 17.37 perc retenciós idejű csúcshoz tartozik (17/a ábra), a membránhoz kötött enzim 18.2 percnél eluálódott az oszlopról (17/b ábra). A mutáns esetében a 16.87 retenciós idejű mintában jelent meg a β -laktamáz aktivitás (17/c ábra). A kromatofókuszálás során szedett frakciókban mértük az oldatok pH értékét, s ezek alapján a fehérje izoelektromos pontja (IEP) 7.2-nek adódott valamennyi enzimforma esetében.



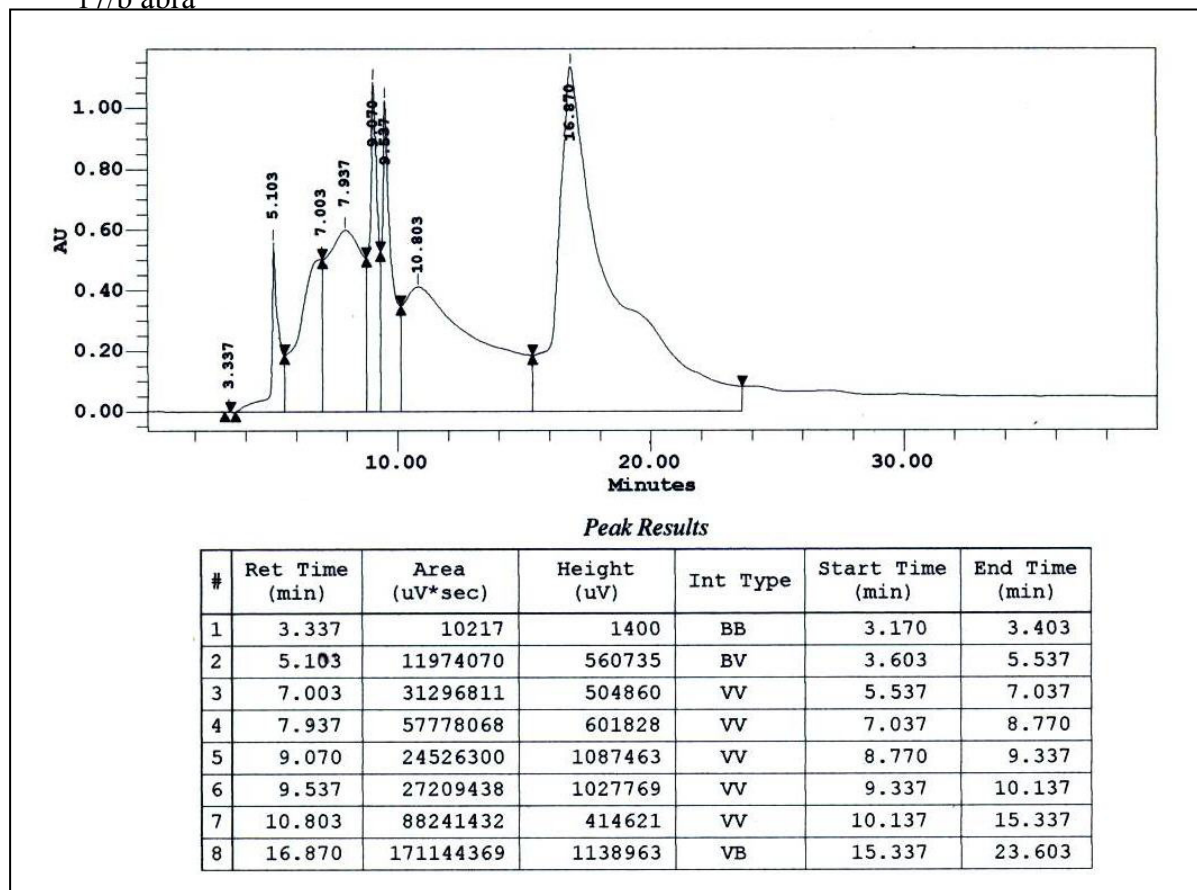
Peak Results

#	Ret Time (min)	Area (uV*sec)	Height (uV)	Int Type	Start Time (min)	End Time (min)
1	3.370	12603	1099	BB	3.237	3.537
2	5.237	11627956	506594	BV	3.770	5.737
3	7.470	32185358	421368	VV	5.737	7.503
4	8.503	52350930	486461	VV	7.503	9.470
5	9.770	27339418	930945	VV	9.470	10.303
6	10.537	79012786	766224	VV	10.303	15.703
7	17.370	96544869	539124	VB	15.703	24.270

17/a ábra



17/b ábra

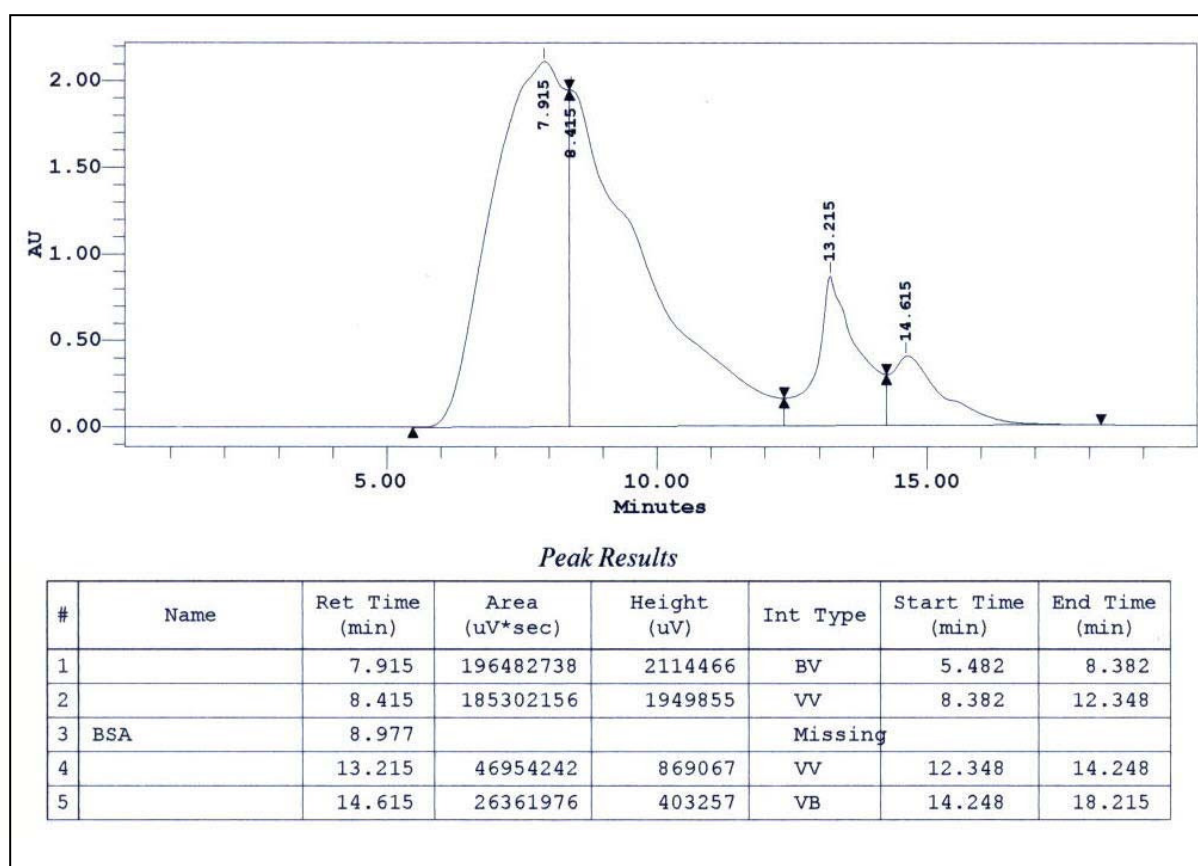


17/c ábra

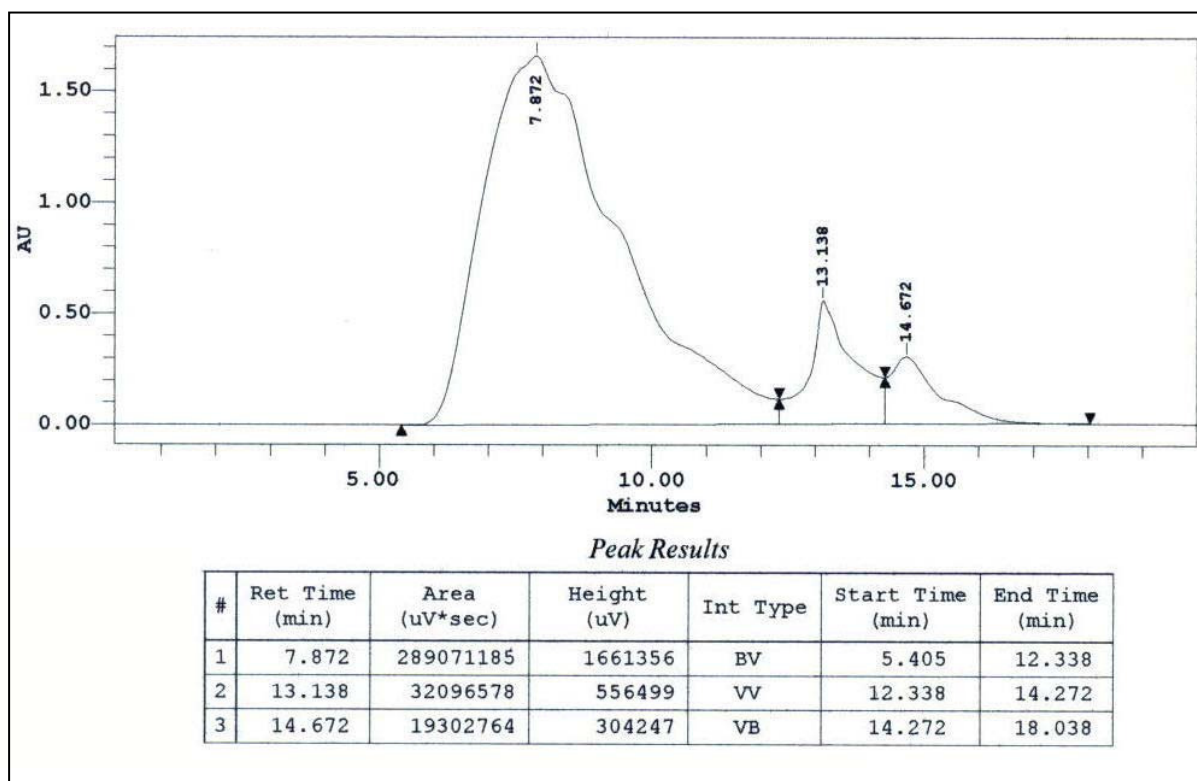
17. ábra: A β -laktamáz enzim izolálása kromatofókuszálással (Waters FPLC, MonoP HR 5/20 oszlop) a *S. griseus* vad típusú törzs extracelluláris teréből (a), a membránjából (b), és a *spoI* törzs membránjából (c).

2. géliszűrés

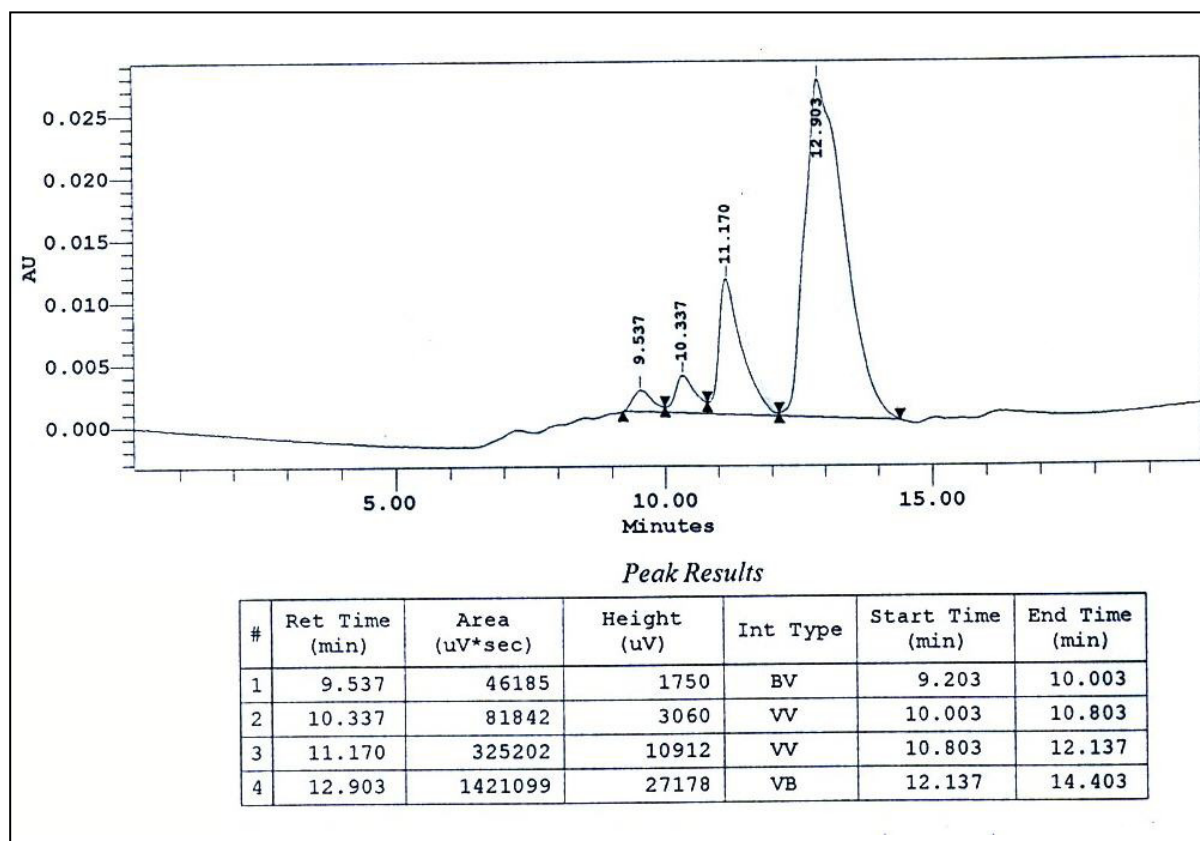
A kromatofókuszálást követően bekonzentráltuk a mintáinkat Amicon ultraszűrő membránon majd Centricon membránon keresztül és a bekonzentrált mintából 100 μ l-t injektáltunk FPLC Waters SW 200 géliszűrő oszlopra (lásd Anyagok és módszerek). A géliszűrő oszlopról eluált extracelluláris enzimaktivitás a 13.215 perc retenciós idejű csúcsához tartozik (18/a ábra). A membránhoz kötött enzimek géliszűrése során a vad típusú törzs enzime a 13.138 perces retenciós idejű mintában jelent meg (18/b ábra), a mutáns esetében a 12.903 percben (18/c ábra) eluált frakciók mutattak β -laktamáz aktivitást. Az oszlop mólusúly standardekkel történő kalibrálása alapján a fehérje móltömege megközelítőleg 31000 Da-nak bizonyult valamennyi enzimforma esetében.



18/a ábra



18/b ábra



18/c ábra

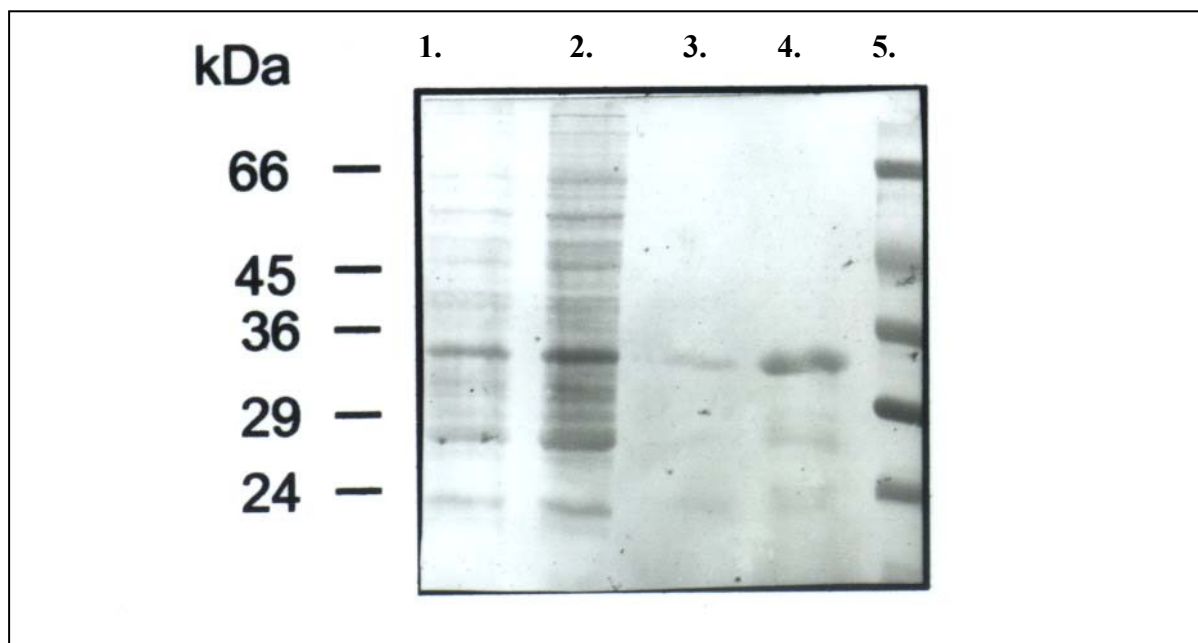
18. ábra: A *S. griseus* spórázó törzs tenyészetének felülúszójából (a), a sejtmembránból izolált enzim (b) és a nem spórázó, mutáns törzs membránhoz kötött β -laktamáz enzimének (c) kromatofókuszálást követő gélfiltrációval nyert kromatogramjait mutatjuk be.

3. SDS-poliakrilamid gélelektroforézis

A következő lépésben a *S. griseus* NRRL B-2682 törzs membránhoz kötött és extracelluláris β -laktamáz enzimének, valamint a *spoI*⁻ törzs membránba lokalizált enzimének géliszűrés során szedett, β -laktamáz aktivitást mutató frakcióit bekoncentráltuk Amicon majd Centricon ultraszűrő membránon. A koncentrált minták 1 ml-es részleteit az Anyagok és Módszerek fejezetben leírtak szerint kezeltük, és az így előkészített mintákat 13 %-os SDS-PAGE-en futtattuk meg. Az SDS-PAGE-t követően megfestettük a gél Comassie-Brillant-Blue festékkel. A tisztított fehérjék gélben mutatott relatív mobilitása alapján a β -laktamáz enzim valamennyi formájának a relatív molekulatömege kb. 31000 Da-nak bizonyult.

A *S. griseus* NRRL B-2682 törzsből izolált extracelluláris β -laktamáz enzim N-terminális szekvenciájának meghatározása

Szerettük volna meghatározni az izolált enzimek N-terminális aminosav szekvenciáját, így a következő lépésben az SDS-poliakrilamid gélből elektroforetikusan átblottoltuk a fehérjéket ProBlottTM membránra (lásd Anyagok és Módszerek fejezet). A *S. griseus* NRRL B-2682 extracelluláris és membránhoz kötött β -laktamáz enzimének Coomassie-Brillant-Blue festékkel festett elektroblottját mutatja a 19. ábra. A mutáns törzs membránhoz kötött enzimének megfestett elektroblott felvételét nem mutatjuk be.



19. ábra: A *S. griseus* vad típusú törzs extracelluláris és membránhoz kötött β -laktamáz enzimének elektroblott felvétele. **1., 2.** az extracelluláris preparátum kromatofókuszálást követően, **3.** a membránhoz kötött enzim gélszűrés után, **4.** a gélszűréssel tisztított extracelluláris enzim, **5.** mólsúlystandard

A *S. griseus* NRRL B-2682 törzs tenyészetének fermentlevéből, és a membránból tisztított β -laktamáz enzim Comassie-Brillant-Blue-val festett elektroblott analízise. Az egyes olszlopokban a következő tisztítási lépések után nyert minták láthatóak: 1, 2: az extracelluláris fehérje kromatofókuszálást követően, 3: a gélszűréssel tisztított membránhoz kötött enzim, 4: a gélszűréssel tisztított extracelluláris enzim, 5: mólsúly markerek.

A blottolást követően megfestettük a membránt Comassie-Brillant-Blue festékekkel (ábra), s ebből a mintából határoztuk meg az extracelluláris enzimfehérje N-terminálisán levő aminosavakat. A szekvencia analízis Edman degradáción alapult, a fehérje amino-terminális régióján a következő szekvenciát mutattuk ki: **AAADIPIANVNA**.

A 13 aminosavnyi szekvencia alapján a Swiss-Prot és a TrEMBL adatbázisokban homológ szekvencia keresést (BlastP search) végeztünk (Expasy Molecular Biology Server). Az általunk izolált β -laktamáz enzim N-terminálisa 81.8 % szekvencia homológiát mutat egy másik *S. griseus* törzsből már izolált és ismert D-aminopeptidáz enzim amino-terminálisán levő aminosavakkal, amelyeknek a következő a szekvenciája: **APDIPLANVKA** (92)

Ez a hasonlóság nem meglepő, hiszen mások is találtak olyan β -laktamáz enzimet, amely D-aminopeptidáz enzimmal mutat nagyfokú struktúrális hasonlóságot. Asano és munkatársai *Ochrobactrum anthropi*-ből olyan D-aminopeptidázt izoláltak, amelynek primer szekvenciája β -

laktamáz enzimhez hasonlít, β -laktám szerkezetű vegyületekkel gátolható, de maga az enzim nem mutat β -laktamáz aktivitást. (6). Ugyanez a munkacsoport *B. cereus*-ban olyan D-sztereospecifikus endopeptidáz enzimet mutatott ki, ami penicillin G-vel és ampicillinnel szemben β -laktamáz aktivitással bír, D-aminopeptidáz aktivitást nem mutat a megjósolt aminosav szekvenciája hasonlít *S. lactamdurans* és *B. cereus* PBP-jéhez, és C-osztályú β -laktamázokhoz. Ez alapján a penicillin felismerő enzimek szupercsaládjába sorolták őket (7)

Kíváncsiak voltunk, hogy az általunk izolált enzim rendelkezik-e D-aminopeptidáz aktivitással. Ennek eldöntésére az extracelluláris β -laktamázt tartalmazó, közel homogén enzimfrakciót D-Ala-*p*-nitroanilid szubsztráttal inkubáltuk, a módszertani fejezetben leírt eljárás szerint. A reakció lefolyását spektrofotométeren, 405 nm-es hullámhosszon követve nem mutatkozott abszorbancia növekedés, azaz a D-Ala-*p*-nitroanilid-ből nem keletkezett *p*-nitroanilid. Ezen eredményünk alapján feltételezzük, hogy a *S. griseus* NRRL B-2682 törzs β -laktamáz enzime nem mutat D-aminopeptidáz aktivitást.

A *S. griseus* NRRL B-2682 vad típusú törzs membránhoz kötött és szekretált, valamint a *spoI* törzs membránba lokalizált β -laktamáz enzimének jellemzése

Jól ismert, hogy a *Streptomyces* törzseknek több mint a fele termel β -laktamáz enzimet (106, 107), sőt *S. cacaoi* törzsekben két különböző enzim is kimutatható (70). Mindenekelőtt kíváncsiak voltunk arra, hogy a vad típusú törzsből izolált, eltérő lokalizációjú β -laktamázok különböző enzimek-e, vagy ugyanazon fehérje eltérően processzált formái. Ezen túlmenően össze kívántuk hasonlítani a spórázó illetve a nem spórázó, *spoI* törzsekből izolált β -laktamázokat. Az enzimek karakterizációjára a következő módszereket alkalmaztuk:

1. A β -laktamáz enzim szubsztrát profiljának meghatározása
2. Enziminhibítorok hatásának vizsgálata a β -laktamáz enzim működésére

1. A szubsztrát profil meghatározása

Elsőként azt teszteltük, hogy az általunk izolált enzimek, hogyan hidrolizálják a különböző β -laktám struktúrájú vegyületeket. A szubsztrát profil meghatározásához a Samuni által kidolgozott UV spektrofotometriás módszert alkalmaztuk (125). Enzimforrásként a gélszűrő oszlopról eluált, közel homogén enzim-preparátumot használtuk valamennyi enzimforma esetében. A β -laktamáz aktivitást mutató mintákat összegyűjtöttük, és meghatároztuk a fehérje

tartalmukat a Folin módszerrel. Szubsztrátként a következő vegyületeket használtuk: benzilpenicillin, ampicillin, cefaloridin, cefamandol, cefuroxim, cefotaxim, ceftazidim. A kiválasztott antibiotikumok végkoncentrációja 0.1 mM volt minden mérés során. A β -laktamáz enzim vad és a mutáns törzsből izolált formái a benzilpenicillint bontották a leggyorsabban, így a benzilpenicillinhez viszonyítottuk a többi szubsztrát hidrolízisének sebességét. A 4. táblázatban látható, hogy a vad típusú *S. griseus* törzs membránhoz kötött illetve szekretált enzimformája, valamint a *spoI*⁻ törzs β -laktamáza hasonló mértékben bontotta az ampicillint, a cefalosporinok közül az első generációs cefaloridin már sokkal gyengébb szubsztrátnak bizonyult, a második generációs cefamandolt kis mértékben, de bontotta az enzim, míg a cefuroximet valamint a harmadik generációs cefotaximet és ceftazidimet egyáltalán nem hidrolizálta egyik β -laktamáz enzim sem.

β -laktám szubsztrátok	<i>S. griseus</i> NRRL B-2682 extracelluláris β -laktamáz aktivitása (%)	<i>S. griseus</i> NRRL B-2682 membránhoz kötött β -laktamáz aktivitása (%)	<i>S. griseus spoI</i> ⁻ törzs membránhoz kötött β -laktamáz aktivitása (%)
Benzilpenicillin	100	100	100
Ampicillin	85	90	87
Cefaloridin	6.51	7.7	7.25
Cefamandol	18	15	16.5
Cefuroxim	1.1	0.5	0.55
Cefotaxim	0	0	0
Ceftazidim	0	0	0

4. táblázat: A β -laktamáz enzim szubsztrát profiljának meghatározása a *S. griseus* NRRL B-2682 vad típusú és a mutáns törzsében. A táblázatban a β -laktám antibiotikumok bontási sebességét hasonlítottuk össze, 100 %-nak véve a leggyorsabban hasítható benzilpenicillin bontását.

2/a. A β -laktamáz enzim gátlásának vizsgálata

A gátlási karakterisztika ugyanolyan fontos tényező a β -laktamáz enzimek megkülönböztetésében, mint az enzimek szubsztrát profiljának felvétele. Így a következőkben megvizsgáltuk különböző enzim inhibitorok hatását a β -laktamáz enzim aktivitására. Természetesen mind a három enzim, a *S. griseus* NRRL B-2682 membránhoz kötött és extracelluláris valamint a *spoI*⁻ törzs membránba lokalizált β -laktamázának aktivitás változását is követtük a következő gátlószerekkel szemben: NaCl, EDTA, *m*-aminofenil-boronsav (*m*-APBA), *p*-klórmerkuri-benzoát (*p*-CMB). A NaCl az oxacillint hidrolizáló enzimek működését gátolja, az EDTA mint kelátképző a metalloenzimek inhibitora. A *m*-APBA a katalitikus működésükhöz szerin aminosavat igénylő enzimek gátlószere, míg a *p*-CMB a ciszteint tartalmazó enzimek működését függeszti fel. Enzimforrásként a gélfiltráció során gyűjtött, aktív frakciókat használtuk, amelyekben Folin módszerrel megmértük a fehérje tartalmat. Az enzimpreparátumot a gátlószert megfelelő koncentrációban tartalmazó foszfát pufferhez mértük, és NC szubsztráttal határoztuk meg a β -laktamáz aktivitást (lásd Anyagok és Módszerek). Az egyes mintákban kiszámítottuk az enzim specifikus aktivitását, és a mérési eredményeinket a gátlószerezrel nem kezelt, kontrol enzimműködéshez viszonyítottuk. Az 5. táblázat mutatja a különböző gátlószerek hatását az enzimműködésére. A gátlószerek közül a *m*-APBA bizonyult a leghatékonyabb inhibitornak, 1 mM koncentrációban majdnem 50 %-kal csökkentette valamennyi enzimforma aktivitását. A NaCl (100 mM) valamint az EDTA (0.5 mM) egyáltalán nem volt hatással a β -laktamáz enzim aktivitására. A *p*-CMB 1 mM koncentrációjával szemben érzékeny volt a membránhoz kötött valamint az extracelluláris lokalizációjú β -laktamáz enzim. A *p*-CMB által okozott gátlást ekvimoláris mennyiségű ciszteinnel a kísérleti rendszerhez való hozzáadásával ki lehetett védeni. Mivel a *m*-APBA mintegy felére csökkentette az enzimaktivitást, feltételezhetjük, hogy a *S. griseus* 2682 törzs β -laktamáz enzimeinek aktív centrumában szerin aminosav található, a *p*-CMB gátló hatása arra utal, hogy ezen enzimek katalitikus működéséhez cisztein szükséges.

Gátlószerek és koncentrációjuk (mM)	<i>S. griseus</i> vad típusú törzs extracelluláris β -laktamáz aktivitása	<i>S. griseus</i> vad típusú törzs membránhoz kötött β -laktamáz aktivitása	<i>S. griseus spoI⁻</i> törzs membránhoz kötött β -laktamáz aktivitása
NaCl (100)	98	100	99
EDTA (0,5)	-	-	-
<i>m</i> -APBA (1)	52	53.5	52.6
<i>p</i> -CMB (1)	+	+	+
<i>p</i> -CMB + cisztein (1-1)	-	-	-

5. táblázat: A különböző, enzimműködést gátló vegyületek hatása a *S. griseus* vad típusú és a mutáns törzs különböző lokalizációjú β -laktamáz enzimének működésére. A NaCl és az *m*-APBA esetében a β -laktamáz enzim kontrollban mért specifikus aktivitásához viszonyított %-os enzimaktivitást, míg az EDTA és a *p*-CMB esetében a gátlószerezrel szembeni érzékenységet (+), illetve rezisztenciát (-) tüntettük fel.

2/b. β -laktamáz enziminhibitorok hatása a *S. griseus* törzs β -laktamáz enzimének aktivitására

A β -laktamáz enzimek specifikus gátlószerei közül a klavulánsav, a szulbaktám a cloxacillin és az aztreonám hatását vizsgáltuk meg a *S. griseus* vad típusú és a *spoI⁻* törzsek β -laktamáz enzimének működésére. A klavulánsav a természetben előforduló, gyenge antibakteriális hatással is rendelkező β -laktamáz gátló vegyület. Valójában egy öngyilkos inhibítor, ami β -laktám struktúrája révén az enzim aktív centrumába kötődik, és az enzim elbontja a β -laktám gyűrűjét. A szintén „öngyilkos” hatású szulbaktám egy penicillánsav szulfon származék, a monobactám szerkezetű aztreonám szintén β -laktám szerkezetű vegyület, így a β -laktamáz enzim aktív centrumába kötődve gátolják az enzim működését. A klavulánsav illetve az aztreonám és a szulbaktám gátló hatása közti differencia különösen jelentősnek bizonyult. Az aztreonám a cefalosporináz enzimeket sokkal erősebben gátolja, mint a klavulánsav, míg a széles spektrumú β -laktamázok és a penicillinázok általában kisebb affinitást mutatnak aztreonámmal mint a klavulánsavval szemben. A cloxacillin a β -laktamáz enzimek nagyon gyenge szubsztrátja, az enzim klasszikus kompetitív inhibítoraként viselkedik, valójában a cefalosporináz enzimek jó gátlószereként tartják számon (17). A *S. griseus* törzsekből izolált eltérő lokalizációjú β -laktamáz enzimeinek, a különböző enziminhibítor vegyületekre vonatkozó K_i értékét a Dixon által leírt eljárást követve határoztuk meg (lásd Anyagok és Módszerek fejezet).

Kísérleti eredményeinket a 6. táblázatban foglaltuk össze. A *S. griseus* NRRL B-2682 törzs β -laktamáz enzimének mindkét, membránhoz kötött illetve extracelluláris formája, valamint a mutáns törzs membránba lokalizált β -laktamáz enzime a klavulánsavval szemben mutatkozott a legérzékenyebbnek, kisebb mértékben gátolta az enzimeket a szulbaktám, míg az aztreonám és a cloxacillin alig befolyásolta működésüket. Mivel a klavulánsav és a szulbaktám olyan irreverzibilis, szuicid inhibitorok, amelyek sokkal nagyobb affinitással bírnak a penicillinázokkal, mint a cefalosporinázokkal szemben, feltételezzük, hogy az általunk izolált β -laktamáz enzimek penicillináz típusúak. Ez a gátlási profil jól korrelál a szubsztrát profil meghatározásakor kapott eredményekkel, amelyek szintén azt mutatták, hogy az izolált enzimek elsősorban a penicillint hidrolizálják.

	<i>S. griseus</i> NRRL B-2682 extracelluláris enzim	<i>S. griseus</i> NRRL B-2682 membránhoz kötött enzim	<i>S. griseus spoI</i> membránhoz kötött enzim
Szulbaktám	11.7 μ mól	9.8 μ mól	10.4 μ mól
Klavulánsav	4.5 μ mól	3.4 μ mól	4.2 μ mól
Cloxacillin	13 μ mól	12 μ mól	12 μ mól
Aztreonám	12 μ mól	13 μ mól	12 μ mól

6. táblázat: A különböző β -laktamáz inhibitorok hatása a *S. griseus* NRRL B-2682 és a *spoI* törzsből izolált, különböző lokalizációjú β -laktamáz enzimekre. A táblázatban a K_i értékeket tüntettük fel.

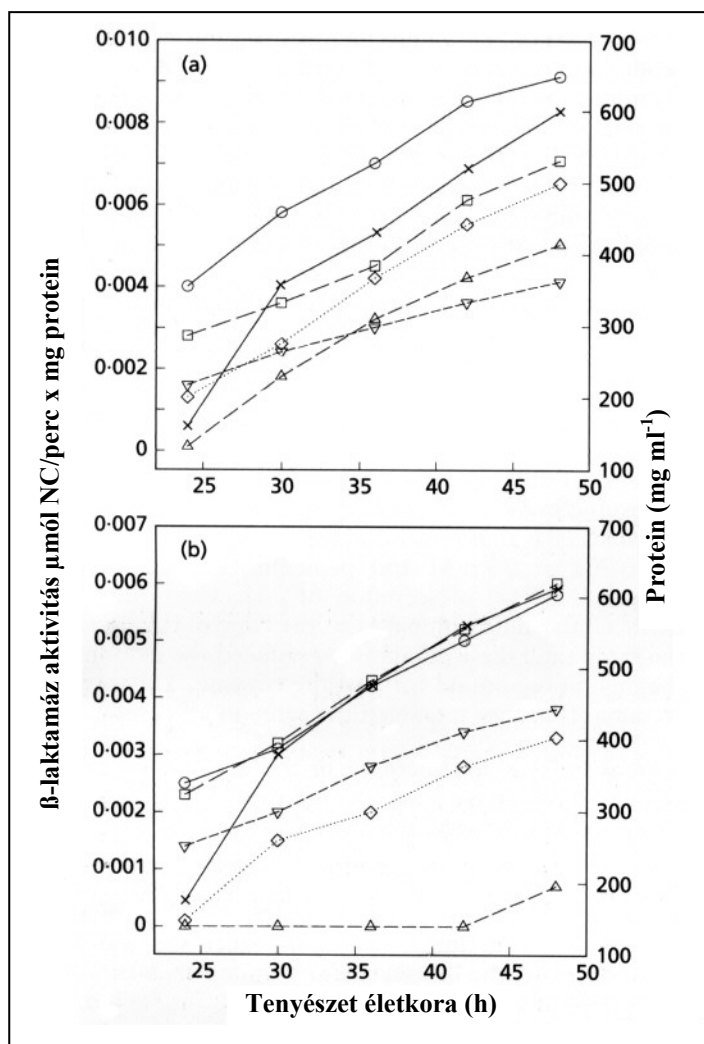
A globomycin hatása a *S. griseus* NRRL B-2682 törzs és a *spoI* törzs β -laktamáz enzim termelésére

B. licheniformis, *B. subtilis* és *S. aureus* fajokban olyan, az A osztályba tartozó penicillináz enzimeket írtak le, amelyeknek membránhoz kötött hidrofób, valamint szolubilis exoenzim formája is ismert (61). Bizonyították, hogy ezen β -laktamáz enzimeknek a lipofil módosítást hordozó N-terminális régiója a felelős az enzim membránhoz való kötődéséért. Baktériumokban a membrán lipoproteinek lokalizációjának vizsgálatára többek között a globomycin antibiotikumot használják. Ez egy ciklikus peptid vegyület, ami gátolja a prelipoproteinek érését, hatása specifikus a tioéter módosítást hordozó molekulákra.

Kíváncsiak voltunk, hogy a membránhoz kötött β -laktamáz enzim milyen típusú kötéssel kapcsolódik a sejtmembránhoz a *S. griseus* vad típusú és mutáns törzsében. Ennek a kérdésnek a

tisztázására a következő kísérletben megvizsgáltuk a globomycin β -laktamáz enzimlokalizációra kifejtett hatását. A spórázó és a *spoI⁻* mutáns törzseket DM folyékony minimál táptalajban növesztettük, a leoltást követő 5. órában hozzáadtuk a tenyészethez a globomycint $50 \mu\text{gml}^{-1}$ koncentrációban. A globomycinnel kezelt kultúrákban az inokulációt követő 24., 30., 36., 42., 48. órában vett mintákban NC szubsztrátot alkalmazva meghatároztuk a β -laktamáz enzim sejtmembránban valamint az extracelluláris térben mutatott specifikus aktivitását, és a teljes penicillináz aktivitást is. Ezeket az eredményeket globomycinnel nem kezelt, de teljesen azonos körülmények között tenyésztett, kontroll törzsekben mért β -laktamáz aktivitáshoz viszonyítottuk.

Mint a 20/a ábrán látható, a globomycin az alkalmazott $50 \mu\text{gml}^{-1}$ koncentrációban jelentősen megnövelte az enzim extracelluláris térbe történő kiválasztását a vad típusú törzsben, és ezzel párhuzamosan csökkent a plazmamembránba lokalizált enzim mennyisége, míg a totál penicillináz aktivitás nem változott. A vad típusú törzs globomycinnel kezelt tenyészetének felülúszójában már 24 órával a leoltást követően olyan magas enzimaktivitás mérhető, mint az antibiotikummal nem kezelt, kontroll spórázó törzs 30 órák korú kultúrájának felülúszójában. A *spoI⁻* törzsben tanulmányozva a globomycin antibiotikum hatását a β -laktamáz enzim termelésére, a következő eredményt kaptuk. Míg a nem spórázó törzs kontroll tenyészetében csak a membránban található meg a β -laktamáz enzim, a tenyésztés során nem szekretálódik a fermentlébe, addig $50 \mu\text{gml}^{-1}$ koncentrációjú globomycin jelentősen gátolta a membrán penicillináz akkumulációját, és segítette az extracelluláris forma szekrécióját, miközben a tenyészetben a teljes penicillináz aktivitás nem változott (20/b ábra). A két ábrát (20/a és 20/b) összehasonlítva látható, hogy a mutáns törzsben a globomycin által kiváltott β -laktamáz szekréció időpontja (kb. 30. óra) megegyezik a szolubilis enzimforma, vad típusú törzsben való megjelenésének az idejével. Az a tény, hogy a globomycin antibiotikum hatására a vad és a mutáns törzsben is megemelkedett a β -laktamáz enzim extracelluláris formájának mennyisége, valószínűsíti, hogy a β -laktamáz enzim egy membránhoz kötött lipoprotein a *S. griseus* NRRL B-2682 spórázó és a differenciálódásban mutáns törzsében is, és egy cisztein-glicerid tioéter kötés felelős az enzim membránba való rögzítéséért.



20. ábra: A globomycin antibiotikum hatása a β -laktamáz enzim termelésére a *S. griseus* vad típusú törzsben (a), és a nem spórázó mutánsban (b). A β -laktamáz aktivitást mértük a membrán frakcióban globomycin hiányában ($\square$) és jelenlétében (∇), és az extracelluláris térben globomycin nélkül ($\triangle$), és mellett ($\diamond$). A teljes penicillináz aktivitást (x) szintén meghatároztuk, erre a globomycin nem volt hatással. A minták fehérje tartalmát (o) a Folin reagenssel mértük.

A β -laktamáz enzimprodukciónak követésével párhuzamosan megfigyeltük a vad típusú és a mutáns törzsek globomycinnel kezelt és nem kezelt tenyészetének morfológiai differenciálódását is a tenyésztés során. A globomycin antibiotikummal kiegészített táptalajon növekvő, spórázó törzsből vett 30 órás korú mintákban fáziskontraszt mikroszkóp alatt már látható a spórafüzérek kialakulása, míg a kontroll tenyészetben csak a leoltást követő 36. órában jelentek meg a spóraláncok (ezekről a tenyészetekről készített felvételeket itt nem mutatjuk be). Ez az eltérés különösen azért érdekes, mert a spórafüzérek keletkezésének ideje mindkét tenyészetben megegyezik azzal az időponttal, amikor megnőtt az extracelluláris térben az enzimaktivitás. A

mutáns törzs tenyészetének extracelluláris terében globomycin hatására szintén megemelkedett a β -laktamáz enzim mennyisége, de az enzim szekrécióját nem kísérte spóráképződés.

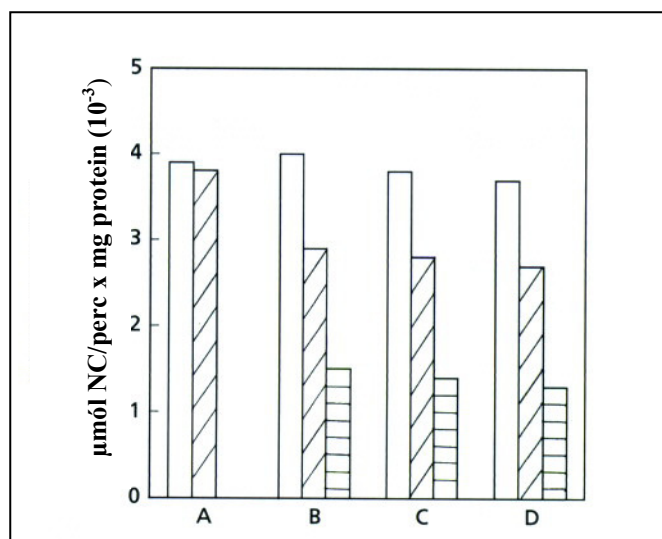
A β -laktamáz enzim termelés befolyásolása a *S. griseus* NRRL B-2682 törzsben

1. Tisztított és autolizinnel emésztett sejtfalpreparátum és $\text{Ac}_2\text{-L-Lys-D-Ala-D-Ala}$ hatása a β -laktamáz enzimprodukción

Irodalomból ismert, hogy a Gram-negatív baktériumok egy részében a β -laktamáz indukció a peptidoglikán sejtfal újrahasznosítással („recycling”) kapcsolt folyamat (54, 64, 65). Bizonyított, hogy *E. coli*-ban a muropeptidok intracelluláris koncentrációja szabályozza a β -laktamáz indukcióját (64, 65). Az AmpC transzkripciós regulátorát, az AmpR fehérjét a peptidoglikán szintézis citoplazmatikus intermedierje, az UDP-NacMur-pentapeptid gátolja. β -laktám antibiotikum jelenlétében azonban megnő a peptidoglikán degradáció egyik intermedierjének, az 1,6-anhidro-NacMur-tripeptidnek a mennyisége, ami aktiválja az AmpR-t, s ez a β -laktamáz indukciójához vezet. Ezen eredmények ismeretében mi is kíváncsiak voltunk arra, hogy hogyan változik a β -laktamáz enzimtermelés és az enzim lokalizációja a *S. griseus* törzsben, ha befolyásoljuk a muropeptidok koncentrációját. A peptidoglikán prekursorok β -laktamáz termelésben betöltött szerepének tisztázására a tisztított és autolizinnel emésztett sejtfalpreparátum, valamint a sejtfal analóg tripeptid, az $\text{Ac}_2\text{-L-Lys-D-Ala-D-Ala}$ hatását vizsgáltuk meg a *S. griseus* NRRL B-2682 törzsben.

Mint azt korábban említettük, a *S. griseus* vad típusú törzsének spóráit 0.5 % CH-mal kiegészített DM táptalajra leoltva nemcsak a normál differenciálódás lesz gátolt, hanem ezzel párhuzamosan elmarad a β -laktamáz enzim extracelluláris térbe történő kiválasztása is. Ezen ismeretek birtokában a következő kísérleti rendszert alakítottuk ki. A *S. griseus* NRRL B-2682 törzs spóráit 0.5 % CH-ot tartalmazó folyékony DM médiumra oltottuk le, és párhuzamos kísérletekben az egyes tenyészeteket kiegészítettük különböző koncentrációjú tisztított és autolizinnel emésztett sejtfalpreparátummal, vagy $\text{Ac}_2\text{-L-Lys-D-Ala-D-Ala}$ -val. Kontrollként olyan tenyészetet szolgált, melyet 0.5 % CH-ot tartalmazó DM táptalajban növesztettünk. A tenyészeteket 36 óráig ráztuk, és NC szubsztráttal mértük a penicillináz aktivitást a tenyészetek felülúszójában, a membrán frakcióban és a totál enzimaktivitást is meghatároztuk (lásd Anyagok és Módszerek fejezetben). A 21. ábráról leolvasható, hogy a 0.2 mg ml^{-1} koncentrációjú tisztított és autolizinnel emésztett sejtfalpreparátum, valamint 0.5 mM $\text{Ac}_2\text{-L-}$

Lys-D-Ala-D-Ala is megnövelte a β -laktamáz enzim extracelluláris térbe történő szekréciójának mértékét a kontroll kultúrához képest, amelyben az enzim szolubilis formája nem volt kimutatható. Ugyanakkor ezek a vegyületek jelentősen lecsökkentették a membránhoz rögzített enzimforma mennyiségét a nem kezelt tenyészetekhez képest, míg a tenyészetek teljes β -laktamáz aktivitása változatlan maradt.



21. ábra: Különböző vegyületek hatása a *S. griseus* NRRL B-2682 törzs spórázásában 0.5 % CH-mal gátolt tenyészetében a β -laktamáz szekréciójára. Meghatároztuk a teljes β -laktamáz aktivitást (□), a membránhoz kötött (▨), és az extracelluláris (▤) enzimaktivitást is a kontroll tenyészetben (A), az Ac₂-L-Lys-D-Ala-D-Ala-val (B), a tisztított sejtfal-preparátummal (C), valamint a penicillin G-vel (D) kiegészített tenyészetekben. Az adatok három független mérés eredményeinek átlagai.

2. A penicillin G hatása a *S. griseus* NRRL B-2682 törzs β -laktamáz enzim lokalizációjára:

Jól ismert, hogy a β -laktám antibiotikumok a PBP-hez kötődve gátolják a sejtfal szintézisét, s ez a peptidoglikán prekursorok extra- és intracelluláris koncentrációjának megváltozásához vezet, ami befolyásolja a β -laktamáz enzim termelését (64, 65). Kíváncsiak voltunk, hogy hogyan változik a β -laktamáz produkció a *S. griseus* törzsben, ha szubinhibitor koncentrációjú penicillinnel kezeljük a tenyészeinket. A *S. griseus* vad típusú törzsének 0.5 % CH-mal kiegészített, DM folyadék médiumban növesztett tenyészetéhez az inokulációt követő 5. órában különböző, MIC alatti koncentrációjú penicillin G-t adtunk. A 36 órás korú tenyészet

felülúszójában, membránjában, és a teljes tenyészetben az előző részben leírtakkal teljesen azonos módon meghatároztuk a β -laktamáz enzim aktivitást, és ezt a penicillinnel nem kezelt, kontroll tenyészetekben mért enzimműködéshez hasonlítottuk. Ahogy az a 21. ábrán látható, a $35 \mu\text{gml}^{-1}$ koncentrációjú penicillin G hatására megjelent a tenyészetek felülúszójában az enzim szolubilis alakja, szemben a kontroll tenysézzel, amelyben csak a membránhoz kötött forma volt detektálható. Erről az ábráról az is leolvasható, hogy a penicillin G-vel kezelt tenyészetekben az extracelluláris aktivitás megjelenésével párhuzamosan csökkent a membránban lokalizált enzim mennyisége, de a teljes penicillináz aktivitásra nem volt hatással az antibiotikum.

A *S. griseus* NRRL B-2682 törzs DM mélytenyészetben ugyancsak kb. 48 óras korban kezdődik el a sejtek lízise, ennek ellenére felvetődött bennünk a kérdés, hogy az extracelluláris térben a 36. órában megnőtt β -laktamáz aktivitás nem lehet-e a sejtek lízisének következménye. Ennek ellenőrzésére a következő kísérletet végeztük el. A glutamin-szintetáz (GS) egy olyan enzim, ami ebben a törzsben szigorúan csak az intracelluláris térben található meg (117). Így a GS aktivitás mérése ideális módszernek mutatkozott az előbbi probléma tisztázására. A GS aktivitás kimutatására a γ -glutamiltranzsferáz esszét választottuk (lásd Anyagok és Módszerek fejezet). A GS aktivitást mértük a *S. griseus* NRRL B-2682 törzs 0.5 % CH-mal kiegészített DM mélytenyészetben, illetve azokban a kultúrákban, amelyek 0.2 mgml^{-1} tisztított és autolizinnel emésztett sejtfalfragmenseket, 0.5 mM $\text{Ac}_2\text{-L-Lys-D-Ala-D-Ala-t}$ illetve $35 \mu\text{gml}^{-1}$ penicillin G-t tartalmaztak. A 36 óras korú micéliumból készített minden mintában mérhető volt a GS aktivitás, ám az extracelluláris térben egyik esetben sem volt kimutatható az enzimműködés. Ez azt bizonyítja, hogy az extracelluláris β -laktamáz aktivitás nem a sejtek lízisének a következtében jelent meg. Ezek az eredmények alátámasztják azt az elképzelésünket, hogy a β -laktamáz enzim extracelluláris térbe történő kiválasztása a differenciálódási programtól függően szabályozott esemény a *S. griseus* NRRL B-2682 törzsben.

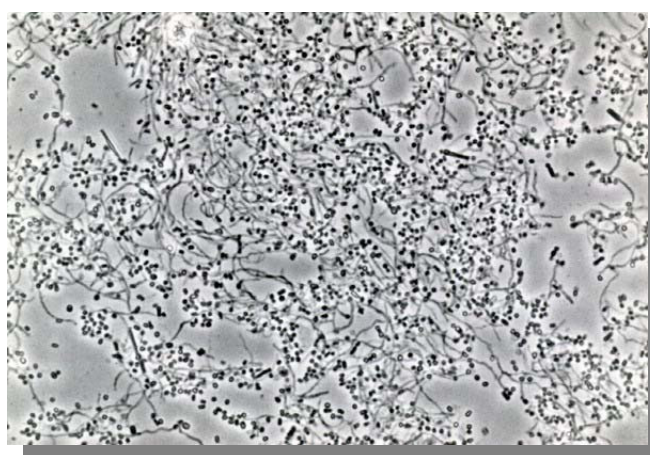
A *S. griseus* NRRL B-2682 törzs morfológiai differenciálódásának befolyásolása szilárd felszínű tenyészetekben

β-laktám szerkezetű vegyületek hatásának tanulmányozása

S. griseus NRRL B-2682 törzsben tanulmányozva a penicillin G β-laktamáz enzim termelését befolyásoló hatását, nagyon érdekes megfigyelést tettünk. A *S. griseus* 0.5 % CH-mal kiegészített DM médiumban, tehát spórázásában gátolt körülmények között növesztett tenyészetében a penicillin G MIC-tól kisebb koncentrációban nemcsak az enzimtermelést változtatta meg, hanem a törzs differenciálódását is befolyásolta. A penicillin G differenciálódásra kifejtett hatásának bemutatására a következő kísérletet végeztük el. A gradient plate/gradioens lemez módszert használva 0.5 % CH-ot és 100 µgml⁻¹ penicillin G-t is tartalmazó DM agar táptalajból egy ferde réteget öntöttünk Petri csészébe (31), és ezt a réteget olyan 0.5% CH-t tartalmazó DM táptalajjal borítottuk be, amelybe nem tettünk antibiotikumot. Az így készített, folyamatosan változó koncentrációjú penicillin G antibiotikum gradienst (0-100 µgml⁻¹) tartalmazó DM táptalajra leoltottuk a *S. griseus* spóráit, 27 °C-on termosztátban tenyésztettük, és figyeltük a törzs növekedési folyamatát. A penicillin gradiens *S. griseus* tenyészetének morfológiai differenciálódására kifejtett hatását mutatja a 22. ábra. A 48 órás korú tenyészeetről készített felvételen jól látható, hogy a nagy koncentrációjú antibiotikum teljesen meggátolta a törzs növekedését, még a spórák csírázását is (a lemez jobb oldala). A Petri csésze bal oldalán a legalacsonyabb koncentrációjú penicillin G hatását figyelhetjük meg. Alacsony koncentrációban az antibiotikum egyáltalán nem befolyásolta a törzs növekedését, itt a 0.5 % CH spórázást gátló hatása érvényesül. Legérdekesebb azonban a szubinhibítor koncentrációjú penicillin G differenciálódásra kifejtett hatása. A 36 órás korú tenyészetben a penicillin G MIC alatti koncentrációban visszaállította a légmicélium képzést, amit a lemez középső részén húzódó keskeny fehér szín jelez. Az erről a területről vett mintában fáziskontraszt mikroszkóp alatt már spóráképződés figyelhető meg, 48 órával a leoltást követően (23. ábra)



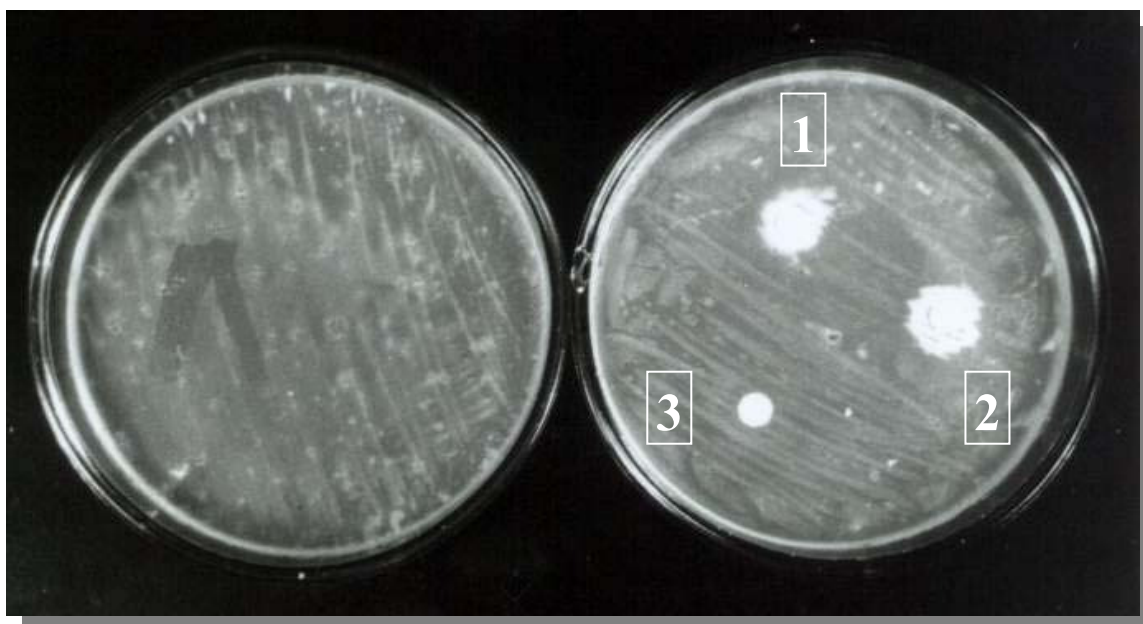
22. ábra: A penicillin G *S. griseus* NRRL B-2682 differenciálódására gyakorolt hatásának bemutatása a gradiens-lemez módszerrel.



23. ábra: A *S. griseus* NRRL B-2682 törzs tenyészetében a penicillin G antibiotikum hatására képződött spórák fáziskontraszt mikroszkópos felvétele. A mintákat a gradiens lemez középső részéről nyertük.

Irodalomból és saját eredményeinkből is ismert, hogy a *S. griseus* törzs differenciálódása kb. a 16-18. óras életkorig befolyásolható, eddig az időpontig a sejtek elkötelezetté válnak a sporulációra. Kíváncsiak voltunk, hogy a penicillin G spórázást befolyásoló hatása mutat-e ilyen életkor függést, így a következő agar-diffúziós tesztet végeztük el. A *S. griseus* spóráit 0.5 % CH tartalmú DM agar médiumra oltottuk le, és az életciklus 5. órájában olyan steril papírkorongokat helyeztünk a Petri csésze felületére, amelyeket különböző koncentrációjú penicillin G-vel itattunk át, a 24 órás tenyészetet hasonló módon kezeltük penicillinnel. A tenyészeteket 27 °C-on

termosztátban növesztettük, és figyeltük a törzs életciklusát. Ebben a kísérletben is jól nyomon követhető a penicillin G morfológiai differenciálódást befolyásoló hatása. A *S. griseus* 36 órás tenyészetéről készített felvételen látható, hogy a 27 illetve 34 nmól penicillin G kiváltotta a légmicélium képzést, ezt az antibiotikumot tartalmazó papírkorong körül megjelenő fehér szín jelzi (24. ábra). Az erről a területről vett minták fáziskontraszt mikroszkópos analízise azt mutatja, hogy a 48 órás tenyészetben már a spóráképződés is megindult az antibiotikum hatására (az erről készült felvételt itt nem mutatjuk be). Nagyon fontos azonban, hogy a penicillin G csak akkor idézett elő morfológiai változásokat, ha leoltás után 5 órával helyeztük a korongot az agar felszínre. A 24 órás sejtekhez adott 34 nmól penicillin G azonban már hatástalannak bizonyult, nem váltotta ki sem a légmicélium-, sem a spóráképződést a törzs tenyészetében.



24. ábra: A penicillin G differenciálódásra kifejtett életkor-függő hatásának szemléltetése agar-diffúziós teszttel, a *S. griseus* spórázásában gátolt tenyészetében. A bal oldali felvételen a kontroll tenyészet látható, jobb oldalon az 5 órás korban 27 nmól (1), 34 nmól (2), és a 24 órás korban (3) 34 nmól penicillin G-vel kezelt *S. griseus* NRRL B-2682 tenyészetet mutatjuk be.

A következőkben azt vizsgáltuk, hogy egyéb, de β -laktám szerkezetű antibiotikumok is visszaállítják-e a *S. griseus* törzs differenciálódását, ha gátoljuk a törzs spórázását. A törzs spóráit ismét 0.5 % CH-mal kiegészített DM agar médiumra oltottuk le, és az agar-diffúziós tesztet alkalmazva tanulmányoztuk külön-külön az ampicillin, a cefaloridin és a cefamandol hatását. Az antibiotikummal átitatott steril papírkorongokat, amelyeken az egyes antibiotikum koncentrációja a MIC értéknél kisebb, a Petri csésze agar felületére helyeztük a leoltást követő 5.

és 24. órában. Ebben a kísérletben 25 nmól ampicillin, 24 nmól cefaloridin illetve 14 nmól cefamandol megszüntette a CH differenciálódást gátló hatását, a korong közelében ismét fehér szín jelezte a légmicélium keletkezését (25. ábra). Az erről a területről nyert mintákat fáziskontraszt mikroszkóppal tanulmányozva, a spórafüzérek megjelenését láthattuk a 48 órás korú tenyészetben. Az ampicillin a cefaloridin és a cefamandol a penicillinhez hasonlóan életciklus függő hatást mutatott, csak az 5. órában adva idézett elő morfológiai változást, 24. órában már hatástalannak bizonyult mindhárom antibiotikum (az erről készült felvételt itt nem mutatjuk be).



25. ábra: Az ampicillin (1), a cefamandol (2), és a cefaloridin (3) hatásának vizsgálata a spórázásában gátolt *S. griseus* NRRL B-2682 tenyészetében.

A fentiekkel teljesen megegyező körülmények mellett teszteltük a 6-APA-nak, mint a penicillin inaktív prekurzorának a hatását is a *S. griseus* növekedésére. A 0.5 % CH-mal kiegészített DM agar táptalajon növekedő, 5 és a 24 órás korú tenyészetek felszínére olyan steril papírkorongokat helyeztünk, amelyek 54, 108 illetve 162 nmól 6-APA-t tartalmaztak, és követtük a törzs differenciálódását. A *S. griseus* 48 órás tenyészetében azonban sem a korai-exponenciális, sem a stationer növekedési szakaszban adott 6-APA nem indukálta a légmicéliumok képződését, és a spóráképzést sem. Erről a tenyészetéről készített felvételeket a dolgozatban nem mutatjuk be.

A peptidoglikán sejtfalat alkotó peptidek differenciálódásra gyakorolt hatása

Több más Gram-pozitív baktériumban is kimutatták, hogy a sejtfalszintézis állapota szignálként szolgál a sejt differenciálódási folyamatának a szabályozásában (73, 132). Korábban egy munkacsoport olyan nem spórázó, mutáns *B. subtilis* törzset izolált, ahol a mutáció egy olyan, 5 génből álló operonban található, ami a Gram-negatív baktériumok oligopeptid-transzport rendszerével (Opp) mutat homológiát (119). Az Opp rendszerek fő szerepe a Gram-negatív baktériumokban a növekvő peptidoglikán sejtfal turn-over-e során felszabadult intermedierek visszaszállítása a citoplazmába (54). Ezen ismeretek birtokában, és saját kísérleti eredményeink tükrében feltételeztük, hogy a *S. griseus* NRRL B-2682 törzsben is lehetséges ilyen kapcsolat a sejtfalszintézis és a differenciálódás között, így a következő kísérleteket végeztük el. Agardiffúziós módszerrel, az előzőkkel teljesen azonos körülmények között megvizsgáltuk, hogy a sejtfalban található peptideket, mint pl. a D-Ala-D-Ala-t, Ac₂-L-Lys-D-Ala-D-Ala-t és a szintén sejtfal komponens N-acetilmuraminsavat külön-külön adva a tenyészethez, milyen változások következnek be a törzs differenciálódásában. A *S. griseus* törzset 0.5 % CH-mal kiegészített DM agar médiumra oltottuk, hogy gátoljuk a törzs légmicélium és spóráképzését. A sejtfalat alkotó peptidekből készített törzsoldatokból 0.1, 0.2, illetve 0.4 µmóllal átitatott steril papírkorongokat a Petri csésze felszínére helyeztünk a leoltást követően, és a tenyészeteket 27 °C-on termosztátban növesztve követtük a törzs életciklusa során bekövetkező változásokat. 0.2 µmól D-Ala-D-Ala, 0.2 µmól Ac₂-L-Lys-D-Ala-D-Ala és 0.4 µmól N-acetilmuraminsav visszaállították a törzs szabályos differenciálódását, a 36 órás tenyészetben a papírkorong körüli fehér mező mutatta a légmicéliumok keletkezését. Az erről a területről vett mintákat megvizsgáltuk fáziskontraszt mikroszkóp alatt, és a 48 órás tenyészetben már látható a spórafüzérek kialakulása. Kontroll kísérletekben olyan aminosavakkal (triptofán, hisztidin, cisztein) kezeltük a *S. griseus* tenyészetét, amelyek nem találhatóak meg a sejtfalban. A fentiekkel teljesen megegyező körülmények között, spórázásában 0.5 % CH-mal gátolt DM agaron ezen vegyületek 0.1, 0.2, és 0.4 µmól-ja teljesen hatástalannak bizonyultak, nem tapasztaltuk az eredeti fenotípus visszaállítását egyik esetben sem.

A peptidoglikán sejtfal szintézisét gátló antibiotikumok hatásának vizsgálata

Ezen eredmények ismeretében logikusnak tűnt megvizsgálnunk azt, hogy a sejtfal szintézis különböző lépéseinek gátlása milyen hatással lehet a törzs életciklusára. Különböző antibiotikumokat használva lehetséges a sejtfal bioszintézis egyes lépéseinek a gátlása, ilyen

vegyületek a vancomycin, a bacitracin, a foszfonomycin és a cikloszerin antibiotikumok. A *S. griseus* spóráit 0.5 % CH-mal kiegészített DM agar táptalajra oltottuk le, és az agar-diffúziós módszerrel teszteltük a sejtfalszintézist gátló anyagok hatását. A Petri csésze közepére, az agar lemezbe vájt lyukakba különböző koncentrációjú antibiotikumot tettünk 5 órával a leoltás után, és figyeltük a tenyészetben bekövetkező morfológiai változásokat. 3×10^{-4} μmol vancomycin már visszaállította a spórázásában gátolt *S. griseus* légmicélium képzését, ezt 36 órás tenyészetben a Petri csésze közepén látható fehér szín jelzi (26. ábra). Az erről a területről vett minták fáziskontraszt mikroszkópos vizsgálata spórák megjelenését mutatta már 36 órás korban is, a 48 órás tenyészetben már spórafüzérek képződése is látható. Érdekes módon a sejtfalszintézis korábbi lépéseit gátló antibiotikumok esetében nem tapasztaltunk hasonló változást, 3.5×10^{-4} μmol bacitracin, 3.6×10^{-4} foszfonomycin és 4.8×10^{-4} μmol cikloszerin egyáltalán nem befolyásolta a törzs differenciálódását. Nagyobb koncentrációknál az antibiotikumnak inkább a növekedést gátló hatása érvényesült (felvételeket nem mutatjuk be).

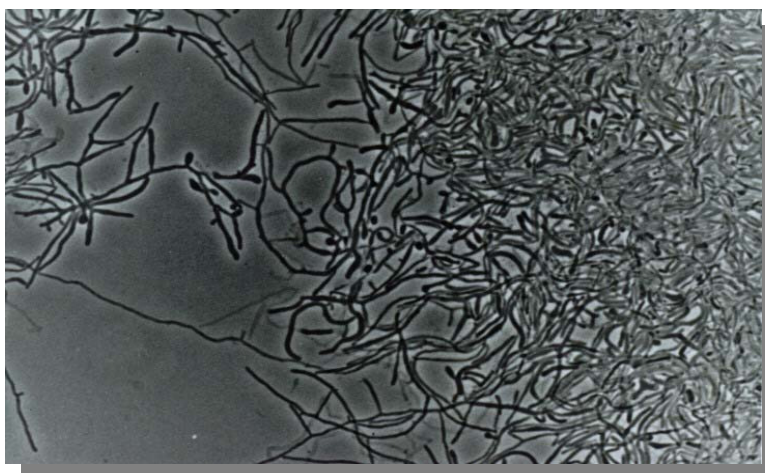


26. ábra: A morfológiai differenciálódás befolyásolása vancomycin antibiotikummal a *S. griseus* NRRL B-2682 törzs tenyészetében, spórázást represszáló körülmények mellett. A felvételt a 36 órás korú tenyészetéről készítettük.

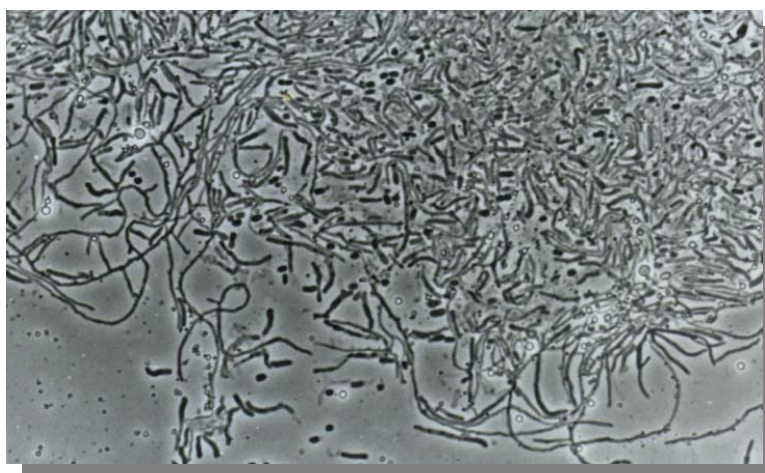
Penicillin G, Ac₂-L-Lys-D-Ala-D-Ala, az N-AcMur-L-Ala-D-isoglutamin (adjuváns peptid) és a tisztított és autolizinnel emésztett sejtfal fragmensek hatása a *S. griseus* NRRL B-2682 törzs differenciálódására folyadék tenyészetben

A *Streptomyces* törzsek többségével ellentétben a *S. griseus* folyadék tenyészetben is képez spórákat, így megvizsgáltuk a penicillin G hatását mélytenyészetekben is. Sporulációban gátolt körülmények mellett, azaz 0.5 % CH tartalmú DM folyékony médiumban növesztett *S. griseus* sejtekhez, az inokulációt követő 5. órában hozzáadtuk a penicillin G antibiotikumot különböző koncentrációkban. Kontroll kísérletként 0.05 (27/e ábra) és 0.5 % CH-mal (27/f ábra) kiegészített DM táptalajon is tenyésztettük a törzset. A leoltást követő különböző időpontokban (36, 48, 60, 72 óra) vett mintákat fáziskontraszt mikroszkóp alatt tanulmányoztuk, hogy kövessük a törzs fejlődését. A mikroszkópos felvételeken látható, hogy a penicillin G szubinhibitor 35 µgml⁻¹ koncentrációban helyreállította a törzs szabályos differenciálódását, bár a spórázás kb. 60 órás korban indult meg, 24 órával később a normál életciklushoz képest (27/a ábra).

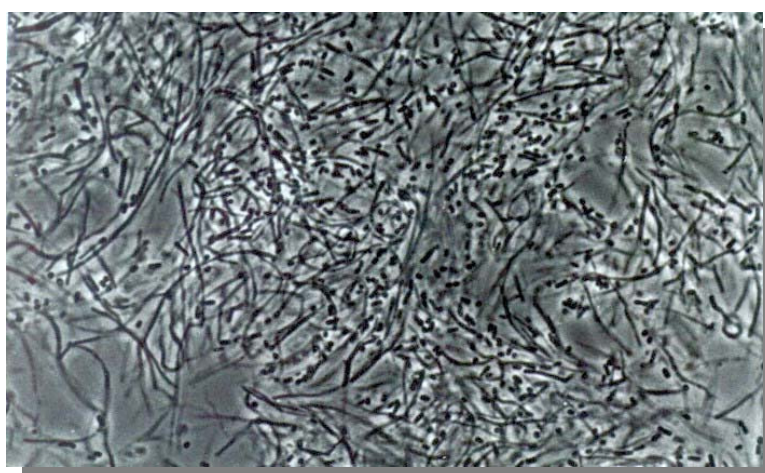
Ezek után megvizsgáltuk, hogy az Ac₂-L-Lys-D-Ala-D-Ala, az N-AcMur-L-Ala-D-isoglutamin (adjuváns peptid) és a tisztított és autolizinnel emésztett sejtfal fragmensek befolyásolják-e a *S. griseus* törzs differenciálódását. A *S. griseus* spóráit 0.5 % CH-mal kiegészített folyékony DM táptalajban tenyésztettük, és az 5 órás korú sejtekhez adtuk az előbbi vegyületeket különböző koncentrációkban. A spórázást represszáló körülmények között tenyésztett törzsben 0.2 µmol Ac₂-L-Lys-D-Ala-D-Ala (27/b ábra), 0.25 µmol adjuváns peptid (27/c ábra) és 0.1 mgml⁻¹ koncentrációjú emésztett és tisztított sejtfal fragmensek (27/d ábra) hatására megjelentek az érett spórák is, de a spórázás csak 24 órával később indult meg, mint a 0.05 % CH-ot tartalmazó, kontroll tenyészetben (27/e ábra). Teljesen azonos körülmények mellett olyan aminosavak (hisztidin, cisztein, triptofán) hatását is megvizsgáltuk, amelyek nem vesznek részt a peptidoglikán felépítésében. Ezen aminosavakból azonban még 0.4 µmol sem függesztette fel a CH spórázást gátló hatását, még a 72 órás tenyészetekben sem.



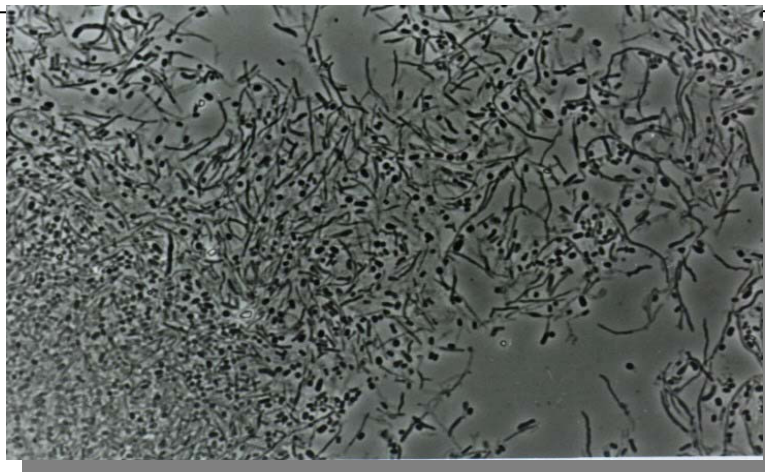
(a)



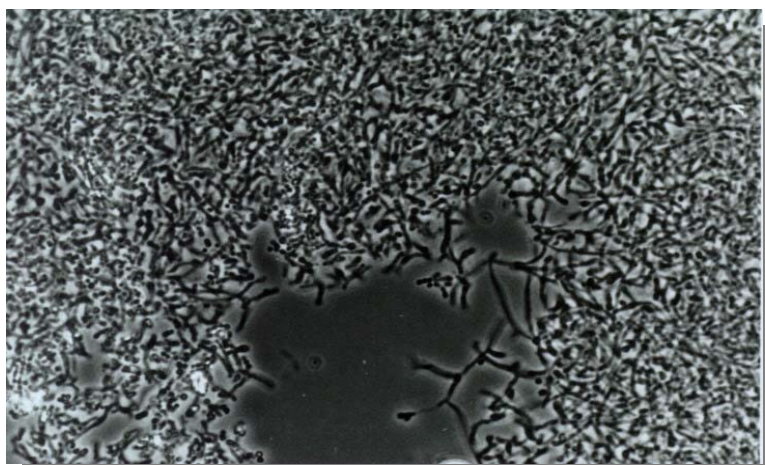
(b)



(c)



(d)



(e)



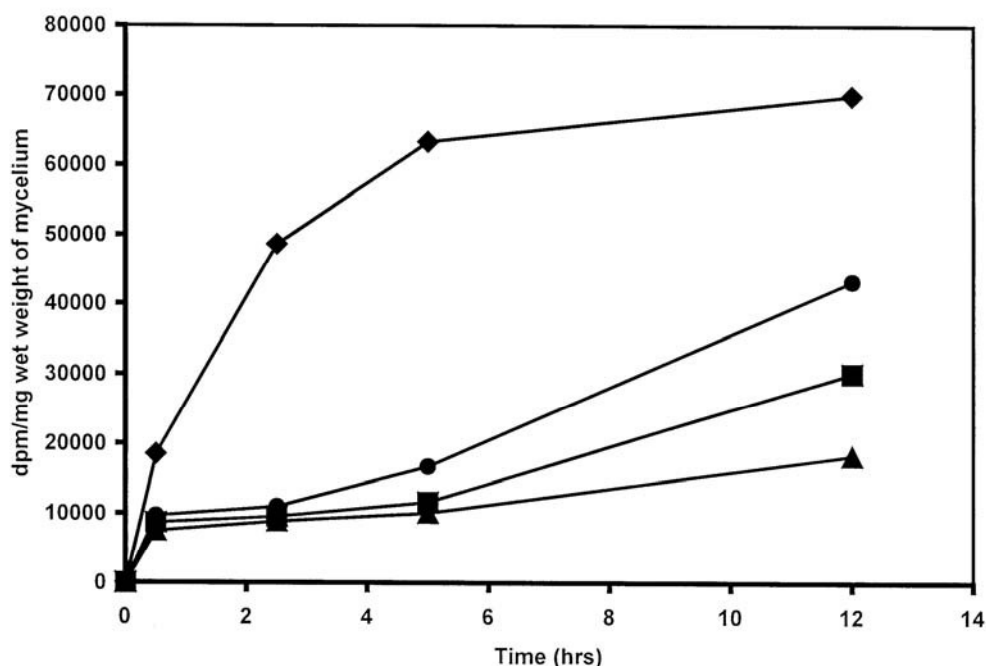
(f)

27. ábra: Penicillin G (a), Ac₂-L-Lys-D-Ala-D-Ala (b), N-AcMur-L-Ala-D-isoglutamin (adjuváns peptid) (c), valamint tisztított és autolizinnel emésztett sejtfa fragmentumok (d) hatása a *S. griseus* NRRL B-2682 törzs differenciálódására folyadék tenyészetben, a spórázást felfüggesztő körülmények között. Kontroll kísérletben a *S. griseus* törzset 0.05 % (e) és 0.5% CH-mal (f) kiegészített DM táptalajban tenyésztettük.

A BÉTA-LAKTÁM ANTIBIOTIKUMOK ÉS IONOFÓROK HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA

A Gramicidin D ionofór hatása a *S. griseus* NRRL B-2682 törzs sejtfal turnover-re és membránpotenciáljára

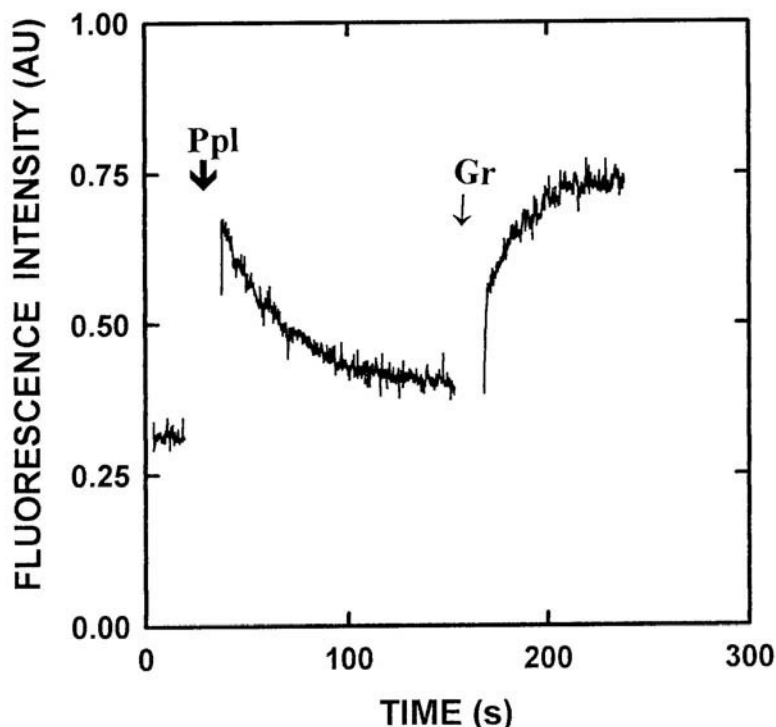
Irodalmi adatokból ismert, hogy a plazmamembrán energia állapota fontos faktor az autolizinek működésének regulációjában (38, 67). Munkánk során arra szerettünk volna választ találni, hogy van-e szerepe a citoplazma membrán energetikai állapotában bekövetkező változásnak a sejtfal autolízisének kiváltásában. Ennek eldöntésére először a *S. griseus* törzs tenyésztésében megvizsgáltuk a penicillin G és a gramicidin D hatását [^3H]-N-acetilglükózaminnal jelzett sejtfalfragmentek felszabadulására. A *S. griseus* spóráit DM médiumban tenyésztettük, a 10 órás, korai exponenciális-növekedési stádiumban levő tenyészetet 0.1 mM [^3H]-N-acetilglükózaminnal (5 μCi /minta) egészítettük ki. Három órázátás után a micéliumot centrifugáltuk, átmostuk és újra szuszpendáltuk friss, jelöletlen DM tápoldatba. A gramicidin D-t 2×10^{-5} M és 2×10^{-6} M, a penicillin G-t 120 μgml^{-1} ($2 \times \text{MIC}$) koncentrációban az inkubáció kezdetekor adtuk a radioaktívan jelölt, korai-exponenciális növekedési fázisban levő micéliumhoz. Az így kezelt tenyészeteket 12 órán keresztül rázattuk rázógépen 27 $^{\circ}\text{C}$ -on. A tenyészetekből mintákat vettünk az inkubáció kezdetekor, majd 0.5, 2.5, 5.0 illetve 12 óra elteltével és a módszertani részben leírt eljárás szerint nyert felülúszókban megmértük a radioaktivitást. Mint az 28.a ábrán látható, a penicillin G és a gramicidin D a kezeletlen kultúrához képest jelentősen és a gramicidin D koncentráció-függően is megnövelte a jelölt sejtfal fragmentek felszabadulását. A penicillin G-vel kezelt mintákban a nedves micélium tömegre vonatkoztatott radioaktivitás már az inkubáció kezdetétől eltelt 3. órára magasabb értéket ért el, mint amit a gramicidin D okoz a 12 órás inkubálás alatt. Ráadásul a penicillin G hatására felszabadult sejtfal fragmensek mennyisége már 5 órás inkubálás után megközelíti a maximális értéket, az ezt követő 7 órában már csak kismértékű radioaktivitás növekedés tapasztalható. Ezzel ellentétben a gramicidin D nagyobb dózisa csak kb. az 5. órában emeli meg a felülúszóban a [^3H]-N-acetilglükózaminnal jelzett sejtfal fragmentek mennyiségét, s a 12 órás inkubáció alatt sem okoz olyan nagy mértékű lízist mint a penicillin G. A 28.a ábrát értékelve megállapítható, hogy a penicillin G sokkal potensebb vegyület a sejtfal lízisének indukálásában, és az általa indított masszív lízis hamarabb kezdődik. A penicillin G-vel illetve a gramicidin D-vel kezelt minták közti különbség különösen jelentős a mérés első 5 órájában.



28. a ábra: A gramicidin D és a penicillin G hatása a *Streptomyces griseus* micéliumának autolitikus aktivitására. A gramicidin D-t 2×10^{-6} M (■); 2×10^{-5} M (●); és a penicillin G-t $2 \times \text{MIC}$ koncentrációban (♦) az inkubáció kezdetekor adtuk a korai-exponenciális növekedési fázisban levő, radioaktívan jelzett tenyészetéhez. A kontroll kultúrát (▲) nem kezeltük sem ionofór vegyülettel, sem antibiotikummal. Az autolitikus aktivitást a sejtfalból felszabaduló N-acetil-(1-³H)-glükózamin méréssel határoztuk meg. Az ábrázolt adatok három független mérés eredményeinek átlagát reprezentálják.

Ezután megmértük, hogy a gramicidin D milyen hatással van a citoplazma membrán elektrofiziológiai állapotára. Ehhez a kísérlethez a membránpotenciálra ($\Delta\Psi$) szenzitív fluoreszcens festéket, a DiOC₆(3)-ot használtuk (93). A módszertani részben leírt eljárással (111) nyert protoplasztokat összekevertük a karbocianin festékkel, megvártuk, míg a fluoreszcens intenzitás beáll egy megközelítőleg állandó értékre. A protoplasztok membránpotenciál értékeit mutató ábrák (28.b-31) bal szélén látható első szignál a DiOC₆(3) festék alap fluoreszcens intenzitása. Az így elért fluoreszcens egyensúly arányos a sejtek $\Delta\Psi$ értékével. (93). Mint az a 28.b ábrán látható, a csatornaképző ionofór, a gramicidin D hozzáadása a festék-protoplaszt rendszerhez egy azonnali és nagyon szignifikáns fluoreszcens intenzitásnövekedést produkált. A gramicidin D, mint egyértékű kationokra specifikus ionofór, számos ionnal (H^+ , K^+ , Na^+) szemben is megváltoztatja a plazmamembrán permeabilitását (3). A gramicidin D ionofórral történő kezelés során a festék fluoreszcens intenzitásának gyors növekedése a membrán depolarizációjának felel meg. Ezek az eredmények azt demonstrálják, hogy a gramicidin D várakozásainknak megfelelően valóban depolarizálta $\Delta\Psi$ -t, és a citoplazma membránon

keresztüli ion gradiens megváltozása következtében valójában megnövekedett a sejtfal lízis intenzitása a *S. griseus* törzsben.

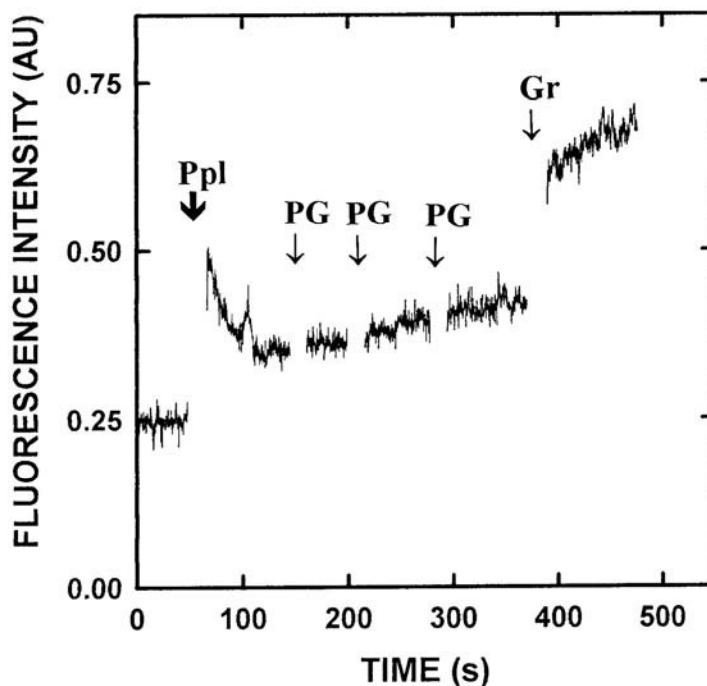


28. b ábra: A DiOC₆(3) festék fluoreszcens intenzitásának profilja (gerjesztés: 475 nm, emisszió: 510 nm) a gramicidinnel kezelt *S. griseus* protoplasztokban. A protoplasztokat a korai-exponenciális növekedési fázisban levő tenyészetből preparáltuk. A vastagabb nyíl a protoplasztok (↴), a vékonyabb (↓) a 10⁻⁶ M gramicidin D adását jelzik. A festék és a protoplasztok standard koncentrációjúak, ahogy azt a kísérleti részben leírtuk. Az ábra bal oldalán levő első szignál a festék alap fluoreszcens intenzitását mutatja.

A penicillin G hatása a *S. griseus* NRRL B-2682 membránpotenciál értékére

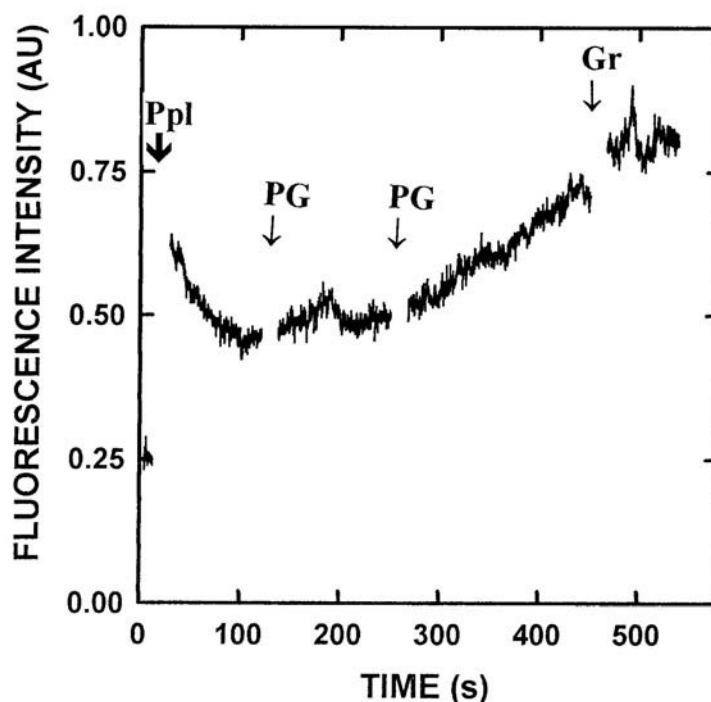
A penicillin G $\Delta\Psi$ értékére kifejtett hatását is tanulmányoztuk a *S. griseus* törzsben. A többi *Streptomyces* törzshöz hasonlóan a *S. griseus* NRRL B-2682 esetén is viszonylag magas a penicillin G minimális inhibitor koncentrációja értéke (MIC) 64 μgml^{-1} . Ennek oka feltehetőleg a *Streptomyces* törzsek penicillin-kötő fehérjéinek β -laktám molekulákkal szembeni csökkent érzékenysége. Ráadásul, amint azt már korábban közöltük, az általunk vizsgált törzs membránhoz kötött β -laktamáz enzimmel is rendelkezik, ami viszonylag ritka a *Streptomyces* fajok között (27).

A *S. griseus* törzs spóráit folyékony DM médiumban tenyésztettük rázógépből 27 °C-on. A korai-exponenciális növekedési fázisban levő, kb. 10 órás korú sejtekből protoplasztokat preparáltunk. Mivel a protoplasztok már nem rendelkeznek sejtfallal, ezeket felhasználva lehetővé válik a penicillin G azon hatásainak vizsgálata, melyek nem a sejtfalszintézis gátlásának másodlagos következményei. A DiOC₆(3) festék oldatához hozzáadtuk a protoplasztokat, a fluoreszcens egyensúly beállása után a penicillin G-t 2 × MIC-ban adtuk a festék-protoplaszt rendszerhez. Mint a 29.a ábrán látható, az első adag penicillin G csak kismértékű $\Delta\Psi$ érték változást eredményezett, majd kb. 1-1.5 perc múlva második dózis antibiotikummal kezeltük a protoplasztokat, ami tovább csökkentette a membránpotenciál értékét. Egy újabb, harmadik adag 2 × MIC-jú penicillin G a fluoreszcens intenzitást fokozatosan emelte. A korai-exponenciális növekedési fázisban levő sejtekből preparált protoplasztokhoz adott 2 × MIC penicillin G tehát a dózisok számától függő, fokozatosan növekvő, de csak részleges depolarizációt okozott. A penicillin G-t 2 × MIC dózisokban háromszor egymás után adva a protoplasztokhoz, sem sikerült teljesen depolarizálni a plazmamembránt, ugyanis a gramicidin D-t adva ezekhez a protoplasztokhoz, további fluoreszcens intenzitásnövekedést tudtunk kiváltani. A 29.a és 28.b ábrákat összehasonlítva az is látható, hogy a penicillin G-vel is kezelt mintákban a gramicidin D-vel indukált depolarizáció kinetikája különbözik az antibiotikummal nem kezelt kontroll mintákban mért depolarizáció kinetikájától.



29. a ábra: A $2 \times \text{MIC}$ -ban adott penicillin G és a 10^{-6} M gramicidin D hatása a korai-exponenciális növekedési stádiumban levő micéliumokból izolált *S. griseus* protoplasztokra. A protoplasztok adását a vastag nyíl jelzi (▼), a penicillin G-t (PG) és a gramicidint (Gr) a vékony nyíllal (↓) jelzett időpontokban adtuk a festék-protoplaszt rendszerhez.

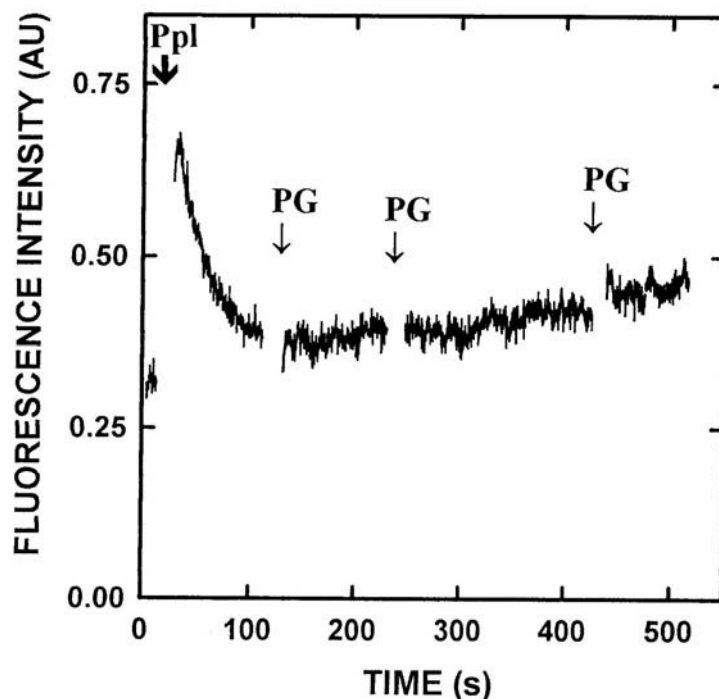
Ezután megvizsgáltuk, hogy a különböző koncentrációban adott penicillin G hogyan befolyásolja a protoplasztok membránpotenciál értékét. Így a következő kísérletben a penicillin G-t $5 \times \text{MIC}$ -ban adtuk a fiatal korú protoplasztokhoz, a 29.b ábra mutatja, hogy a penicillin G membránt depolarizáló hatása koncentrációfüggést mutat. A penicillin G $5 \times \text{MIC}$ koncentrációban nagyobb csökkenést okozott a $\Delta\Psi$ értékében, mint a $2 \times \text{MIC}$ -jú penicillin G (29.a és 29.b ábra), ráadásul a nagyobb koncentrációjú antibiotikumból adott második dózis szinte teljesen depolarizálta a membránt. A két eltérő dózisú penicillin G-vel kezelt mintákban a depolarizáció kinetikáját összehasonlítva látható, hogy a második $5 \times \text{MIC}$ -jú penicillin G dózis a fluoreszcens intenzitás egyenletes, de elnyújtott, lassabb növekedését eredményezte, mint az első adag antibiotikum. A második nagy dózisú penicillin G adását követően adott gramicidin D már csak kis mértékben tudta tovább depolarizálni a protoplasztok $\Delta\Psi$ -ét, és a depolarizáció kinetikája is szabálytalan lefutású (29.b ábra).



29. b ábra: A penicillin G koncentrációfüggő hatása. A nagy dózisú, $5 \times \text{MIC}$ -jú penicillin G (PG, ↓) ismételt adásának hatása a *S. griseus* protoplasztjaira. A szélesebb nyíl (↓) a korai exponenciális fázis micéliumaiból izolált protoplasztok festék törzsoldathoz való adását jelzi. Az antibiotikum adását követően (PG, ↓) a 10^{-6} M gramicidin D adásának időpontját a vékony nyíl jelzi (Gr, ↓). A $\Delta\Psi$ értékeiben bekövetkezett változásokat a DiOC₆(3) festék molekula fluoreszcens intenzitásának mérésével határoztuk meg, a fluoreszcens intenzitás növekedése a $\Delta\Psi$ depolarizációjának felel meg.

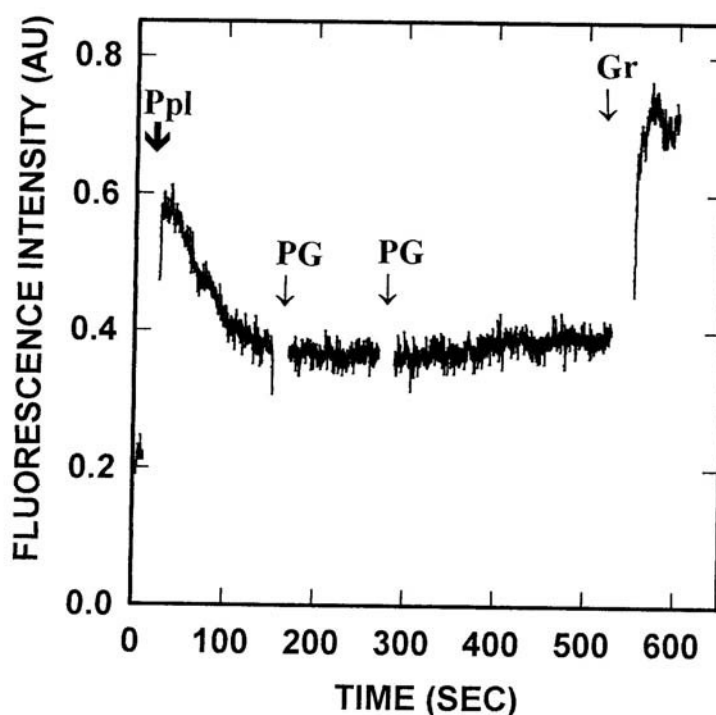
Jól ismert, hogy a β -laktám antibiotikumok csak az exponenciális-növekedési stádiumban levő sejtek lízisét indukálják (135). Ezzel a megfigyeléssel összhangban mi is azt tapasztaltuk, hogy a penicillin G depolarizáló hatása korfüggést mutat. Folyékony DM táptalajon növekvő, korai-exponenciális növekedési stádiumban levő sejtekből nyert protoplasztokat tovább inkubáltuk glükózzal és kazein hidrolizátummal kiegészített P-médiumban. A inkubálás kb. hét órán keresztül tartott, majd ezeken az idősebb korú protoplasztokon is megvizsgáltuk a penicillin G hatását. Ahogy ez a 30.a ábrán látható, a penicillin G-nek még $5 \times \text{MIC}$ -ban sem volt hatása a membránpotenciál értékére, az ugyanilyen koncentrációjú, második dózisú penicillin G valamelyest megemelte a fluoreszcens intenzitást. A 29.b és a 30.a ábrákat összehasonlítva látható, hogy a nagy dózisú antibiotikum ismételt adása az idősebb korú protoplasztok $\Delta\Psi$ -nek sokkal kisebb mértékű depolarizációját okozta, mint a fiatal korú protoplasztok esetében. Ráadásul a nagy koncentrációjú antibiotikumból a harmadik dózis sem eredményezett olyan

nagyságú fluoreszcens intenzitásnövekedést a 17 órás protoplasztokon, mint az ugyanilyen koncentrációjú második dózisu penicillin G a fiatal protoplasztokon.



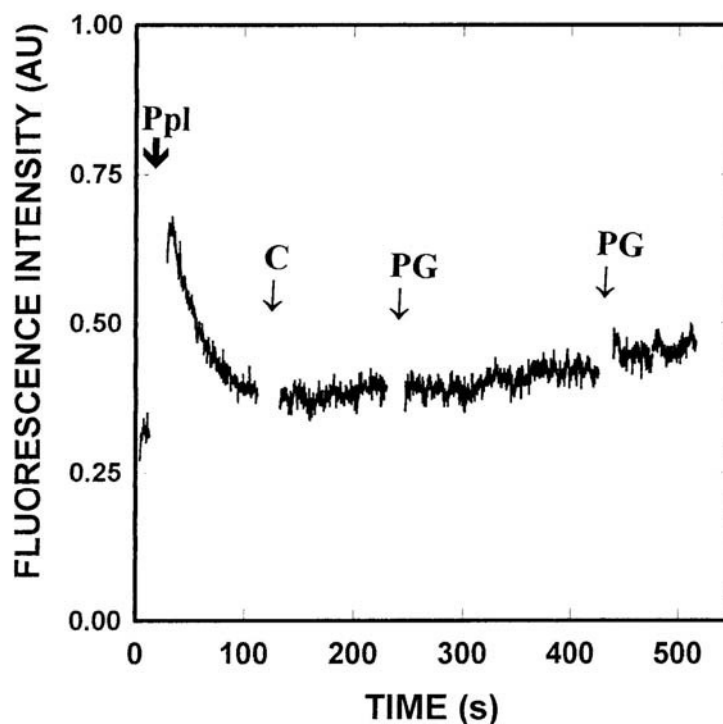
30. a ábra: A penicillin G növekedési fázistól függő hatása a *S. griseus* $\Delta\Psi$ értékére. A *S. griseus* késői exponenciális növekedési stádiumú sejtjeiből preparált protoplasztok DiOC₆(3) oldatához történő adását a vastagabb nyíl mutatja (Ppl ↓). Az 5 × MIC-jú penicillin G-vel egymás után háromszor kezeltük a mintánkat (PG ↓).

A penicillin G depolarizáló hatásának csökkenése nem lehet annak a következménye, hogy a protoplasztok a hosszabb inkubálás során elpusztultak, hiszen a penicillin G 5 × MIC-jú, ismételt adagolása után a gramicidin D az idősebb korú, 17 órás protoplasztokon is szignifikánsan csökkentette a membránpotenciál értékét (30.b ábra). A penicillin G idősebb sejtekkel szembeni csökkent hatékonyságának egyik lehetséges magyarázata, hogy ezek a sejtek sokkal magasabb β -laktamáz enzim aktivitással rendelkeznek, mint a fiatal sejtek (27), aminek következtében a protoplasztokhoz adott antibiotikum jelentős részét elhidrolizálják.



30. b ábra: A gramicidin D hatása a penicillin G-vel kezelt idős korú protoplasztok membránpotenciáljára. A protoplasztokat kétszer egymás után $5 \times \text{MIC}$ -jú penicillin G-vel kezeltük (PG ↓), majd 10^{-6} M gramicidin D-t adtunk a mintákhoz (Gr ↓).

Következő kísérletünkkel megpróbáltuk ellenőrizni ezt a lehetőséget. A 17 órás korú protoplasztokat a penicillin G-vel történő kezelés előtt a β -laktamáz inhibitor klavulánsavval előkezeltük. A 30.c ábrán látható, hogy a klavulánsav 10^{-4} M koncentrációban önmaga is kismértékű depolarizációt okozott. Azonban a klavulánsav alkalmazása sem fokozta idős sejteken a $5 \times \text{MIC}$ -jú penicillin G $\Delta\Psi$ -re kifejtett hatását. A penicillin G-nek ez a növekedési stádiumtól függő *in vitro* hatása a *S. griseus* protoplaszt sejteire jól korrelál az antibiotikum *in vivo* növekedési fázis függő hatékonyságával (136).



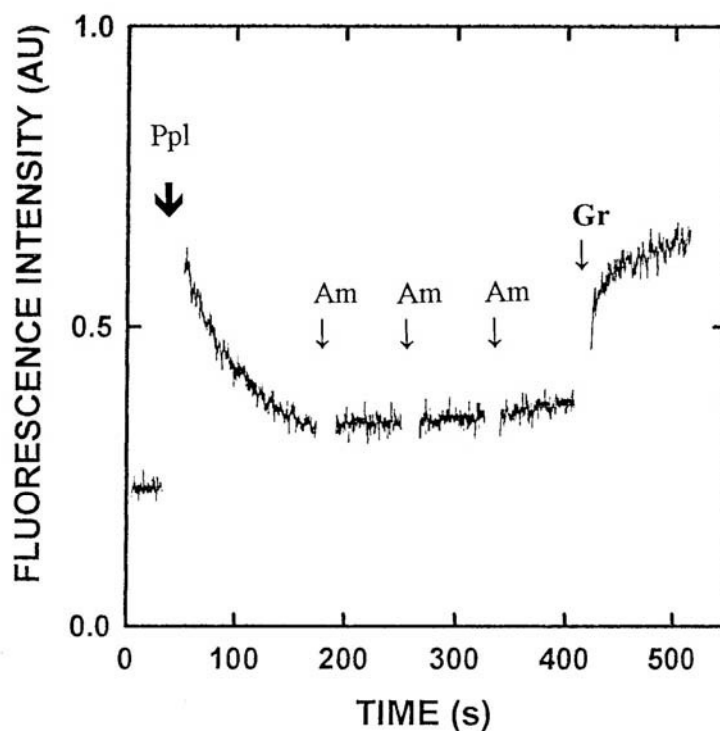
30. c ábra: A klavulánsav (10^{-4} M) és a penicillin G ($5 \times \text{MIC}$) hatása a késői-exponenciális növekedési fázisból izolált protoplasztokra. A vékony nyíl a klavulánsav (Cl ↓) és a penicillin G (PG ↓), a vastagabb nyíl a (↓) protoplasztok adását jelzi.

A β -laktamáz aktivitás már a csírázás után is detektálható a *S. griseus* membránjában, és mennyisége egyenletesen növekszik az életciklusa folyamán (27). Így elvileg az is lehetséges, hogy nem maga a penicillin G, hanem ennek elbontott, biológiailag inaktív származéka a penicilloesav befolyásolja a $\Delta\Psi$ értékét. Megpróbáltuk megvizsgálni ezt a lehetőséget is, így a következő kísérletben a penicillin G elhidrolizált származékának, a penicilloesavnak a *S. griseus* protoplasztjainak membránpotenciálra kifejtett hatását teszteltük a korábbi mérésekkel azonos körülmények között. A penicilloesav még igen nagy, 10^{-3} M koncentrációban sem depolarizálta a *S. griseus* protoplasztjainak a $\Delta\Psi$ értékét. Párhuzamos kísérletekben vizsgáltuk a penicillin G biológiailag inaktív alkotójának, a 6-amino-penicillánsavnak, valamint a penicillaminnak a hatását is. Ezek a komponensek azonban még nagy dózisban hosszabb inkubáció után sem változtatták meg a protoplasztok membránpotenciálját. Ezeket az eredményeket itt nem ábrázoltuk.

**Az ampicillin és cefalosporin antibiotikumok hatása a *S. griseus*
protoplasztjainak $\Delta\Psi$ értékére**

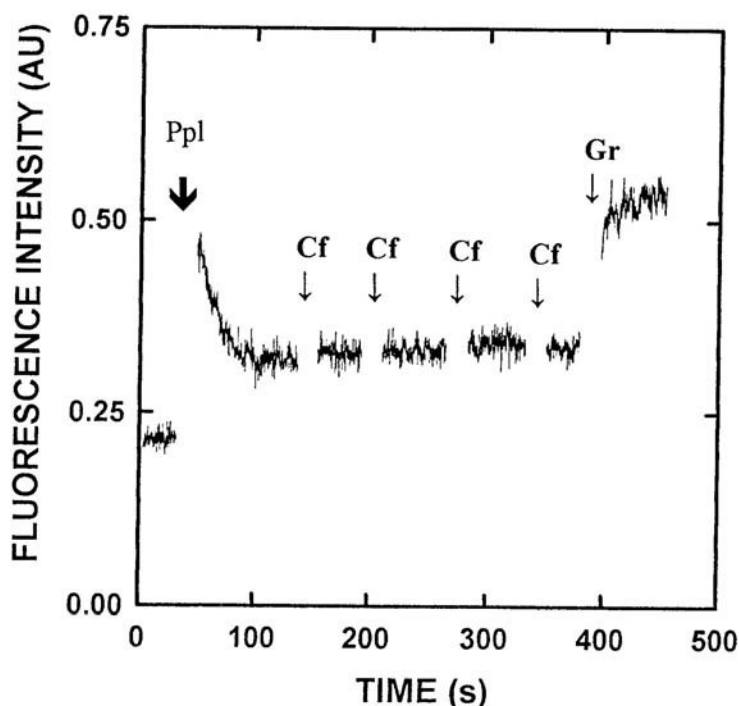
Mivel a baktériumsejtek lízisét nemcsak a penicillin G-vel lehet indukálni, hanem más β -laktám vegyületekkel is, mint pl. a penicillin és cefalosporin származékok, ezért külön-külön megvizsgáltuk az ampicillin, valamint az első, második és harmadik generációs cefalosporinok – cephaloridin, cefamandol és cefotaxim – hatását is. A *S. griseus* törzs spóráit folyékony DM médiumban tenyésztettük 27 °C-on, és a 10 órás kultúrából a módszertani részben leírt protokoll szerint protoplasztokat izoláltunk, hogy a β -laktám szerkezetű vegyületek sejtfalszintézis gátlástól független hatását vizsgálhassuk.

Első kísérletünkben a penicillin származék ampicillint 50 μgml^{-1} dózisban adtuk a DiOC₆(3) festék-protoplaszt rendszerhez (31.a ábra), ám ilyen koncentrációban az ampicillin csak nagyon kismértékben depolarizálta a protoplasztok $\Delta\Psi$ értékét, a második és harmadik dózis az ugyanilyen koncentrációjú antibiotikumokból fokozatosan tovább növelte a fluoreszcens intenzitást. Az ampicillin kezelést követően a gramicidin D 10^{-6} M koncentrációban a protoplasztok membránjának azonnali, szignifikáns depolarizációját okozta.



31. a ábra: Az ampicillin hatása a korai-exponenciális növekedési stádiumú micéliumokból preparált protoplasztok $\Delta\Psi$ -re. Az antibiotikumot 50 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációban ismételtelen adagoltuk a mintához (Am ↓). A vastag nyíl (↓) a protoplasztok, az utolsó vékony nyíl (↓) a gramicidin D adását mutatja.

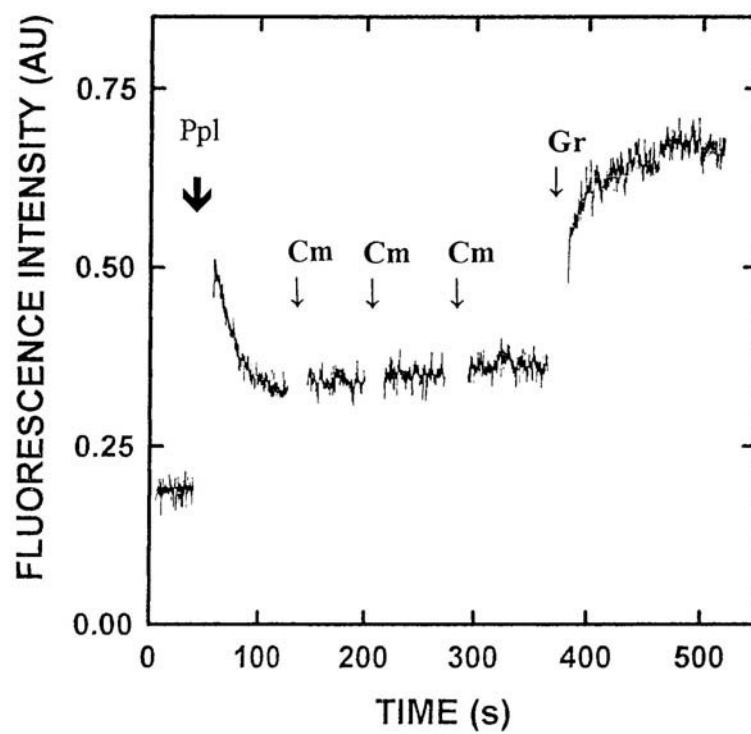
A következőkben az első generációs cephaloridin membránpotenciálra kifejtett hatását teszteltük az előbbivel azonos körülmények között. Az egyensúlyi fluoreszcensintenzitás beállítását követően a cephaloridint négyszer egymás után, 50 μgml^{-1} koncentrációkban adagolva a festéket és protoplasztokat tartalmazó mintához, az antibiotikum alig csökkentette a membránpotenciál értékét (31.b ábra). A gramicidin D a cephaloridin kezelést követően jelentősen depolarizálta a protoplasztok $\Delta\Psi$ -ét.



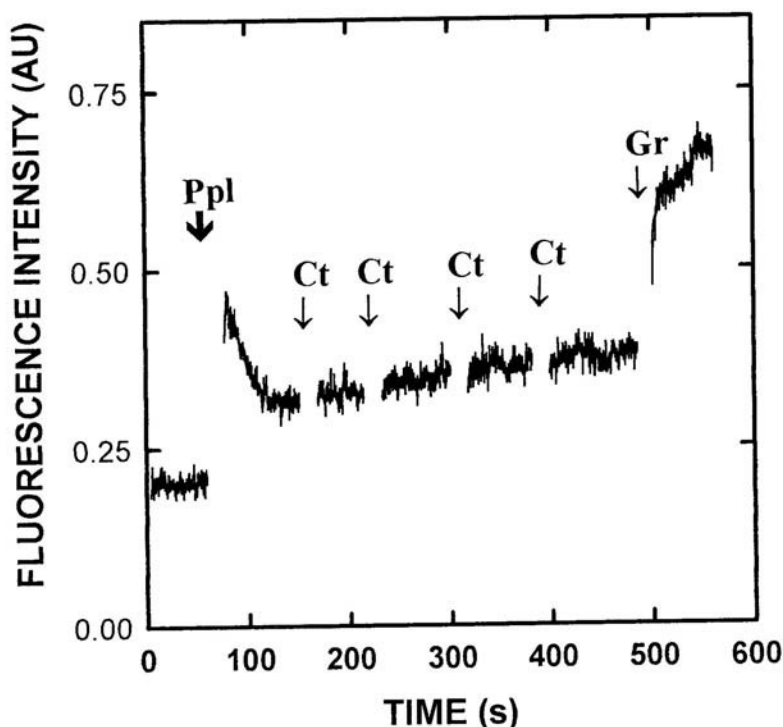
31. b ábra: A cephaloridin hatása a fiatal *S. griseus* sejtekből izolált protoplasztok membránpotenciáljára. A 50 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációjú antibiotikummal négyszer egymás után kezeltük a protoplasztokat (Cf ↓).

A vastag nyíl (↓) a protoplasztok, az utolsó vékony nyíl (↓) a gramicidin D adását mutatja.

Egy újabb kísérletben a második generációs cefamandol hatását is megvizsgáltuk hasonló rendszerben. Rövid időközönként $50 \mu\text{gml}^{-1}$ koncentrációjú cefamandollal kezeltük a *S. griseus* fiatal protoplasztjait, az ismételt adagolt dózisok egyenletesen, de csak kismértékben növelték a fluoreszcens intenzitást (31.c ábra). A gramicidin D ebben az esetben is jelentős depolarizáló ágensnek bizonyult az antibiotikum kezelést követően. Az előzőkkel teljesen azonos rendszerben teszteltük a harmadik generációs cefalosporin, a cefotaxim hatását is a *S. griseus* korai-exponenciális növekedési fázisban levő sejtjeiből izolált protoplasztokra. Kísérleti eredményeink azt mutatják, hogy a cefalosporinok közül a cefotaxim csökkentette leghatékonyabban a protoplasztok $\Delta\Psi$ -ét (31.d ábra), bár egyik β -laktám vegyület sem volt olyan jó depolarizáló ágens, mint a penicillin G.



31. c ábra: Az 50 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációban, ismételten adagolt cefamandol hatása a korai-exponenciális növekedési stádiumban levő micéliumokból izolált *S. griseus* protoplasztokra (Cm $\downarrow$). A vastag nyíl ($\Downarrow$) a prototoplasztok, az utolsó vékony nyíl ($\downarrow$) a gramicidin D adását mutatja.



31. d ábra: A cefotaxim hatása a korai-exponenciális növekedési stádiumú *S. griseus* micéliumából preparált protoplasztok $\Delta\Psi$ -értékére. A cefotaximot négyszer egymás után, $50\ \mu\text{g}\cdot\text{m}^{-1}$ koncentrációban adtuk a mintákhoz. (Ct ↓). A vastag nyíl (↓) a prototoplasztok, az utolsó vékony nyíl (↓) a gramicidin D adását mutatja.

A penicillin G lítikus hatásának potencírozása ionofór vegyületekkel

Mint korábban leírtuk, a gramicidin D megnövelte a *S. griseus* sejtfalából a radioaktívan jelzett sejtfal fragmentumok felszabadulását. Ennek az eredménynek az alapján azt feltételezhetjük, hogy az ionofór indukálja a sejtfal autolízisét. Amikor a penicillin G-t és a gramicidin D-t együtt adtuk a *S. griseus* korai-exponenciális növekedési fázisban levő kultúrájához, a gramicidin D nem fokozta a penicillin G lízist okozó hatását. Mivel mind a két vegyület reprodukálhatóan depolarizálta a protoplasztok membránját, a lízist erősítő kölcsönhatásuk hiányát azzal magyarázhatjuk, hogy a gramicidin D és a penicillin G ugyanazon a mechanizmuson keresztül indukálják a lízist.

KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE

A β -laktamáz enzim vizsgálata a *S. griseus* NRRL B-2682 törzsben és a *spoI⁻* nem spórázó mutánsban

A β -laktamáz enzim termelés alakulása az élekciklus során

A β -laktamáz enzim termelődését tanulmányozva kimutattuk, hogy a *S. griseus* NRRL B-2682 vad típusú törzsben a β -laktamáz enzim membránhoz kötött és szekretált formája egyaránt megtalálható, míg a nem spórázó, spontán mutáns *spoI⁻* törzsében csak a membránba lokalizált enzimaktivitás mérhető. A β -laktamáz enzim termelését összehasonlítva a két törzs élekciklusa folyamán, a következő érdekes megfigyelést tettük. A vad és a mutáns törzs esetében is először a membránhoz kötött formában jelenik meg az enzim, már az 5 órás sejtekben, a csíracsővek kialakulása után mérhető a β -laktamáz aktivitás. A membránhoz kötött enzim specifikus aktivitása az 5 órás sejtekben kb. 0.0085 egység / mg protein, és kb. 6-7-szeresére nő a stacioner növekedési szakaszra. Követve a membránhoz kötött enzim aktivitásának időbeli változását láthatjuk, hogy a membránba lokalizált enzim specifikus aktivitása is körülbelül azonos a két törzsben. Az extracelluláris enzimaktivitás csak a spórázó törzsben, és csak később, a késői-exponenciális növekedési szakaszban levő tenyészetben jelenik meg. Az extracelluláris enzim specifikus aktivitása kezdetben nagyon alacsony, megközelítőleg 0.0006 egység/mg protein, és kb. nyolcszorosára emelkedik a stacioner növekedési fázis végére. Ezzel szemben a nem sporuláló törzs egyáltalán nem választja ki a β -laktamáz enzimet az extracelluláris térbe, a törzs egész élekciklusa folyamán csak a membránban található enzimaktivitás. Bár a 40 órás *spoI⁻* tenyészetének fermentlevében megjelenik egy alacsony β -laktamáz aktivitás, (0.001 egység / mg protein), de szerintünk ez már a sejtek lízisének a következménye.

A *Streptomyces* törzsekből eddig izolált β -laktamáz enzimek mind konstitutívan szintetizált, extracelluláris enzimek, tudomásunk szerint **ez az első membránhoz kötött enzimforma**, amit *Streptomyces* fajokban kimutattak.

A β -laktamáz enzim szekréció változása a differenciálódás befolyásolásával

Az AF hatását megvizsgálva a *spoI⁻* törzs β -laktamáz szekréciójára, a következőket tapasztaltuk. A DM folyékony táptalajban tenyésztett *spoI⁻* törzsben az 5 órás sejtekhez adott 80 μgml^{-1} AF visszaállította a normál differenciálódást, ráadásul a spórák megjelenésével párhuzamosan az enzim kiválasztódott az extracelluláris térbe, s ezzel párhuzamosan csökkent a

membránhoz kötött enzim mennyisége, miközben a tenyészetben a teljes β -laktamáz aktivitás változatlan maradt. A mutáns törzs által szekretált enzim specifikus aktivitása kb. fele, az ugyanilyen korú vad típusú törzs tenyészetében meghatározott specifikus aktivitásnak. Teljesen azonos eredményeket kaptunk két másik, nem spórázó spontán mutáns a *spo2⁻* és *spo3⁻* törzs esetében is. Ezen eredményeink alapján feltételezzük, hogy *S. griseus*-ban a β -laktamáz enzim extracelluláris térbe történő kiválasztása szorosan kapcsolódik a differenciálódási folyamattal.

Előző feltételezésünk alátámasztására megvizsgáltuk, változik-e a β -laktamáz enzim termelése és lokalizációja, ha gátoljuk a vad típusú törzsben a spórázást. A DM táptalaj 0.5 % CH-mal történő kiegészítése meggátolta a *S. griseus* spóráképzését, és elmaradt a β -laktamáz enzim fermentlébe történő szekréciója is. Ezekben a tenyészetekben csak a membránhoz kötött enzimaktivitást tudtuk kimutatni. Teljesen azonos eredményeket kaptunk, ha egy másik gátlószert használtunk. 15 μ M *m*-APBA (a NAD^+ glikohidroláz és az ADP-ribosziltranszferáz enzimek gátlószere) szintén represszálja a törzs differenciálódását, és az így gátolt tenyészet extracelluláris terében sem volt mérhető az enzimaktivitás, csak a membránba lokalizált enzimforma volt kimutatható. Összefoglalva tapasztalatainkat látható, hogy olyan tenyésztési körülmények között, ahol gátoltuk a spórázást, a β -laktamáz enzim nem szekretálódott. Ha viszont a nem spórázó mutáns törzset AF-ral sporulációra bírtuk, a spórák megjelenésével párhuzamosan a törzs kiválasztotta a fermentlébe az enzimet. Ezek az eredmények alátámasztják kiindulási hipotézisünket, hogy a *S. griseus* törzsben **a β -laktamáz enzim extracelluláris térbe történő szekréciója szorosan kapcsolódik a differenciálódási folyamattal.**

A globomycin hatása a S. griseus törzs β -laktamáz enzim produkciójára

A globomycinnek, mint a membránhoz kötött lipoproteinek „processzingjét” katalizáló szignál-peptidáz II enzim specifikus gátlószere, a vad és a mutáns törzsek β -laktamáz szekréciójára kifejtett hatását kísérleteinkben megvizsgálva, az alábbi megállapításokat tehetjük. Ez az antibiotikum meggátolta a β -laktamáz akkumulációját a membránban, és ezzel párhuzamosan fokozta az enzim extracelluláris térbe történő szekrécióját a spórázó törzsben. Ráadásul globomycinnel kezelt tenyészetében a kontrollhoz (vad típusú törzs globomycinnel nem kezelt tenyészet) képest hamarabb, már 30 órás korban láthatóak a spórák. Érdekes módon ez egyezik azzal az időponttal, amikor megemelkedik az enzimaktivitás is az extracelluláris térben. Ezek a megfigyelések megegyeznek a Nielsen és mtsai által *B. licheniformis*-ban, és *B. cereus*-ban közölt eredményekkel (101, 102). Hasonlóan a spórázó törzsben kapott eredményekhez, a globomycin a nem spórázó mutáns törzsben is kiváltotta az enzim

extracelluláris térbe történő szekrécióját, és csökkentette ezzel párhuzamosan a membránhoz kötött enzim mennyiségét.

Ennek a jelenségnek a következő magyarázatát adhatjuk. A szignál-peptidáz II enzim gátlása miatt elmarad az N-terminális szignál peptid megfelelő „processzingje”, s ennek következtében nem képződik az N-terminálison szabad amino-csoporttal rendelkező cisztein. Mivel az enzimet a membránhoz rögzítő zsírsav a diacil-glicerinnel módosított cisztein amino-csoportjához kötődne, elérhető akceptor hely hiányában ez a lipid módosulás nem történik meg, ennek eredményeképpen a módosítatlan β -laktamáz enzim kikerül az extracelluláris térbe. Eredményeink azt mutatják, hogy a *S. griseus* törzsben a **β -laktamáz enzim prelipoproteinként szintetizálódik**, és az enzim poszttranszlációsán módosított alakja kötődik a membránhoz, és az életciklus későbbi szakaszában kerül ki az extracelluláris térbe.

A β -laktamáz enzim N-terminális szekvenciájának a meghatározása

Kidolgozva azokat a tenyésztési körülményeket, amelyek mellett a legmagasabb extracelluláris enzimprodukciónak érhető el, és amelyek kedvezőek a tisztítás szempontjából is, a β -laktamáz tisztításához az E9 táptalajban glükóz szénforrás mellett növesztett tenyészet bizonyult a legalkalmasabbnak. Az extracelluláris enzimet a 48 órás tenyészet fermentlevéből izoláltuk, míg a membránhoz kötött formát a GC médiumban tenyésztett, 24 órás kultúrákból tisztítottuk meg. Az izolálás során a megfelelően előkészített enzimpreparátumot az első lépésben FPLC MonoP H 5/25 **kromatofókusáló** oszlopon tisztítottuk. A vad típusú törzs membránjából és az extracelluláris teréből, illetve a mutáns törzs membránjából izolált β -laktamáz enzim **IEP-je** egyaránt **pH 7.2**-nek adódott. Következő lépésben Waters SW 200 **géliszűrő** oszlopon tisztítottuk tovább a fehérjét, az oszlop mólsúly-standardekkel való kalibrációja alapján valamennyi enzimforma kb. **31 kDa molekula tömegűnek** bizonyult. A β -laktamáz aktivitást mutató frakciókat bekonzentráltuk, és a közel homogén mintákat az ultraszűrést követően megfuttattuk 13 %-os SDS-PAGE-n, amely szintén 31 kDa tömegűnek mutatta az általunk izolált, de eredetileg eltérő lokalizációjú β -laktamáz enzimeket. Az SDS gélből a fehérjéinket átblottoltuk ProBlottTM membránra, a Comassie-brilliant-blue-val festett blottról a következő aminosavakat mutattuk ki az extracelluláris enzim N-terminálisán: **AAADIPIANVNA**. Ezt a szekvenciát hasonlítottuk BLAST Search Swiss-Prot / TrEMBL adatbázisokban levő fehérjék aminosav szekvenciáival, s ez alapján az általunk meghatározott szekvencia egy másik *S. griseus* törzsből izolált D-aminopeptidáz enzim N-terminális szekvenciájával (**APDIPLANVKA**) mutat nagyfokú, 81.8 %-os homológiát (us.expasy.org/cgi-bin/blas.pl?sequence). Ez a D-

aminopeptidáz enzim az M28 peptidáz család B alcsaládjába tartozik (meropslinks.iapc.bbsrc.ac.uk). További, de kisebb szekvencia hasonlóságot találtunk még más *Streptomyces* fajok (*S. coelicolor*, *S. avermitilis*) feltételezett D-aminopeptidáz enzimével is. A β -laktamáz enzim D-aminopeptidázzal mutatott hasonlósága nem meglepő, hiszen Asano és munkatársai *Ochrobactrum anthropi*-ből olyan D-aminopeptidázt izoláltak, amelynek primer szekvenciája β -laktamáz enzimhez hasonlít, működése β -laktám szerkezetű vegyületekkel gátolható, de maga az enzim nem mutat β -laktamáz aktivitást. (6). Ugyanez a munkacsoport *B. cereus*-ban olyan D-sztereospecifikus endopeptidáz enzimet mutatott ki, ami penicillin G-vel és ampicillinnel szemben β -laktamáz aktivitást mutat, nincs D-aminopeptidáz aktivitása, és elsődleges szerkezete *S. lactamdurans* és *B. cereus* PBP-jéhez, és egyes C-osztályú β -laktamázokhoz hasonlít. Tulajdonképpen a β -laktamáz enzimet, a D-aminopeptidáz enzimet és a PBP-eket ezen hasonló tulajdonságaik, és az általuk katalizált reakciók hasonlósága alapján penicillin felismerő enzimek szupercsaládjába sorolják (7). Az általunk izolált β -laktamáz enzim azonban nem mutat D-aminopeptidáz aktivitást.

A membránhoz kötött enzimek esetében nem sikerült azonosítani az N-terminális aminosavakat, feltehetően ez a régió blokkolt volt a szekvenáláshoz.

A *S. griseus* NRRL B-2682 és a *spoI*⁻ törzs β -laktamáz enzimének jellemzése

A Samuni-féle spektrofotometriás módszerrel vizsgálva a különböző β -laktám antibiotikumok bontását, a benzilpenicillin bizonyult a legjobb szubsztrátnak mindegyik enzimforma esetében, így ehhez viszonyítottuk a többi szubsztrát bontásának a sebességét. Azonos reakció idő és azonos körülmények mellett az ampicillinnek kb. 90 %-át bontotta el az enzim, a cefalosporinok közül a második generációs cefamandolát hidrolizálta legjobban a β -laktamáz, ám ennek is csak kb. a 18 %-át, míg a 3. generációs cefalosporinokat egyáltalán nem bontotta el. Ezen eredmény alapján feltételezzük, hogy a *S. griseus* törzsből **penicillináz** típusú enzimet izoláltunk. Összehasonlítva ezeket az eredményeket a törzsben ezekre a β -laktám vegyületekre korábban meghatározott MIC értékekkel, nagyon jó egyezést találtunk, hiszen a benzilpenicillin MIC értéke a legmagasabb, 64 μgml^{-1} , az ampicilliné ennek a fele, a cefamandoláé 8 μgml^{-1} , míg a cefotaximé 4 μgml^{-1} .

A különböző lokalizációjú enzimek ismert β -laktamáz gátló vegyületekkel szembeni érzékenységét tanulmányozva az 1 mM *m*-APBA mutatta a legerősebb inhibítor hatást, a NC bontás sebességét kb. a felére csökkentette. A *p*-CMB-vel szemben szintén érzékenyek

mutakozott valamennyi enzimforma, a *p*-CMP gátló hatását ekvimoláris mennyiségű cisztein megszüntette. Az EDTA egyáltalán nem befolyásolta az enzimműködést, tehát nem metalloenzimet izoláltunk. Mivel a cloxacillin sem gátolta a β -laktamáz működését, az enzimnek nem szubsztrátja az oxacillin. Összességében ezek az eredmények arra utalnak, hogy az izolált β -laktamáz enzimek aktív centrumában szerin aminosav található, és katalitikusan fontos a cisztein aminosav jelenléte. Az irodalmi adatok alapján az ismert β -laktamáz enzimeknek közel a felében szerin található az aktív centrumban, ide tartoznak az A, C és a D osztályú enzimek (25).

Dixon módszerrel mérve, a jól ismert β -laktamáz gátló vegyületek különböző enzimformákra vonatkozó K_I értékét, a klavulánsav K_I értéke bizonyult a legkisebbnek (4 μmol), a szulbaktám is erős gátlóhatást mutatott (K_I kb. 10 μmol). A cloxacillin és az aztreonám, ami elsősorban a cefalosporináz típusú enzimek jó gátlószere, kevésbé volt hatással a β -laktamáz enzim működésére. Mindez alátámasztja azt a feltételezésünket, hogy a *S. griseus* törzs β -laktamáz enzime penicillináz típusú.

Összefoglalva eddigi eredményeinket látható, hogy a vad típusú *S. griseus* törzs tenyészetének fermentlevéből, illetve a membránból nyert β -laktamáz enzime, és a *spoI* törzs membránhoz kötött enzime a benzilpenicillint bontotta a legnagyobb mértékben, és a többi β -laktám szerkezetű vegyületet hasonló mértékben hidrolizálták az enzimek. Kísérleteink szerint valamennyi enzimforma *m*-APBA-val és *p*-CMB-tal volt jelentősen gátolható, a különböző β -laktamáz gátló vegyületekkel szemben megállapított K_I értékek is megközelítőleg azonosnak bizonyultak a különböző enzimformák esetében. Mivel az eltérően lokalizált enzimeknek valamennyi kísérletesen megállapított jellemzője (szubsztrát profil, enzimgátlás, K_I , IEP, molekula tömeg) azonosnak bizonyult, feltételezzük, hogy a *S. griseus* NRRL B-2682 törzs membránhoz kötött illetve az extracelluláris térből izolált β -laktamáz enzime ugyanannak a fehérjének eltérően processzált formája.

Az általunk megvizsgált enzimműködésre jellemző paramétereket figyelembe véve a *S. griseus* NRRL B-2682 törzs és a *spoI* mutáns β -laktamáz enzime a klasszikus besorolás szerint az A osztályú β -laktamáz enzimek csoportjába sorolható (25), a legújabb rendszerezést követve pedig a β -laktamáz enzimek 2. csoportjába, ezen belül is a 2.a alcsoportba tartoznak (18).

A β -laktamáz enzim szekréciójának vizsgálata a *S. griseus* NRRL B-2682 törzsben

A baktériumoknak érzékelniük kell a környezetükben végbemenő változásokat, és ennek megfelelően módosítani a génexpressziójukat. A baktériumok rendelkeznek olyan homeosztatikus mechanizmussal is, ami a sejthatár integritását ellenőrzi. Ennek egy jól ismert példája a Gram-negatív baktériumok többségében megtalálható AmpC β -laktamáz indukciója, amit a muopeptidek intracelluláris koncentrációja szabályoz (64, 114). Ezen ismeretek birtokában tanulmányoztuk a β -laktamáz enzim termelése és a sejtfal bioszintézis / metabolizmus között fennálló lehetséges kapcsolatot a *S. griseus* törzsben. A tisztított és autolizinnel emésztett sejtfalfragmentek, a sejtfal-analóg tripeptid Ac₂-L-Lys-D-Ala-D-Ala, és a penicillin G hatását vizsgálva a *S. griseus* β -laktamáz produkciójára, igazán érdekes eredményt kaptunk. A spórázást represszáló körülmények mellett (0.5 % CH-mal kiegészített táptalaj) tenyésztett vad típusú *S. griseus* törzs tenyészetéhez, MIC-nél kisebb koncentrációban adott penicillin G kiváltotta az enzim extracelluláris térbe történő szekrécióját. Fontos megjegyezni, hogy a β -laktamáz enzim termelése nem indukálódott ilyen feltételek mellett növesztett tenyészetekben sem. Teljesen azonos, tehát spórázást gátló feltételek mellett tesztelve a tisztított és autolizinnel emésztett sejtfalfragmentek, és a sejtfal-analóg tripeptid az Ac₂-L-Lys-D-Ala-D-Ala β -laktamáz enzimprodukciónak gyakorolt hatását, az előzővel megegyező megfigyelést tettünk. A spórázásban gátolt, de a felsorolt vegyületekkel nem kezelt kontroll tenyészetekkel ellentétben ezekben a tenyészetekben is megjelent az enzimaktivitás az extracelluláris térben. A tisztított és autolizinnel emésztett sejtfalfragmentek, az Ac₂-L-Lys-D-Ala-D-Ala valamint a penicillin G hatását összehasonlítva láthatjuk, hogy az enzimszekrécióban az Ac₂-L-Lys-D-Ala-D-Ala hatására következett be a legnagyobb növekedés, de jelentős mértékben emelkedett az extracelluláris térben mérhető penicillináz aktivitás a sejtfalfragmentek, és a penicillin G hatására is. Bár ezeket a vegyületeket eltérő koncentrációban adtuk a tenyészetekhez, lehetségesnek tartjuk, hogy fiziológiás jelentősége van a tripeptid hatásának.

Annak bizonyítására, hogy az extracelluláris térben megemelkedett β -laktamáz aktivitás nem a sejtek lízisének a következménye, megmértük a szigorúan intracelluláris elhelyezkedésű GS aktivitást is a *S. griseus* tenyészetek fermentlevében, s itt a GS aktivitás egyik esetben sem volt kimutatható.

Ezek az eredmények megerősítik korábbi feltételezésünket, miszerint a *S. griseus* NRRL B-2682 törzs β -laktamáz enzime konstitutívan szintetizált fehérje. Ezen tények alapján úgy gondoljuk, hogy a sejtfal fragmentek/prekurzorok mennyiségének megemelkedése, ha nem is

közvetlenül erre a folyamatra hatva, de közvetett szignálként fontos faktora a β -laktamáz enzim lokalizációjának meghatározásában.

A *S. griseus* NRRL B-2682 törzs morfológiai differenciálódásának befolyásolása

A sejtfalfragmentek / prekurzorok és a β -laktám vegyületek β -laktamáz szekrécióra gyakorolt hatását vizsgálva érdekes és meglepő jelenséget figyelhattunk meg. Ezen vegyületek hatására ugyanis jelentős morfológiai változás következett a *S. griseus* vad típusú törzsének spórázást represszáló feltételek mellett növekvő tenyészetében. A szubinhibitor koncentrációjú penicillin G hatására megjelentek a légmicéliumok, majd ennek csúcsán a spórák is a spórázásban gátolt feltételek mellett levő szilárd felszínű tenyészetben. A 6-APA-nak, mint a penicillin inaktív prekurzorának a hasonló feltételek mellett növesztett tenyészetben egyáltalán nem volt hatása a differenciálódásra.

Szilárd felszínű kultúrákban más β -laktám antibiotikumok (ampicillin, cefaloridin) hatását vizsgálva agar diffúziós módszerrel hasonló eredményeket kaptunk, ezek az antibiotikumok MIC alatti koncentrációban szintén kiváltották a légmicéliumok és a spórák képződését. Folyékony táptalajban, 0.5 % CH mellett, tehát spórázást gátló feltételek között növekvő tenyészetekkel végzett kísérleteink teljes mértékben azonos eredményeket szolgáltatottak. Figyelemreméltó, hogy ezek a vegyületek csak a fiatal, korai-exponenciális növekedési szakaszban levő sejtekhez adva befolyásolták a törzs differenciálódást, idősebb tenyészetekre hatástalannak bizonyultak.

A sejtfal prekurzor D-Ala-D-Ala, az Ac₂-L-Lys-D-Ala-D-Ala és a NAM vegyületekkel agardiffúziós módszerrel, illetve az adjuváns peptiddel és a tisztított és autolizinnel emésztett sejtfalfragmentekkel mélytenyészetben kapott eredmények megerősítik azt a hipotézisünket, hogy a sejtfal prekurzorok koncentráció változása szignálként szolgálhat a differenciálódás szabályozásában. Ezeknek a vegyületeknek a tesztelése ugyanis az előzőkkel azonos eredményt hozott, valamennyi vegyületfelfüggesztette a CH gátló hatását, és visszaállította a sejtek spórástermelő képességét szilárd és mélytenyészetekben egyaránt. Hasonlóan a β -laktám szerkezetű vegyületekhez, a sejtfal prekurzorok morfológiát megváltoztató hatása szintén életciklus függést mutatott, csak korai-exponenciális növekedési fázisban levő tenyészetekhez adva bizonyultak hatásosnak.

Valamennyi eredményünk összhangban van legutóbb megjelent irodalmi adatokkal is, amelyek szerint a korábbi feltételezésektől eltérően a β -laktamáz enzimnek szerepe lehet a sejtfalszintézisben és a morfológia kialakításában. *Nocardia lactamdurans* törzsben a β -laktamáz

gén megszakítása ugyanis azt mutatja, hogy a β -laktamáz gén nem esszenciális a cephamycin szintézishez, de befolyásolja a sejtek morfológiáját (81). *Myxococcus xanthus*-ban is kimutatták, hogy a β -laktamáz indukcióhoz vezető szignál-transzdukciós útvonal fontos szerepet játszik a törzs aggregációjában és a spórázás folyamatában (73). *E. coli*-ban korábban kimutatták, hogy az AmpC β -laktamáz és az ehhez hasonló AmpH fehérjében mutáns sejtekben megnő a morfológiai aberrációk gyakorisága, megváltozik a sejtek alakja és átmérője (132). *E. coli*-ban nemrégiben írtak le egy olyan, a sejtosztódásban és a sejtek morfológiájának kialakításában fontos szabályozó gént, a *bolA*-t, amely a sejtfal bioszintézisben résztvevő gének és az *ampC* β -laktamáz gén transzkripcióját is kontrollálja (68).

Eredményeink alapján úgy tűnik, hogy a *S. griseus* esetében is befolyásolhatja a differenciálódás folyamatát a sejtfal prekursor molekulák extra/intracelluláris szintje, feltételezhetően a sporulációs folyamat iniciálásának szignáljaként szolgálhat. A normál differenciálódási folyamat „visszaállítása” pedig kiváltja a β -laktamáz enzim extracelluláris térbe történő szekrécióját is. Valószínű, hogy a baktérium sejtek a peptidoglikán turnover-t, mint egy általános jelzőrendszert használják arra, hogy információt kapjanak a peptidoglikán aktuális állapotáról.

Érdekes eredményt hozott azoknak a sejtfal bioszintézisét gátló anyagoknak a vizsgálata, amelyek a peptidoglikán bioszintézis korábbi lépéseit gátolják. Az agar-diffúziós módszerrel vizsgált antibiotikumok -vancomycin, bacitracin, cikloszerin, foszfonomycin- közül csak a vancomycin állította vissza kor-, és koncentráció-függő módon a légmicélium és spóráképzést. A vancomycin ugyanis a még nem keresztkötött peptidoglikán D-Ala-D-Ala végződéséhez kötődve megakadályozza az új sejtfal prekursor egységek beépülését a sejtfalba. Ennek következtében megemeli a sejtfal prekursorok szintjét a sejtben (116).

A gramicidin D ionofor és a penicillin G hatása a peptidoglikán sejtfal turnover-re a *S. griseus* törzsben

Kísérleteink második részében a peptidoglikán sejtfal β -laktám vegyületekkel kiváltott autolízisét tanulmányoztuk *S. griseus* törzsben. A korai-exponenciális növekedési fázisban levő sejtek murein rétegét [^3H]-N-acetilglükózaminnal jelöltük. A jelölt sejtek tenyésztését gramicidin D ionofór illetve párhuzamos kísérletekben penicillin G jelenlétében inkubálva, a jelölt sejtfal fragmentek felszabadulásának megemelkedését tapasztaltuk, ami a sejtfal lízis megnövekedését jelzi. A gramicidin D-vel kezelt mintákban szignifikánsan magasabb volt a felszabadított sejtfal fragmentek mennyisége, mint a kontroll mintákban, a sejtfal lízisének indukálásában azonban a

penicillin G bizonyult a hatékonyabb ágensnek. A penicillin G-vel illetve a gramicidin D-vel kezelt minták közti különbség különösen jelentős a mérés első 5 órájában, a penicillin G hatására már az inkubálás 5. órájára maximális a lízis, míg a gramicidin D 12 órás inkubálás alatt sem eredményezett ekkora radioaktív fragment felszabadulást.

A következőkben azt tanulmányoztuk, hogy a gramicidin D-vel történő kezelés milyen hatással van a *S. griseus* sejtek elektrokémiai potenciál gradiensének egyik komponensére, a membránpotenciál értékére. Vizsgálatainkhoz egy érzékeny fluoreszcens mérési módszert választottunk, a *S. griseus* törzs sejtek membránpotenciáljában bekövetkező változás mérésére egy $\Delta\Psi$ szenzitív fluoreszcens festék molekulát, a DiOC₆(3)-ot használtuk fel (93, 148). A várakozásainknak megfelelően a gramicidin D azonnal és erősen depolarizálta a protoplasztok membránpotenciálját. Mivel a gramicidin D-vel történő kezelés jelentősen megnövelte a kezelt tenyészetben a sejtfalból felszabaduló peptidoglikán fragmensek mennyiségét is, feltételezzük, hogy a $\Delta\Psi$ értékében bekövetkező csökkenésnek szerepe van a sejtfal lízisének előidézésében.

Annak eldöntésére, hogy a β -laktám antibiotikumok hatásmechanizmusában vajon szerepe van-e a membrán depolarizációjának, a penicillin G $\Delta\Psi$ -re kifejtett hatását tanulmányoztuk. Nagyon fontos kihangsúlyozni, hogy valamennyi fluorimetriás mérést protoplasztokkal végeztük, ezek nem rendelkeznek már sejtfallal, így a tesztelt β -laktám szerkezetű vegyületek hatása nem a sejtfalszintézis gátlásának eredménye. Az előzőkben leírt fluoreszcens módszert alkalmazva azt találtuk, hogy a penicillin G $2 \times \text{MIC}$ és $5 \times \text{MIC}$ közti tartományban jelentősen lecsökkentette a korai-exponenciális fázisban levő micéliumból izolált *S. griseus* protoplasztok $\Delta\Psi$ értékét, és a plazmamembránt depolarizáló hatása koncentrációfüggést is mutatott. A penicillin G antibiotikumnak a fluoreszcens intenzitást csökkentő hatása függ a protoplasztok életkorától is. A penicillin G ugyanis csak a korai-exponenciális növekedési stádiumban levő sejtekből nyert protoplasztok $\Delta\Psi$ értékére hatott, a késői-exponenciális fázisban levő sejtekből izolált protoplasztok membránját még nagyon magas, $5 \times \text{MIC}$ -ban sem depolarizálta. Ennek nem lehet az a magyarázata, hogy elpusztultak a protoplasztok, ugyanis gramicidin D adásával jelentős depolarizációt tudtunk kiváltani a penicillinnel kezelt idős protoplasztokon. Az idősebb protoplasztok penicillin G-vel szembeni rezisztenciája nem lehet annak sem a következménye, hogy ezen protoplasztok membránjában magasabb a β -laktamáz enzim aktivitása (27). Hiszen amikor ezeket a 17 órás protoplasztokat előzetesen klavulánsavval, β -laktamáz enzim gátlóval kezeltük, a penicillin G hatékonysága nem változott. Alátámasztja ezt a megállapításunkat az a tény is, hogy a penicillin G biológiailag inaktív bomlásterméke, a penicilloesav nem depolarizálta a *S. griseus* protoplasztjainak $\Delta\Psi$

értékét. A penicillin G membránpotenciálra kifejtett, életkortól függő *in vitro* hatása összhangban van tehát az *in vivo* mutatott, növekedési stádiumtól függő bakteriolitikus hatásával (136).

Ezt a tényt erősíti meg egyéb β -laktám szerkezetű antibiotikumok, mint pl. a penicillin származék ampicillin és cefalosporinok hatásának azonos módszerrel történő mérése. Várakozásunknak megfelelően hasonló eredményeket kaptunk. Valamennyi tesztelt β -laktám antibiotikum depolarizálta a protoplasztok membránját a *S. griseus* törzsben, az általuk kiváltott fluoreszcens intenzitás növekedés azonban sokkal kisebb mértékű, mint a penicillin G esetében.

Eredményeink alátámasztják kiindulási hipotézisünket, miszerint a sejtmembrán elektrofiziológiai állapota fontos faktor a sejtfal autolízisének regulációjában. A β -laktám antibiotikumok depolarizálják a *S. griseus* sejteit, és a $\Delta\Psi$ értékében bekövetkező változás szignálként szolgálhat az autolízis előidézésében. De mint azt a gramicidin D hatékonysága is mutatja, önmagában a membrán depolarizációja nem elegendő a masszív autolízis indukálásához. A peptidoglikán sejtfal bioszintézisének a gátlása szintén nagyon fontos tényezője a β -laktám antibiotikumok lítikus hatásának. Feltehetően a kombinált hatás, azaz a $\Delta\Psi$ depolarizációja és a sejtfal bioszintézis gátlása együttesen teszi ezeket a vegyületeket ilyen hatásos antibiotikumká. Szeretnénk kihangsúlyozni, hogy a β -laktám molekulák depolarizáló hatása nem a murein sejtfal bioszintézis gátlásának a következménye, hanem egy direkt hatás, hiszen a protoplasztok nem rendelkeznek sejtfallal. A β -laktám antibiotikumok által kiváltott depolarizáció molekuláris mechanizmusának részleteit azonban sajnos nem ismerjük, nem tudjuk, hogy a penicillin-kötő fehérjék illetve egyéb lehetséges target molekulák, mint pl. holinok és más szabályozó fehérjék szerepet játszanak-e ebben vagy sem. Az sem tisztázott, hogy a membránpotenciál értékében bekövetkező csökkenés hogyan vezet a sejtfal lízisének indukálásához. Egy nemrégiben megjelent közleményben leírták, hogy a λ -fággal fertőzött *E. coli* sejtekben a membránpotenciál depolarizációja a λ S holin proteinek összeszerelődését eredményezi a membránban. Az ily módon működőképpé vált holin fehérjék a murein sejtfal lízisét idézik elő (41, 44). A holinokkal homológ fehérjéket baktériumokban is leírtak (12). Így egy érdekes hipotézis lehet az, hogy a holin-homológ fehérjéknek a penicillin által indukált depolarizáció révén történő aktiválódása, és a sejtfal bioszintézisének gátlása teszi lehetővé a baktériumok sejtfalának masszív lízisét. Kísérleti eredményeink azokkal a mostanában publikált flow-citometriás mérésekkel is összhangban vannak, amelyek azt mutatják, hogy *Staphylococcus aureus*, *S. luteus* és *Micrococcus luteus* sejtek ampicillinnel történő kezelése a $\Delta\Psi$ depolarizációját eredményezte (99, 104, 142), de ezek a mérések más időskálán történtek.

Fenti eredményeink alapján azt feltételezzük, hogy a *S. griseus* sejtek β -laktám antibiotikumokkal előidézett depolarizációja fontos szerepet játszik a sejtfal autolízisének kiváltásában, ami a β -laktámokkal történő kezelés jól ismert következménye.

ÖSSZEFOGLALÁS

Új lokalizációjú β -laktamáz enzimet izoláltunk a *Streptomyces griseus* NRRL B-2682 törzsből, az enzimnek membránhoz kötött és extracelluláris formáját is kimutattuk. A két különböző enzimforma, biokémiai sajátosságai alapján, feltehetően ugyanannak a fehérjének eltérően „processzált” formája. Az extracelluláris β -laktamáz N-terminális szekvenciája egy másik *S. griseus* törzs D-aminopeptidáz enzimével mutat nagyfokú hasonlóságot.

A β -laktamáz enzim extracelluláris térbe történő szekréciója függ a törzs differenciálódási folyamatának stádiumától, hiszen a nem spórázó, spontán mutáns törzsekben (*spo1⁻*, *spo2⁻*, *spo3⁻*) csak a membránhoz kötött enzimforma mutatható ki. Ezzel összhangban, ha a vad típusú *S. griseus* spórázását meggátoljuk, a törzs nem választja ki a β -laktamáz enzimet az extracelluláris térbe. A nem spórázó törzsben globomycin hatására felszabadul a membránból a β -laktamáz enzim, így feltételezzük, hogy a II. típusú szignál-peptidáz enzim vesz részt az enzim „processzingjében „.

A spórázásban gátolt körülmények között növekvő vad típusú *S. griseus* tenyészetében a peptidoglikán sejtfal fragmentek és sejtfal analógok, a sejtfal szintézisét gátló antibiotikumok (penicillin, ampicillin, cefalosporinok és a vancomycin) kiváltották a β -laktamáz enzim szekrécióját, és ezzel párhuzamosan helyreállították a spórázást is folyadék és szilárd médiumon egyaránt.

A peptidoglikán sejtfal bioszintézisét gátló, és a sejtfal autolízisét indukáló β -laktám antibiotikumok hatását tanulmányoztuk a plazmamembrán elektrofiziológiai állapotára a *Streptomyces griseus* NRRL B-2682 törzsben. Egy fluoreszcens esszét alkalmazva a $\Delta\Psi$ szenzitív DiOC₆(3)-tal vizsgáltuk a *S. griseus* protoplasztjainak membránpotenciálját.

Kimutattuk, hogy a β -laktám antibiotikumok – penicillin G, ampicillin, cephaloridin, cefamandol és cefotaxim – koncentráció és életkorfüggő módon $\Delta\Psi$ csökkenést, depolarizációt okoznak ebben a törzsben. A β -laktám vegyületek inaktív komponenseinek, mint például penicillamin, 6-aminopenicillin-sav és a biológiailag inaktív hidrolizált származéknak, a penicilloesavnak nincs depolarizáló hatása a protoplasztok membránpotenciáljára.

Bizonyítottuk, hogy a nem specifikus, kation-csatornaképző ionofór, a gramicidin D nemcsak a plazmamembránt depolarizálta, hanem a sejtfal lízisét is indukálta. Megfigyeléseink alapján feltételezzük, hogy a transzmembrán potenciál értékének megváltozása fontos lépés lehet a sejtfal autolízisének triggerelésében a *Streptomyces griseus* törzsben.

IRODALOMJEGYZÉK

1. **Abigail, A. and D. D. Whitt.** (2002). Antimicrobial Compounds. In Bacterial Pathogenesis, A Molecular Approach. 2nd ed. ed. by American Society for Microbiology, Washington, D. C.
2. **Aharonowitz, Y., Cohen, G. and J. F. Martin.** (1992). Penicillin and cephalosporin biosynthetic genes: structure, organization, regulation and evolution. *Annu. Rev. Microbiol.* **46**: 461-495.
3. **Andersen, O. S.** (1984). Gramicidin channels. *Annu. Rev. Physiol.* **46**: 531-548.
4. **Ando, N., Matsumori, N., Sakuda, S., Beppu, T. and S. Horinouchi.** (1997). Involvement of AfsA in A-factor biosynthesis as a key enzyme. *J. Antibiot.* **50**: 847-852
5. **Anhalt, J. and J. Washington.** (1991). Preparation and storage of antimicrobial solutions. P. 1199-1200. In: Balows, W. J. Hausler, Jr. K. L. Herrmann, H. D. Isenberg, and H. J. Shadomy. (ed.) Manual of clinical microbiology. 5th. Ed. American Society for Microbiology. Washington, D. C.
6. **Asano, Y., Kato, Y., Yamada, A. and K. Ando.** (1992). Structural similarity of D-amino peptidase to carboxypeptidase DD and β -lactamases. *Biochemistry* **31**: 2316-2328.
7. **Asano, Y., Ito, H., Dairi, T. and Y. Kato.** (1996). An alkaline D-stereospecific endopeptidase with β -lactamase activity from *Bacillus cereus*. *J. Biol. Chemistry.* **271**: 30256-30262.
8. **Barabás, J., Barabás, G., Szabó, I., Veenhuis, M. and W. Harder.** (1988). Penicillin-binding proteins of protoplast and sporoplast membranes of *Streptomyces griseus* strains. *Arch. Microbiol.* **150**: 105-108.
9. **Barabás, G., Penyige, A. and T. Hirano.** (1994). Hormone-like factors influencing differentiation of *Streptomyces* cultures. *FEMS Microbiol. Rev.* **14**: 75-82
10. **Bayles, K. W.** (2000). The bactericidal action of penicillin: new clues to an unsolved mystery. *Trends in Microbiol.* **8**: 274-278.
11. **Bender, R. A., Janssen, K. A., Resnick, A. D. M., Blumenberg, F. F. and B. Magasanik.** (1977). Biochemical parameters of glutamine synthetase from *Klebsiella aerogenes*. *J. Bacteriol.* **129**: 1001-1009.
12. **Berckmen, M., Benedik, M. J. and U. Blasi.** (1997). The *Serratia marcescens* NucE protein functions as a holin in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **179**: 6522-6524.
13. **Betzner, A. S., Ferreira, L. C. S., Hölftje, J. V. and W. Keck.** (1990). Control of the activity of the soluble lytic transglucosylase by the stringent response in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **67**:1161-164.
14. **Brian G. Spratt.** (1994). Resistance to antibiotics mediated by target alternations. *Science.* **264**: 388-393.
15. **Brunskill, E. W. and K. W. Bayles.** (1996). Identification of LytSR-regulated genes from *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **178**: 5810-5812.

16. **Burbulys, D., Trach, K. A. and J. A. Hoch.** (1991). Initiation of sporulation in *B. subtilis* is controlled by a multicomponent phosphorelay. *Cell* **64**: 545-552.
17. **Bush, K.** (1989). Characterization of β -lactamases. *Antimic. Agents and Chemother.* **33**: 259-263.
18. **Bush, K., Jacoby, G. A. and A. A. Medeiros.** (1995). A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimic. Agents and Chemother.* **39**: 1211-1233.
19. **C. Méndez, Brand, A. F., Manzanal, M. B. and C. Hardisson.** (1985). Role of substrate mycelium in colony development in Streptomycetes. *Can. J. Microbiol.* **31**: 446-451.
20. **Chater, F. K., and M. J. Merrick.** (1979). Streptomycetes, p. 93-114. In J. H. Parish(ed.), *Developmental Biology of Prokaryotes*. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
21. **Chater, F. K.** (1989). Sporulation in Streptomyces p. 277-299. In I. Smith, R. A. Slepecky, and P. Setlow (ed.), *Regulation of Prokaryotic Development*. American Society for Microbiology, Washington, D. C.
22. **Chater, K. F., Bruton, C. J., Plaskitt, K. A., Buttner, M. J., Mendez, C. and J. Helmann.** (1989). The developmental fate of *Streptomyces coelicolor* hyphae depends crucially on a gene product homologous with the motility sigma factor of *Bacillus subtilis*. *Cell* **59**: 133-143.
23. **Chater, K. F.** (1992). *Streptomyces* genetics in the 1990s. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **8**: 18-21.
24. **Chater, K. F. and D. A. Hopwood.** (1993). Gram-positive bacteria: Streptomyces. In the *Bacillus subtilis and other Gram-positive bacteria*, pp. 83-101. Edited by A. L. Sonenshein, J. A. Hoch & R. Losick. FL: ASM Washington D. C.
25. **Citri, N.** (1971). Penicillinase and other β -lactamases. In *The Enzymes* New York: Academic Press **4**: 23-26.
26. **Coque, J. J. R., Liras, P. and J. F. Martín** (1993). Genes for a β -lactamase, a penicillin-binding protein and a transmembrane protein are clustered with the cephamycin biosynthesis genes in *Nocardia lactamdurans*. *EMBO J.* **12**: 631-639.
27. **Deák, E., Szabó, I., Kálmáncz helyi, A., Gál, Zs., Barabás, Gy. and A. Penyige.** (1998). Membrane-bound and extracellular β -lactamase production with developmental regulation in *Streptomyces griseus* NRRL B-2682. *Microbiology* **144**: 2169-2177.
28. **Distler, J., Mansouri, K., Mayer, G., Stockmann, M. and W. Pipersberg.** (1992). Streptomycin biosynthesis and its regulation in streptomycetes. *Gene* **115**: 105-111.
29. **Dixon, M.,** (1953). The determination of enzyme inhibitor constants. *J. Biochem.* **55**: 151-159.
30. **Ehlert, K. and J.V. Höltje.** (1996). Role of precursor translocation in coordination of murein and phospholipid synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **178**: 6766-71
31. **Eisenstadt, E., Carlton, B. C. and B. J. Brown.** (1994). Molecular Genetics: Gene mutation. In the *Methods for general and molecular bacteriology*, pp. 297-317. Edited by P. Gerhardt, R. G. E. Murray, W. A. Wood, N. R. Krieg. FL: ASM, Washington D. C.
32. **Engelbert, S., Piras, G., Kharroubi, A. EL, Joris, B., Coyette, J., M. Nguyen-Disteche and J.-M. Ghuysen.** (1993). Modular design of the bi(multi?)functional penicillin-binding proteins. In:

- Bacterial Growth and Lysis: Metabolism and structure of the Bacterial sacculus* (ed. M.A. de Pedro, J. V. Höltje and W. Löffelhardt). Plenum Publishing Co. Ltd., 319-333.
33. **Ensign, J. C.** (1988). Physiological regulation of sporulation of *Streptomyces griseus*. In *Biology of Actinomycetes* '88, pp. 309-315. Edited by Y. Okami, T. Beppu & H. Ogawara. Tokyo: Japan Scientific Press.
 34. **Fujimoto, D. F. and K. W. Bayles.** (1998). Opposing roles of the *Staphylococcus aureus* virulence regulators, Agr and Sar, in Triton X-100 and penicillin-induced autolysis. *J. Bacteriol.* **180**: 3724-3726.
 35. **Ghuysen, J.-M.** (1976). The in the wall peptidoglycan assembly centers. Site of penicillin action. In. The bacterial DD-carboxypeptidase-transpeptidase enzyme system: A new insight into the mode of action of penicillin. J-M Ghuysen (Ed) University of Tokyo Press. pp: 3-42
 36. **Ghuysen, J.-M.** (1991). Serine β -lactamases and penicillin-binding proteins. *Annu. Rev. Microbiol.* **45**: 37-67.
 37. **Ghuysen, J.-M.** (1994). Molecular structures of penicillin-binding proteins and β -lactamases. *Trends Microbiol.* **2**: 372-380.
 38. **Giesbrecht, P., Kersten, T. and J. Wecke.** (1992). Fan-shaped ejections of regularly arranged murosomes involved in penicillin-induced death of Staphylococci. *J. Bacteriol.* **174**: 2241-2252.
 39. **Goffin, C., Fraipont, C., Ayala, J., Terrak, M., M. Nguyen-Disteche and J.-M. Ghuysen.** (1996). The non penicillin-binding module of the tripartite penicillin-binding protein 3 of *Escherichia coli* is required for folding and/or stability of the penicillin-binding module, and the membrane-anchoring module confers cell septation activity on the folded structure. *J. Bacteriol.* **178**: 5402-5409.
 40. **Goodfellow, M. and T. Cross.** 1984. Classification, p.7-164. In M. Goodfellow, M. Mordarski and S. T. Williams (ed.), *The Biology of the Actinomycetes*. Academic Press, London.
 41. **Graschopf, A. and U. Bläsi.** (1999). Molecular function of the dual start motif in the lambda S holin. *Mol. Microbiol.* **33**: 569-582.
 42. **Grebe, T., Paik, J. and R. Hakenbeck.** (1997). A novel resistance mechanism against β -lactams in *Streptococcus pneumoniae* involves CpoA, a putative glycosyltransferase. *J. Bacteriol.* **179**: 3342-3349.
 43. **Groicher, K. H., Friek, B. A., D. F. Fujimoto and K. W. Bayles.** (2000). The *Staphylococcus aureus* lrgAB operon modulates murein hydrolase activity and penicillin tolerance. *J. Bacteriol.* **182**: 1794-1801.
 44. **Gründig, A., Smith, D. L., Bläsi, U. and R. Young.** (2000). Dimerization between the holin and holin inhibitor of phage λ . *J. Bacteriol.* **182**: 6075-6081.
 45. **Guenz, E., Gase, A. M., Sicard, M. A. and R. Hakenbeck.** (1994). A two-component signal-transducing system is involved in competence and penicillin susceptibility in laboratory mutants of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* **12**: 505-515.
 46. **Hara, O. and T. Beppu.** (1982). Mutants blocked in streptomycin production in *Streptomyces griseus*: the role of A-factor. *J. Antibiot.* **35**: 349-358.

47. **Hard, K., Joris, J. B., Pelage, S., Brassier, R., Lampe, J. O., Freer, J. M., Fink, A. L. and J.-M. Ghuysen.** (1997). The penicillin sensory transducer, Blare, involved in the indelibility of β -lactamase synthesis in *Bacillus licheniformis* is embedded in the plasma membrane via four- α -helix bundle. *Mol. Microbiol.* **23**: 935-944.
48. **Harold F.M.** (1977). Ion currents and physiological functions in microorganisms. *Ann. Rev. Microbiol.* **31**: 181-203
49. **Hashimoto, K., Nihira, T., Sakuda, S. and Y. Yamada.** (1992). IM-2, a butyrolactone autoregulator induces production of several nucleoside antibiotics in *Streptomyces* sp. FRI-5. *J. Ferment. Bioeng.* **73**: 449-455.
50. **Hayashi, S. and H. C. Wu.** (1990). Lipoproteins in bacteria. *J. Bioenerg. Biomembr.* **22**: 451-472.
51. **Heinz Schott.** (1993). A medicina krónikája. Officina Nova Könyv és Lapkiadó Kft. 1928-1929. oldal.
52. **Hiroshi Nikaido.** (1994.) Prevention of drug access to bacterial targets: Permeability barriers and active efflux. *Science.* **264**: 382-387.
53. **Höltje, J.-V.** (1995). From growth to autolysis: the murein hydrolases in *Escherichia coli*. *Arch. Microbiol.* **164**: 243-254.
54. **Höltje, J.-V.** (1998). Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of
55. **Horinouchi, S. and T. Beppu.** (1990). Autoregulatory factors of secondary metabolism and morphogenesis in actinomycetes. *Crit. Rev. Biotechnol.* **10**: 191-204.
56. **Horinouchi, S. and T. Beppu.** (1992). Autoregulatory factors and communication in actinomycetes. *Annu. Rev. Microbiol.* **46**: 377-398.
57. **Horinouchi, S. and T. Beppu.** (1992). Regulation of secondary metabolism and cell differentiation in *Streptomyces* : A factor as microbial hormone and the AfsR protein as a complement of a two-component regulatory system. *Gene* **115**: 167-172.
58. **Horinouchi, S. and T. Beppu.** (1994). A-factor as a microbial hormone that controls cellular differentiation and secondary metabolism in *Streptomyces griseus*. *Mol. Microbiol.* **12**: 859-864.
59. **Horinouchi, S.** (1996). *Streptomyces* genes involved in ariel mycelium formation. *FEMS Microbiol. Lett.* **141**: 1-9.
60. **Horinouchi, S.** (1999). Gamma-butyrolactones that control secondary metabolism and cell differentiation in *Streptomyces*. In Cell-cell signalling in bacteria, ed. by G. M. Dunny, and S. C. Winans. American Society for Microbiology, Washington, D. C.
61. **Hussain, M., Pastor, F. I. J. and J. O. Lampen.** (1987). Cloning and sequencing of the *bla_z* gene encoding a β -lactamase III, a lipoprotein of *Bacillus cereus* 569/H. *J Bacteriol* **169**: 579-586.
62. **Inui, T., T. Endo and T. Matsushita.** 2000. Morphological changes and lysis induced by β -lactams associated with the characteristic profiles of affinities of penicillin-binding proteins in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**: 1518-1523.
63. **Inukai, M., Takeuchi, M., Shimizu, K. and M. Arai.** (1978). Mechanism of action of globomycin. *J. Antibiot.* **31**: 1203-1205.

64. **Jacobs, C., Frere, J. M. and Normark, S.** (1997). Cytosolic intermediates for cell wall biosynthesis and degradation control inducible β -lactam resistance in Gram-negative bacteria. *Cell* **88**: 823-832.
65. **Jacobs, C., Huang, Li-jun, Bartowsky, E., Normark, S. and J. T. Park.** (1994). Bacterial cell wall recycling provides cytosolic muropeptides as effectors for β -lactamase induction. *EMBO Journal* **13**: 4684-4694.
66. **Jiang, H. and K. E. Kendrick.** (2000). Characterization of *ssfR* and *ssgA*, two genes involved in sporulation of *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* **182**: 5521-5529.
67. **Jolliffe, L. K., Doyle, R. J. and U. N. Streips.** 1981. The energized membrane and cellular autolysis in *Bacillus subtilis*. *Cell* **25**: 753-763.
68. **Jorge M. Santos, Lobo, M., Matos, A. P. A., M. A. de Pedro and C. M. Arraiano.** (2002). The gene *bola* regulates *dacA* (PBP5), *dacC* (PBP6) and *ampC* (AmpC), promoting normal morphology in *E. coli*. **45**: 1729-1736.
69. **Joris, B., Hardt, K. and J.-M. Ghuysen.** (1994). Induction of β -lactamase and low affinity penicillin-binding protein 2' synthesis in Gram-positive bacteria. *New Comprehensive Biochem.* **27**: 505-515.
70. **Juana, M., Forsman, M., Lenzini, M. V., Brans, A. and J. Dusart.** (1992). Two different β -lactamase genes are present in *Streptomyces cacaoi*. *FEMS Microbiol. Lett.* **99**: 101-106.
71. **Julian Davis.** (1994). Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science* **264** :375-381
72. **Kariyama, R. and G. D. Shockman.** (1992). Extracellular and cellular distribution of muramidase-2 and muramidase-1 of *Enterococcus hirae* ATCC 9790. *J. Bacteriol.* **174**: 3236-3241.
73. **Kathleen A. O'Connor and D. R. Zusman.** (1999). Induction of β -lactamase influences the course of development in *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **181**: 6319-6331.
74. **Kato, J., Suzuki, A., Yamazaki, H., Ohnishi, Y. and S. Horimuchi.** (2002). Control by A-factor of a metallopeptidase gene involved in ariel mycelium formation in *S. griseus*. *J. Bacteriol.* **184**: 6016-6025.
75. **Kendrick, K. E. and J. C. Ensign.** (1983). Sporulation of *Streptomyces griseus* in submerged culture. *J. Bacteriol.* **155**: 357-366.
76. **Kharroubi, E. A., Piras, G., Jacques, P., Szabó, I., Van Beeumen, J., Coyette, J. and J.-M. Ghuysen.** (1989). Active-site membrane topology of the DD-peptidase/penicillin-binding protein no. 6 of *Enterococcus hirae* (*Streptococcus faecium*) A.T. C. C. 9790. *Biochem. J.* **262**: 457-462.
77. **Khoklov, A. S., Tovar, I. I. and L. N. Borisova.** (1967). A factor responsible for the biosynthesis of streptomycin by a mutant strain of *Actinomyces streptomycini*. *Dokl. Akad. Nauk .SSSR* **177**: 232-235.
78. **Khokhlov, A. S., Anisova, L. N., Tovarova, I. I., Kleine, E. M., Krassilnikova, O. S., Kornitskaya, E. Y. and S. A. Pilner.** (1973). Effect of A-factor on growth of a sporogeneous mutant of *Streptomyces griseus* not producing this factor. *Z Allg Mikrobiol.* **13**: 647-655.

79. **Khoklov, A. S.** (1985). Actinomycete autoregulators. In *Proceedings of Sixth International symposium on Actinomycetes Biology*, G. Szabó, S. Biró, and M. Goodfellow (eds.), pp. 791-798. Akadémia Kiadó, Budapest.
80. **Kobayashi, T., Zhu, Y. F., Nicholls, N. and J. O. Lampen.** (1987). A second regulatory gene, *blaR1*, encoding a potential penicillin-binding protein required for induction of β -lactamase in *Bacillus licheniformis*. *J. Bacteriol* **169**: 3873-3878.
81. **Kumar, C. V., de la Fuente, J. L., Leitao, A. L., Piras, P. and J. F. Martin** (1996). Effect of amplification or targeted disruption of β -lactamase gene of *Nocardia lactamdurans* on cephamycin biosynthesis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **45**: 621-628.
82. **Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
83. **Lampen, J. O., F. I. J. Pastor and M. Hussain.** (1986). Processing of secreted proteins and the signal peptidases of bacilli. In *Microbiology-1985*, pp. 279-282. Edited by L. Leive. *American Society for Microbiology* Washington, D.C.
84. **Lawlor, E. J., Baylis, H. A. and K. F. Chater.** (1987). Pleiotropic morphological and antibiotic deficiencies result from mutations in a gene encoding a t-RNA-like product in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Genes Dev.* **1**: 1305-1310.
85. **Lenzini, M. V., Juana, M., Fraipont, C., Joris, B., Matagne, A. and J. Dusart.** (1992). Induction of a *Streptomyces cacaoi* β -lactamase gene cloned in *S. lividans*. *Mol. Gen. Genet.* **235**: 41-48.
86. **Leskiw, B. K., Lawlor, E. J., J. M. Fernandez-Abalos, and K. F. Chater.** (1991). TTA codons in some genes prevent their expression in a class of developmental, antibiotic-negative *Streptomyces* mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 2461-2465.
87. **Lezhava, A., Kameoka, D., Sugino, H., Goshi, K., Shinkawa, H., Nimi, O., Horinouchi, S., Beppu, T. and H. Kinashi.** (1997). Chromosomal deletion in *Streptomyces griseus* that remove the *afsA* locus. *Mol. Gen. Genet.* **253**: 478-483.
88. **Liao, X. and R.E.W. Hancock.** (1995). Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa pbpB* gene encoding a penicillin-binding protein 3. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **39**: 1871-1874.
89. **Loessner, M. J., Gaeng, S., Wendlinger, G., Maier, S. K. and S. Scherer.** (1998). The two-component lysis system of *Staphylococcus aureus* bacteriophage: a TTG-start holin and an associated amidase endolysin. *FEMS Microbiol. Lett.* **162**: 265-274.
90. **Lowry, O. H., Rosebrough, N. J. Farr, A. L. and R. J. Randall.** (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
91. **Lubitz, W., Harkness, R. E. and E. E. Ishiguro.** (1984). Requirement for a functional host cell autolytic enzyme system for lysis of *Escherichia coli* by bacteriophage phi X174. *J. Bacteriol.* **159**: 385-387.
92. **Maras, B., Greenblatt, H. M., Shoham, G., Spungin-Bialik, A., Blumberg, S. and D. Barra** (1996). Aminopeptidase from *Streptomyces griseus*. *Eur. J. Biochem.* **236**: 843-846

93. **Mason, D., Allman, R. and D. Lloyd.** (1993). Uses of membrane potential sensitive dyes with bacteria. In: Flow cytometry in microbiology Ed: D. Lloyd Springer Verlag London, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, Hong Kong, Barcelona, Budapest. pps: 67-82
94. **McCarthy, A. J. and S. T. Williams.** (1992). Actinomycetes as agents of biodegradation in the environment-a review. *Gene* **115**: 189-192
95. **McCue, L. A., Kwak, J., Babcock, M. J. and K. E. Kendrick.** (1992). Molecular analysis of sporulation in *Streptomyces griseus*. *Gene* **115**: 173-179.
96. **Miyake, K., Yoshida, M., Chiba, N.** (1989). Detection and the properties of the A-factor binding protein from *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* **171**: 4298-4302.
97. **Miyake, K., Kuzuyama, T., Horinouchi, S. and T. Beppu.** (1990). The A-factor binding protein of *Streptomyces griseus* negatively controls streptomycin production and sporulation. *J. Bacteriol.* **175**: 133-140.
98. **Moreillon, P.** (1990). Two bactericidal targets for penicillin in pneumococci: autolysis-dependent and autolysis independent killing mechanisms. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **34**: 33-39.
99. **Mortimer, F. C., Mason, D. J. and V. A. Gant.** (2000). Flow cytometric monitoring of antibiotic-induced injury in *Escherichia coli* using cell-impairment fluorescent probes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**: 676-681.
100. **Nagarajan, V.** (1993). Transcription and translation machinery: Protein secretion. In the *Bacillus subtilis and other Gram-positive bacteria*, pp. 713-729. Edited by A. L. Sonenshein, J. A. Hoch & R. Losick. FL: ASM Washington D. C.
101. **Nielsen, J. B. K. and J. O. Lampen.** (1982). Membrane-bound penicillinases in gram-positive bacteria. *J. Biol. Chem.* **257**: 4490-4495.
102. **Nielsen, J. B. K. and J. O. Lampen.** (1983). β -lactamase III of *Bacillus cereus* 569: membrane lipoprotein and secreted protein. *Biochemistry* **22**: 4652-4656.
103. **Novak, R. Charpentier, E., J. S. Braun. and E. Tuomanen.** (2000). Signal transduction by a death signal peptide: uncovering the mechanism of bacterial killing by penicillin. *Mol. Cell.* **5**: 49-57.
104. **Novo, D. J., Perlmutter, N. G., Hunt, R. H. and H. M. Shapiro.** (2000). Multiparameter flow cytometric analysis of antibiotic effects on membrane potential, membrane permeability, and bacterial counts of *Staphylococcus luteus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**: 827-834.
105. **O'Callaghan, C. H., Morris, A., Kirby, S. and Shingler, A. H.** (1972). Novel method for detection of β -lactamase by using a chromogenic cephalosporin substrate. *Antimicrob. Agents and Chemother.* **1**: 283-288.
106. **Ogawara, H.** (1975). Production and properties of β -lactamase in *Streptomyces*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **8**: 402-408.
107. **Ogawara, H.** (1981). Antibiotic resistance in the pathogenic and the producing bacteria with special reference to β -lactam antibiotics. *Microbiol. Rev.* **45**: 591-619.
108. **Ogawara, H.** (1996). Structure and evolution of β -lactamase genes from *Streptomyces*. *Actinimycetol.* **10**: 104-111.

109. **Ogawara, H., N. Kawamura, T. Kudo, K. Suzuki and T. Nakase.** (1999). Distribution of β -lactamases in Actinomycetes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**: 3014-3017.
110. **Ohnishi, Z., Kameyama, S., Onaka, H. and S. Horinouchi.** (1999). The A-factor regulatory cascade leading to streptomycin biosynthesis in *Streptomyces griseus*: identification of a target gene of the A-factor receptor. *Mol. Microbiol.* **34**: 102-111.
111. **Okanishi, M., Suzuki, K. and H. Umezawa.** Formation and reversion of Streptomycte protoplasts, cultural condition and morphological study. *J. Bacteriol.* **80**: 89-400.
112. **Olivia, B., Gordon, G., McNicholas, P., Ellestad, G. and I. Chopra.** (1992). Evidence that tetracycline analogs, whose primary target is not the bacterial ribosome cause lysis of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**: 913-919.
113. **Onaka, H., Sugiyama, M. and S. Horinouchi.** (1997). A mutation at proline-115 in the A-factor receptor protein of *Streptomyces griseus* abolishes DNA-binding activity but not ligand-binding activity. *J. Bacteriol.* **177**: 6083-6092.
114. **Ottolenghi, A. C., Caparrós, M. and de Pedro, M. A.** (1993). Peptidoglycan tripeptid content and cross-linking are altered in *Enterobacter cloacae* induced to produce Amp C β -lactamase by glycine and D-amino acids. *J. Bacteriol.* **175**: 1537-1542.
115. **Oudega, B., Clark, D., Stegehuis, F., Majoor, M. J. and J. Luirink.** (1993). A lipoprotein signal peptide plus a cysteine residue at the amino terminal end of the periplasmic protein β -lactamase is sufficient for its lipid modification, processing and membrane localization in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **108**: 353-360.
116. **Park, J. T.** (1952). Uridine-5'-phosphate derivatives. III. Amino-acid-containing derivatives. *J. Biol. Chem.* **194**: 897-904.
117. **Penyige, A., Kálmánczhelyi, A., Sipos, A., Ensign, J. C. and Gy. Barabás.** (1994). Modification of glutamine synthetase in *Streptomyces griseus* by ADP-ribosylation and adenylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **204**: 598-605.
118. **Penyige, A., Deák, E., Kálmánczhelyi, A. and Gy. Barabás.** (1996). Evidence of a role for NAD^+ -glycohydrolase and ADP-ribosyltransferase in growth and differentiation of *Streptomyces griseus* NRRL B-2682: inhibition by *m*-aminophenylboronic acid. *Microbiology* **42**: 1937-1944.
119. **Perego, M., Higgins, C. F., Pearce, S. R., Gallagher, M. P. and J. A. Hoch.** (1991). The oligopeptide transport system of *Bacillus subtilis* plays a role in the initiation of sporulation. *Mol. Microbiol.* **5**: 173-185.
120. **Pérez-Larena, J. F., Liras, P., Rodríguez-García, A. and Juan F. Martín** (1997). A regulatory gene (*ccr*) required for cephamycin and clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus*: amplification results in overproduction of both β -lactam compounds. *J. Bacteriol.* **179**: 2053-2059.
121. **Reinicke, B., Blümel, B., Labischinski, H. and P. Giesbrecht.** (1985). Neither an enhancement of autolytic wall degradation nor inhibition of the incorporation of cell wall material are prerequisites for penicillin-induced bacteriolysis in staphylococci. *Arch. Microbiol.* **141**: 309-314.
122. **Retzlaff, L., and J. Distler.** (1995). The regulator of streptomycin gene expression, StrR, of *Streptomyces griseus* is a DNA-binding activator protein with multiple recognition sites. *Mol. Microbiol.* **18**: 151-162.

123. **Rice, K. C., Firek, B. A., Nelson, J. B., Soo-Jin Yang, Patton, T. G. and K. W. Bayles.** (2003). The *Staphylococcus aureus* *cid AB* operon: evaluation of its role in regulation of murein hydrolase activity and penicillin tolerance. *J. Bacteriol.* **185**: 2635-2643.
124. **Rogers, H. J. and C. W. Forsberg.** (1971). Role of autolysins in the killing of bacteria by some bactericidal antibiotics. *J. Bacteriol.* **108**: 1235-1243
125. **Samuni, A.** (1975). A direct spectrophotometric assay and determination of Michaelis constants for the β -lactamase reaction. *Anal Biochem* **63**: 17-26.
126. **Schmidt, H., Korfmann, G., Barth, H. and H. H. Martin.** (1995). The signal transducer encoded by *ampG* is essential for induction of chromosomal AmpC β -lactamase in *Escherichia coli* by β -lactam antibiotics and unspecific inducers. *Microbiology* **141**: 1085-1092.
127. **Shockman, G. D.** (1992). The autolytic ('suicides') system of *Enterococcus hirae*: From lysine depletion autolysis to biochemical and molecular studies of the two muramidases of *Enterococcus hirae* ATCC 9790. *FEMS Microbiol. Lett.* **100**:261-268.
128. **Shockman, G. D. and J.-V. Höltje.** (1994). Microbial peptidoglycan (murein) hydrolases. In J.-M Ghuysen and R. Hakenbeck (ed.) *Bacterial cell wall*. Elsevier Science B. V.
129. **Sims, J., Waggoner, A. S., Warg, C., and J. F. Hoffman.** (1974). Studies of the mechanism by which cyanine dyes measure membrane potential in red blood cells and phosphatidylcholine vesicles. *Biochemistry.* **13**: 3315-3329.
130. **Svarachorn, A., Shinmyo, A., Tsuchido, T. and M. Takano.** (1989). Autolysis of *Bacillus subtilis* induced by monovalent cations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **30**: 299-304.
131. **Szász Gy., Takács M., Végh, A.** (1990). Gyógyszerészi kémia. Negyedik kiadás. Medicina, Budapest. 1125-1136 oldal.
132. **Thomas, A., Henderson, K., Young, D., Deome, S. A. and P. K. Elf.** (1997). AmpC and AmpH, proteins related to the class C β -lactamases, bind penicillin and contribute to the normal morphology of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **179**: 6116-6121.
133. **Tipper, D. J. and J. L. Strominger.** (1965). Mechanism of action of penicillins: a proposal based on their structural similarity to acyl-D-alanyl-D-alanine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **54**: 1133-1141.
134. **Tomasz, A.** (1970). Multiple antibiotic resistance in a bacterium with suppressed autolytic system. *Nature* **227**: 138-140.
135. **Tuomanen, E. and A. Tomasz.** (1986). Induction of autolysis in nongrowing *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **167**: 1077-1080.
136. **Tuomanen, E., Cozens, R., Tosch, W., Zak, O. and A. Tomasz.** (1986). The rate of killing of *Escherichia coli* by beta-lactam antibiotics is strictly proportional to the rate of bacterial growth. *J. Gen. Microbiol.* **137**: 1297-1304.
137. **Ueda, K., Miyake, K., Horinouchi, S. and T. Beppu.** (1993). A gene cluster involved in aerial mycelium formation in *Streptomyces griseus* encodes proteins similar to the response regulators of two component regulatory systems and membrane translocators. *J. Bacteriol.* **175**: 2006-2016.

138. **Ueda, K., Hsheh, C.-W. Tosaki, T., Shinkawa, H., Beppu, T. and S. Horinouchi.** (1998). Characterization of an A-factor responsive repressor for *amfR* essential for onset of aerial mycelium formation in *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* **180**: 5085-5093.
139. **Van Wezel, G. P., van der Meulen, Kawamoto, S., Luiten, R. G. M., Koerten, H. K. and B. Kraal.** (2000). *SsgA* is essential for sporulation of *Streptomyces coelicolor* A3(2) and affects hyphal development by stimulating septum formation. *J. Bacteriol.* **182**: 5653-5662.
140. **Walderich, B., and J.-V. Höltje.** (1989). Specific localization of the lysis protein of bacteriophage MS2 in membrane adhesion sites of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **171**: 3331-3336
141. **Wang** (2000). Holins: the protein clocks of bacteriophage infections. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**: 799-825.
142. **Wickens, H. J., Pinney, R. J., Mason, D. J. and V. A. Gant.** (2000). Flow cytometric investigation of filamentation, membrane patency, and membrane potential in *Escherichia coli* following ciprofloxacin exposure. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**: 682-687.
143. **Wu, H. C.** (1985). Biogenesis of membrane lipoproteins in bacteria. In: L. Leive (ed.), *Microbiology-1985*. American Society for Microbiology Washington, D. C. 303-307.
144. **Yamada, Y. Sugamura, K., Kondo, K., Yanagimoto, M. and H. Okada.** (1987). The structure of inducing factors for virginiamycin production in *S. virginiae*. *J. Antibiot.* **40**: 496-504.
145. **Yamazaki, H., Ohnishi, Y. and S. Horinouchi.** (2003). Transcriptional switch on of *ssgA* by A-factor, which is essential for spore septum formation in *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* **185**: 1273-1283.
146. **Yamazaki, H., Ohnishi, Z. and S. Horimuchi.** (2000). An A-factor dependent extracytoplasmic function sigma-factor (σ^{AdsA}) that is essential for morphological development in *S. griseus*. *J. Bacteriol.* **182**: 4596-4605.
147. **Yousif, S. Y., Broome-Smith, J. K. and B. G. Spratt.** (1985). Lysis of *Escherichia coli* by β -lactam antibiotics: deletion analysis of the role of penicillin-binding proteins 1A and 1B. *J. Gen. Microbiol.* **131**: 2839-2845.
148. **Zaritsky, A., Kihare, M. and R.M. MacNab.** (1981) Measurement of membrane potential in *Bacillus subtilis*: a comparison of lipophilic cations rubidium ion and a cyanine dye as probes. *J. Membr. Biol.* **63**: 215-231.
149. **Zhu, Y., Engelbert, S., Joris, B., Ghuysen, J. M., Kobayashi, T. and J. O. Lampen.** (1992). Structure, function, and fate of the BlaR signal transducer involved in induction of β -lactamase in *Bacillus licheniformis*. *J. Bacteriol.* **174**: 6171-6178.

PUBLIKÁCIÓS LISTA

A dolgozathoz felhasznált publikációk jegyzéke:

Penyige, A., **Deák, E.**, Kálmánczhelyi, A. and Barabás, Gy. (1996). Evidence of a role for NAD⁺-glycohydrolase and ADP-ribosyltransferase in growth and differentiation of *Streptomyces griseus* NRRL B-2682: inhibition by aminophanylboronic acid.

Microbiology, **142**:1937-1944

Impakt faktor: 2.897

Deák, E., Szabó, I., Kálmánczhelyi, A., Gál, Zs., Barabás, Gy. and Penyige, A. (1998). Membrane-bound and extracellular β -lactamase production with developmental regulation in *Streptomyces griseus* NRRL B-2682.

Microbiology, **144**, 2169-2177

Impakt faktor: 2.897

Penyige, A., Matkó, J., **Deák, E.**, Bodnár, A., Barabás, Gy. (2002). Depolarisation of the membrane potential by β -lactams as a signal to induce autolysis.

BBRC **290**: 1169-1175

Impakt faktor: 2.935

Egyéb közlemény:

Gál, Zs., Koncz, Á., Szabó, I., **Deák, E.**, Benkő, I., Barabás, Gy., Hernádi, F. and Kovács, P. (2000) A synthetic γ -lactone group with β -lactamase inhibitory and sporulation initiation effects.

Journal of Chemotherapy, **12**: 274-279.

Impakt faktor: 0.828

Penyige, A., **Deák, E.**, Schmelzer, I., Vargha, Gy., Fülöp, T., Csongor, J. and Gy. Barabás. (2004). Analysis of the involvement of GTP-binding protein in morphological differentiation of *Streptomyces griseus*.

Beküldve: *Microbiology*