

EGYETEMI DOKTORI (PH. D.) ÉRTEKEZÉS

**Borderline methicillin-rezisztens *Staphylococcus aureus*
törzsek β -laktamázainak analízise**

Keserű Judit Szilvia

Témavezető: Dr. Biró Sándor



**DEBRECENI EGYETEM
ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM
MOLEKULÁRIS SEJT- ÉS IMMUNBIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA**

DEBRECEN

2012

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	5
1. BEVEZETÉS	7
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	9
2.1. A <i>Staphylococcus</i> genus és a <i>Staphylococcus aureus</i> általános jellemzése	9
2.1.1. Virulencia faktorok	11
2.1.2. Virulencia faktorok és egyéb szekretált fehérjék termelődését szabályozó rendszerek	16
2.2. Sejtfalszerkezet és -szintézis	18
2.3. <i>Staphylococcus aureus</i> sejtfalszintézisére ható antibiotikumok, a sejtfalat hidrolizálni képes enzimek és az ellenük kialakuló rezisztencia	24
2.3.1. Sejtfalszintézist gátló antibiotikumok	24
2.3.2. A sejtfalat hidrolizáló enzimek	32
2.4. A <i>Staphylococcus aureus</i> methicillin rezisztenciája	32
2.4.1. A rezisztencia fő oka: új target szintetizálása	33
2.4.2. Kiegészítő gének a methicillin rezisztenciában	34
2.4.3. A <i>Staphylococcus aureus</i> β -laktamázai	37
2.4.4. A borderline methicillin- vagy oxacillin-rezisztencia	39
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	42
3.1. Vizsgált baktérium törzsek	42
3.1.1. Humán eredetű törzsek	42
3.1.2. Állati eredetű törzsek	44
3.2. Makrodilúciós MIC meghatározás	45
3.3. PBP2a termelés kimutatása	46
3.4. Fágtypizálás	47
3.5. Oxacillináz aktivitás meghatározása biológiai titrálással	48
3.6. Felhasznált antibiotikumok és szubsztrátok	49
3.7. A minták előkészítése	49
3.7.1. A törzsek tenyésztése	49
3.7.2. A membrán izolálása	50
3.7.3. A fermentlé ultraszűrése	51

3.7.4. A minták fehérjetartalmának meghatározása.....	51
3.8 β -laktamázok detektálása egydimenziós (1-D) és kétdimenziós (2-D) SDS-PAGE segítségével és azonosításuk tömegspektrometriával.....	51
3.8.1. 1-D SDS-PAGE és a β -laktamázok detektálása.....	51
3.8.2. Kétdimenziós gél elektroforézis (2-D PAGE)	53
3.8.3. Fehérjék tömegspektrometriás analízise	57
3.9. β -laktamáz aktivitás mérése spektrofotometriásan.....	58
4. EREDMÉNYEK	59
4.1. Az Országos Állategészségügyi Intézet és a Semmelweis Egyetem, Orvosi Mikrobiológiai Intézete által rendelkezésünkre bocsátott törzsek MIC meghatározása	59
4.2. A PBP2a termelés kimutatása	59
4.3. Fágtipizálás.....	61
4.4. Oxacillináz aktivitás kimutatása.....	62
4.5. β -laktamázok molekulatömegének meghatározása SDS-PAGE-val.....	62
4.6. A 10-14 kDa molekulatömegű „ β -laktamáz” azonosítása.....	63
4.6.1. A 10-14 kDa molekulatömegű fehérje azonosítása	63
4.6.2. A lizozim antibiotikum bontó aktivitásának mérése.....	64
4.7. A 30-34 kDa molekulatömegű β -laktamáz azonosítása	65
4.7.1. A VU94 törzs azonosított β -laktamáz aktivitással rendelkező fehérjéi	66
4.7.2. A 822-es törzs azonosított β -laktamáz aktivitással rendelkező fehérjéi	68
4.7.3. Az 14287/1 törzs azonosított β -laktamáz aktivitással rendelkező fehérjéi	70
4.7.4. A 9989 törzs azonosított β -laktamáz aktivitással rendelkező fehérjéi.....	72
4.7.5. A 9800 törzs azonosított β -laktamáz aktivitással rendelkező fehérjéi.....	74
4.7.6. Az a36 törzs azonosított β -laktamáz aktivitással rendelkező fehérjéi	77
4.7.7. Az a53 törzs azonosított β -laktamáz aktivitással rendelkező fehérjéi	79
4.7.8. Az 19599/3A törzs azonosított β -laktamáz aktivitással rendelkező fehérjéi	81
4.7.9. Az 19599/3B törzs azonosított β -laktamáz aktivitással rendelkező fehérjéi	83
4.7.10. A 7789/47 törzs azonosított β -laktamáz aktivitással rendelkező fehérjéi.....	85
4.7.11. A 7789/98 törzs azonosított β -laktamáz aktivitással rendelkező fehérjéi.....	88
5. MEGBESZÉLÉS.....	93
6. ÖSSZEFOGLALÁS / SUMMARY	101
7. IRODALOMJEGYZÉK.....	103

7.1. Hivatkozások	103
7.2. A dolgozat alapjául szolgáló saját közlemények	113
7.3. Egyéb saját közlemények	114
8. TÁRGYSZAVAK	115
9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	116
10. FÜGGELÉK	117

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

2-D SDS-PAGE: két-dimenziós nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid gél elektroforézis
ABC: ATP binding cassette (ATP-kötő kazetta [efflux pumpa család])
ATCC: American Type Culture Collection (Amerikai Törzsek Gyűjteménye)
ATP: adenzin-trifoszfát
Aux: auxiliary (kiegészítő)
BORSA: borderline methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (átmeneti methicillin-rezisztenciájú *S. aureus*)
BSA: bovine serum albumin (szarvasmarha szérum albumin)
C₅₅-P: undekaprenil-foszfát (bactoprenol)
C6: 6-os szénatom
CA-MRSA: community-associated MRSA (közösségekben terjedő MRSA)
CBB: Coomassie Brilliant Blue
CcpA: carbon catabolite protein A (szén katabolit protein A)
CFU: colony forming unit (kolónia képző egység)
CHAPS: 3-[(3-kolamidopropil)dimetilammónio]-1-propánszulfonát
CLSI: Clinical Laboratory and Standards Institute
CNS: coagulase negative staphylococci
Coa: koaguláz
CY: casein – yeast (kazein – élesztő)
ddH₂O: bidesztillált víz (kétszeresen desztillált víz, ultra tiszta víz)
DG-1: desmoglobin-1
DTT: ditiotritol
ETA: exfoliatív toxin A
ETB: exfoliatív toxin B
FAME: fatty acid modifying enzyme (zsírsav módosító enzim)
Fem: factors enhancing methicillin resistance (methicillin-rezisztenciát serkentő faktorok)
GlcNAc: N-acetil-glükózamin
HA-MRSA: hospital-associated MRSA (kórházi MRSA)
HMM PBP: high molecular mass PBP (nagy molekulatömegű PBP)
HPLC: high pressure liquid chromatography (magas nyomású folyadék kromatográfia)
IEF: izoelektromos fókuszálás
Ig: immunglobulin
IL, IL-1: interleukin, interleukin-1
IPG: immobilizált pH gradiens
izo-D-Glu: izo-D-glutaminsav
KNS: koaguláz negatív staphylococcusok
LC-MS/MS: liquid chromatography–tandem mass spectrometer
LMM PBP: low molecular mass PBP (kis molekulatömegű PBP)
LPS: lipopoliszacharid
MALDI-TOF: matrix assisted laser desorption ionization–time of flight
MATE: multidrug and toxic compound extrusion (multidrog és toxikus komponens kilökő [efflux pumpa család])
MFS: major facilitator superfamily (fő facilitátor szuperfamilia [efflux pumpa család])
MH: Mueller-Hinton
MHC: major histocompatibility complex (fő hisztokompatibilitási komplex)
MIC: minimum inhibitory concentration (minimális gátló koncentráció)
MRSA: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (methicillin-rezisztens *S. aureus*)

MSCRAMM: microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules (mikrobiális felszíni komponensek, melyek adhezív mátrix molekulákat ismernek fel)

MSSA: methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* (methicillin-érzékeny *S. aureus*)

MurNAc: N-acetil-muraminsav

MW: molecular weight (molekula tömeg)

NCBI: National Center for Biotechnology Information

NCCLS: National Commmittee for Clinical Laboratory Standards

NCTC: National Collection of Type Cultures

ORF: open reading frame (nyitott olvasási keret)

OXA: oxacillináz

PADAC: Pyridinium-2-Azo-p-Dimethylaniline Chromophore (piridinium-2-azo-p-dimetilanilin kromofór)

PASTA: penicillin-binding protein and serine/threonine kinase associated (penicillin-kötő fehérje és szerin/threonin kináz asszociált)

PBP: penicillin-binding protein (penicillin-kötő fehérje)

pCMB: p-klórmerkuri-benzoát

PCR: polymerase chain reaction (polimeráz láncreakció)

PEP: foszfoenolpiruvát

PFGE: pulsed field gel electrophoresis (pulzáló erőterű gél elektroforézis)

pI: izoelektromos pont

PRP: penicillináz-rezisztens penicillin

PSD: postsource decay (forrás utáni bomlás)

PSM: phenol soluble modulín (fenolban oldódó modulín)

PTS: pirogén, toxikus szuperantigén

RAPD: randomly amplified polymorphic DNA

RFLP: restriction fragment length polymorphisms (restrikciós fragment hossz polimorfizmus)

RND: resistance nodulation division (rezisztencia nodulációs osztódási [efflux pumpa család])

RTD: routine test dilution (rutin tesztelő hígítás)

SCC*mec*: staphylococcal cassette chromosome *mec* (staphylococális kazetta kromoszóma *mec*)

SEIs: staphylococcal enterotoxin-like proteins (staphylococális enterotoxin szerű fehérjék)

SEs: staphylococcal enterotoxins (staphylococális enterotoxinok)

SigB: szigma faktor B

SMR: small multidrug resistance (kis multidrog rezisztencia [efflux pumpa család])

Spa: staphylococális protein A

SSSS: Staphylococcus Scalded Skin Syndrome (staphylococcus forrázott bőr szindróma)

TNF: tumor nekrozis faktor

TSS: toxikus sokk szindróma

TSST: toxikus sokk szindróma toxin

UDP: uridin-difoszfát

UMP: uridin-monofoszfát

VRSA: vancomycin-resistant *S. aureus* (vankomicin-rezisztens *S. aureus*)

Xaa: bármely aminosav

1. BEVEZETÉS

A *Staphylococcus aureus* baktériumot rendkívüli alkalmazkodókészsége, túlélőképessége miatt az angolszász terminológiában sokszor csak „superbug”-ként, „csodabogárként” emlegetik. A fajt az 1880-as években fedezték fel, és rövidesen kiderült, hogy ez az egyik legpotensebb patogén faj, mely kisebb bőrfertőzésektől kezdve egészen a súlyos posztoperatív seb-fertőzésekig a betegségek széles skáláját képes kialakítani. A komolyabb fertőzések (pl. harc-téri sebek elfertőződése) halálozási aránya ebben az időben 80% volt. A penicillin 1940-es bevezetése csak ideiglenesen hozott eredményt a fertőzések kezelésében, és a penicillináz-rezisztens penicillin-származékok (PRP-k) is csak pár évig kelthették a probléma megoldásának illúzióját, hiszen 1942-ben már leírták az első penicillin-rezisztens törzset, 1961-ben pedig megjelentek a methicillin-rezisztens törzsek (MRSA = methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*). Mindkét esetben egy-két év elég volt ahhoz, hogy a baktérium kifejlessze a megfelelő védelmi mechanizmust az antibiotikumok ellen, illetve, hogy a természetes mutánsok, melyek rezisztensek voltak az adott antibiotikumra, elterjedjenek. Napjainkban már nemcsak a kórházakban vannak jelen ezek a nagy rezisztenciájú törzsek (HA-MRSA = hospital-associated MRSA, sőt VRSA = vancomycin-resistant *S. aureus* törzsek), legyengült szervezetekben okozva nozokomiális fertőzéseket, hanem a 90-es évektől egészséges közösségekben is felbukkantak komoly járványokat okozó ún. CA-MRSA (community-associated MRSA) törzsek, melyek a HA-MRSA izolátumoktól függetlenül fejlődtek ki, számos lényeges tulajdonságban eltérnek a kórházi törzsektől, például nem csak legyengült szervezetet támadnak meg. Ma már a CA-MRSA törzsek is jelen vannak számos ország kórházában, tehát a CA és HA elkülönítés is lassan idejétmúlttá válik (Deurenberg & Stobberingh, 2008).

A mindinkább elterjedő rezisztens törzsek ellenére a fertőzések nagy részét még mindig oxacillin érzékeny törzsek okozzák. Ezek nagyon sokszor azok a törzsek, melyek az egyén normál flórájában is megtalálhatók, és a szervezet védelmi vonalának sérülésekor jutnak be a szervezetbe. Hivatalosan a methicillin-érzékeny törzsek közé sorolják a borderline methicillin-rezisztens törzseket is (BORSA = borderline methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*), de főbb jellemzőik alapján közös csoportba sorolhatóak. Ezeknek a törzseknek a methicillin és oxacillin MIC (minimális gátló koncentráció) értékei az érzékeny és a rezisztens törzsek közötti határon vannak, nagy mennyiségű β -laktamáz termelnek, és azonos fágcsoportba tartozó fágokkal tipizálhatóak. 1992-ben egy olasz kutatócsoport (Orietta Massida és munkatársai) klinikai mintákból izolált BORSA törzsek membránfrakciójában

kimutatott egy β -laktamázt, mely csak methicillin-indukció hatására termelődött. Ez az enzim képes volt oxacillin bontására, és 1 kDa-nal kisebb volt a molekulatömege, mint az általánosan elterjedt BlaZ penicillináznak (Massidda, *et al.*, 1992). Ez alapján feltételezték, hogy egy eddig nem ismert oxacillináizról lehet szó, melynek előfordulása valószínűleg szintén a BORSA törzsek közös jellemzője lehet.

Munkám végső célja ennek az oxacillináz / methicillináz enzimnek az azonosítása volt. Ehhez különböző *Staphylococcus aureus* törzseket gyűjtöttünk, és kiválasztottuk közülük a borderline methicillin-rezisztenseket. A törzsek fágtípusba való besorolását is elvégeztük. Megvizsgáltuk, hogy rezisztenciájukat valóban β -laktamázok termelése okozza-e, és megvizsgáltuk a törzsek szekretált és a sejthez kötött β -laktamázait SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel. Az azonosított β -laktamáz aktivitású fehérjéket tömegspektrométerrel azonosítottuk, és megvizsgáltuk, van-e különbség a klinikai izolátumok és a szarvasmarha tőgygyulladásból izolált törzsek β -laktamázai között.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A *Staphylococcus* genus és a *Staphylococcus aureus* általános jellemzése

A *Staphylococcus* genusba tartozó baktériumok emlősöket fertőző fakultatív patogének. Hagyományosan két nagy csoportba soroljuk a törzseket az alapján, hogy vérplazma összecsapódást okoznak-e (koaguláz reakció). Koaguláz pozitív staphylococcus a *S. aureus*. A koaguláz negatív staphylococcusok (KNS vagy CNS = coagulase negative staphylococci) közé több mint 30 faj tartozik. Ezek a fajok többnyire a bőr kommenzalistái, néhány faj okozhat fertőzéseket. A *S. aureus* okozta fertőzések leggyakrabban gennyesedéssel járó elváltozások a bőrön, ritkábban mélyebb folyamatok, tályogok, és generalizált kórképek, septikaemiák is megjelenhetnek, melyek rendszerint valamely felszíni folyamatból indulnak ki. Nem ritka a tracheobronchitis, bronchopneumonia és endocarditis sem, s az osteomyelitis-es esetek 90%-át is ez a faj okozza. A *S. aureus* az immunológiailag nem legyengült szervezetre is patogén, ha a passzív behatolás feltételei biztosítottak bőr és nyálkahártya sérülések jelenléte esetén.

A virulencia a fertőzés során termelt számos faktor kombinált hatásának eredménye. A *S. aureus* törzsek extracelluláris fehérjéket és poliszacharidokat termelnek, melyek antitestekkel közömbösíthetőek, de vakcinák nem állnak rendelkezésre. Tályogok, kelések, sebfertőzések kezelésénél gyakran antibiotikus kezelésre és sebészeti dréncső alkalmazására is szükség lehet. Staphylococcus fertőzés gyakran lép fel beültetett orvosi eszközök miatt, az ilyen fertőzések antibiotikummal nagyon nehezen kezelhetők, és általában az eszközt is el kell távolítani. Néhány törzs, melyek kórházi betegeket fertőznek, rezisztens lehet a legtöbb antibiotikumra, ilyenkor vancomycin kezelést alkalmaznak, de már erre az antibiotikumra is írtak le megnövekedett rezisztenciájú törzseket (Courvalin, 2006, de Lencastre, *et al.*, 2007, Perichon & Courvalin, 2009).

DNS-rRNS hibridizáció és a 16S rRNS gén szekvencia analízise alapján a staphylococcusok genus szintjén összetartozó csoportot alkotnak, mely csoport a *Bacillus-Lactobacillus-Streptococcus* klaszteren belül helyezkedik el. Ezt a klasztert olyan Gram-pozitív baktériumok alkotják, melyek DNS-e alacsony G + C tartalmú (*Firmicutes* phylum).

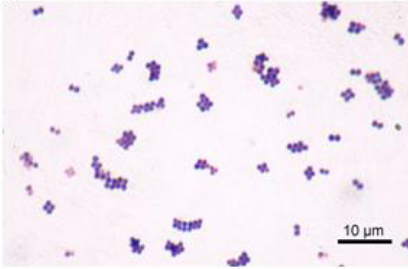
Taxonómiaiailag a *Staphylococcus* genus a *Staphylococcaceae* családba tartozik, mely még öt, kevésbé ismert genust tartalmaz, ezek: *Gemella*, *Macrococcus*, *Salinicoccus*, *Jeotgalicoccus* és *Nosocomiicoccus*. (Euzéby, J. P.. "[List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature](http://www.bacterio.cict.fr)". <http://www.bacterio.cict.fr>). A legjobban ismert legközelebbi filogenetikai

rokonai a *Bacillaceae* családba tartozó *Bacillus* genus tagjai. A *Listeriaceae* család szintén közeli rokon filogenetikailag.

Legalább 30 staphylococcus fajt különítettek el biokémiai analízissel és főként DNS-DNS hibridizációval. 16 ezek közül emberi kommenzalista, pl: *S. aureus* (orrüregben, bőrön, szájban, emlőmirigyekben, a nemi és húgyutakban, belekben, felső légutakban is megtalálható flóraalkotóként, legjelentősebb patogén), *S. epidermidis* (orrüregben, bőrön található, sok törzs a normál flórában védő szerepű, csak kórházi kezelésekkkel összefüggésben okoz fertőzést, leggyakrabban ez okozza a katéterekkel és beültetett eszközökkel összefüggő fertőzéseket), *S. saprophyticus* (alkalmanként bőrön lelhető fel, gyakran okoz húgyúti fertőzéseket), *S. haemolyticus*, *S. simulans*, *S. cohnii*, *S. warneri*, *S. hominis*, *S. capitis*, *S. intermedius*, *S. schleiferi* és a *S. lugdunensis*: ezek a fajok mind okai lehetnek emberi fertőzéseknek, bár csak nagyon ritkán, kivéve a nem túl régen felfedezett *S. lugdunensis*-t, melynek az azonosítása meglehetősen nehézkes, de endocarditis-es esetekben és más fertőzések esetén is írták már le (Liu, *et al.*, 2010)

A staphylococcusok Gram-pozitív coccusok, átmérőjük kb. 0,5 – 1 μ m. Jellemző a pigment termelése, a *S. aureus* sárga (különböző intenzitással) a *S. epidermidis* és *S. saprophyticus* fehér pigmentet termel. A sejtek klaszterekben, párokban és néha rövid láncokban nőnek. Klaszterek azért képződhetnek, mert a staphylococcusok három, egymásra merőleges sík mentén osztódnak, és az utódsejtek egymáshoz kapcsolódva maradnak. Az alakzatok segítségével a micrococcusok és a staphylococcusok elkülöníthetők a streptococcusoktól, melyek többnyire láncokban nőnek. Ez csak folyékony tenyészetekben igaz, mert szilárd táptalajon a streptococcusok csomókként jelennek meg. Még jobb elkülönítést tesz lehetővé a kataláz teszt (3% hidrogén-peroxiddal), mivel a streptococcusok kataláz negatívak, a staphylococcusok pedig kataláz pozitívak.

A *S. aureus* fakultatív anaerob, fermentáció során jobbra tejsavat képez, képes mannitot fermentálni (ellentétben a *S. epidermidis*-szel), ezért nem szintenyészetből történő izoláláskor először mannit-só agaron tenyésztik, ami 7,5% NaCl-t tartalmaz, ugyanis a staphylococcusok sótűrőek (akár 15% NaCl-ot is elviselnek). A törzseket főleg véres agaron, triptikus szója agaron vagy HI (heart infusion) agaron szokás tenyésztetni (1. ábra). Aerob tenyésztéskor tiamint és nikotinsavat, anaerob tenyésztéskor még uracilt is igényel. Ellenállóbbak, mint a többi spóra nélküli baktérium. A sejtek gennyben, beszáradt váladékban heteken át életképesek maradnak. A fertőtlenítőszeresek közül a jód- és klórtartalmú szerek, valamint a 2%-os fenol gyorsan előlik, míg az etilalkohol és aceton nem pusztítja el. Mivel nem képeznek spórákat, ezért nedves és száraz hővel is könnyen elölhetnek.

A**B**

1. ábra: A *Staphylococcus aureus* morfológiája. A képen *Staphylococcus aureus* kolóniák láthatók véres agaron (A), illetve Gram-festéssel megfestett sejtek fénymikroszkóppal (B). Jól láthatók a β -hemolízis (a vörös vértetek szétesnek a baktérium által termelt toxin miatt) okozta feltisztulások a telepek körül. Gram-pozitív baktériumként sejtfa megköti a kristályibolya festéket a Gram-festés során, a sejtek ibolyaszínűek. Megfigyelehetők a sejtek által kialakított fajra jellemző szőlőfürtszerű klaszterek. A kép forrása: Wikipedia.

A faj azonosítását a Gram-festés, kataláz és koaguláz teszt mellett a termelt hőstabil DNáz kimutatásával, valamint a protein A-hoz kötődő IgG vagy az endokoagulázhoz (clumping factor-hoz) kapcsolódó fibrinogén latex agglutinációval kivitelezhetjük.

A különböző törzsek azonosítására (epidemiológiai információk nyerésére) különböző módszerek használhatók. A leghagyományosabb a fág-tipizálás, de az izolátumok akár ötöde nem tipizálható egy fággal sem. A plazmid analízis szintén hagy kívánnivalókat maga után, tekintettel arra, hogy a sejtek könnyen vehetnek fel, vagy éppen veszíthetnek el plazmidokat. RFLP (restriction fragment length polymorphisms = restrikciós fragment hossz polimorfizmus), ribotipizálás vagy más gének kimutatása nem igazán vált be az MRSA törzsek elkülönítésénél, és más esetekben is nagyon sok múlik a használt restrikciós enzimeken és a használt próbákon. A leggyakrabban használt technika a PFGE (pulsed field gel electrophoresis = pulzáló erőterű gélelektroforézis) (Foster, 1996), de a random primer PCR technika (RAPD = randomly amplified polymorphic DNA) is használható epidemiológiai vizsgálatokra (Kurlenda, *et al.*, 2007, Nikbakht, *et al.*, 2008), sőt, microarray technika alkalmazására is adott a lehetőség (Otsuka, *et al.*, 2008).

2.1.1. Virulencia faktorok

A *S. aureus* számos sejt felszíni és extracelluláris fehérjét termel, sok közülük potenciális virulencia faktor. A baktérium okozta betegségek közül sok nem vezethető vissza egy konkrét virulencia faktor hatására, ezért is bonyolult meghatározni az egyes faktorok pontos hatását, és ezért tűnhetnek ellentmondásosnak az állatmodell segítségével nyert adatok. Azért felfe-

dezhető korreláció egyes betegségek és bizonyos virulencia faktorok expresszálása között. Néhány toxint tisztított formában bejuttatva állatokba reprodukálhatóak emberi betegségek tünetei (Götz, 2004, Schlievert, *et al.*, 2010).

Megkülönböztetünk sejtfelszíni és szekretált virulencia faktorokat. A sejtfelszíni virulencia faktorok főként a sejtek adhézióját, invázióját szolgálják, így az exponenciális fázis során szintetizálódnak, míg a szekretált virulencia faktorok a poszt-exponenciális - stacioner szakaszban termelődnek, és így a sejtek túlélését segítik (Plata, *et al.*, 2009).

2.1.1.1. Sejtfelszíni komponensek, kapcsolódást szolgáló virulencia faktorok

MSCRAMM-ok (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules):

A *S. aureus* sejtek olyan felszíni fehérjéket expresszálnak, melyek segítik kapcsolódásukat például az extracelluláris mátrixban fellelhető lamininhoz vagy fibronectinhez. Ez utóbbi fehérje epitheliális vagy endotheliális felszíneken vagy véralvadék részeként is megtalálható. A legtöbb törzs rendelkezik fibrinogén/ fibrin-kötő fehérjével (clumping factor, *clfA*), ez lehetővé teszi a véralvadékhoz vagy a sérült szövethez való kötődést. Ezt a fehérjét kötött koaguláznak vagy endokoaguláznak is nevezik, mert tárgylemez koaguláz próbában a baktériumok összecsapódását okozza, mivel megköti a vérplazmában lévő fibrinogént és azt fibrinné alakítja. Ugyanakkor antigenitása és hatásmechanizmusa is eltér a szabad koagulázétól.

A legtöbb *S. aureus* törzs termel más fibronectin- és fibrinogén-kötő fehérjét, fehérjéket is.

A kollagénhez való kapcsolódást elősegítő receptor az osteomyelitist és szeptikus arthritist okozó törzsekre jellemző. A kollagénnel való kapcsolat szintén fontos lehet a sérült szövethez való kapcsolódásnál, mikor a mélyebb szövetrétegek felszínre kerülnek (Cunningham, *et al.*, 1996).

2.1.1.2. Immunrendszerrel interferáló faktorok

A megfertőzött szervezet védekező mechanizmusainak elkerülésében szerepet játszó faktorok a kapszula poliszacharidok, a protein A (a MSCRAMM-k közé tartozik), a leukocidinek, valamint a *S. aureus* pigmentje, a staphyloxantin.

A poliszacharid tok vagy nyák *in vivo* gyakori (*in vitro* idővel elveszti). A legtöbb klinikai izolátum *S. aureus* felszíni poliszacharidja vagy az 5-ös vagy 8-as szerotípusba tartozik. Mikrokapszulának nevezzük, mert fénymikroszkópban nem, csak elektromikroszkópban, antitesttel való jelölést követően látható. A kapszula szerepe nem teljesen tisztázott, mert igaz,

hogy gátolja az opszonizációt és a fagocitózist, és véd a komplement-mediált lízissel szemben, de a fagocitózist csak komplement hiányában gátolja, és még a szívbillentyűk kolonizációját is meggátolja endocarditis modellben, valószínűleg az adhezinek elfedése miatt.

A protein A 90%-a a sejtfalban, 10%-a pedig extracellulárisan található, kizárólag a *S. aureus* faj esetében. Az IgG1, IgG2, IgG4 molekulák Fc régiójához kötődik, így meggátolja az opszonizációt, a fagocitózist és antikomplementer hatású. A protein A nem-specifikus ellenanyag-kötő képességét számos szerológiai reakcióban (immunprecipitáció) hasznosítjuk (ellenanyag-tisztításra is használjuk). 95%-ban együtt termelődik a koagulázzal.

A leukocidinek specifikusan a polimorfonukleáris leukocitákra hatnak.

A *S. aureus* pigmentjét staphyloxantinnak nevezzük, rezisztenciát biztosít a reaktív oxigénradikálok ellen, és védelmet nyújt a megfertőzött szervezet neutrofil-alapú védekezése ellen (Liu, *et al.*, 2008).

2.1.1.3. Toxinok

Valószínűleg a toxinok felelősek a fertőzés során fellépő tünetek nagy részéért.

Membránt károsító citolítikus toxinok:

α -toxin (*hla*):

Ez a leghatékonyabb membrán-károsító *S. aureus* toxin. Monomerként szekretálódik, hozzákötődik az érzékeny sejtek (vörösvértestek, leukocyták, májsejtek, monocyták, thrombocyták, fibroblastok és simaizomsejtek) membránjához, és az alegységek hexamer gyűrűt alkotva pórust formálnak, amelyen át a sejt tartalma szivárogni kezd, a sejtek membránjának ion-permeabilitása megnövekszik, a sejtek koloidozmotikus lízise jön létre.

Az ion-permeabilitás növekedését az okozza, hogy az érzékeny sejtek rendelkeznek α -toxin receptorral, ami alacsony toxin koncentrációnál lehetővé teszi a toxin kötődését, kis pórusok keletkeznek, amelyen egyértékű kationok juthatnak át. Magasabb koncentráció esetén a toxin a membrán lipidekkel reagál nem-specifikusan, nagyobb pórusok keletkeznek, és kétértékű kationokat, kis molekulákat veszít a sejt.

Emberben főként a vérlemezkék és a monocyták érzékenyek az α -toxinra. Nagy affinitású helyekkel rendelkeznek, melyek lehetővé teszik a toxin kötődését fiziológiásan jelentős koncentrációban. Másodlagos reakciók során eikozanoidok és cytokinek szabadulnak fel, melyek serkentik a gyulladásos mediátorok termelését. Ez vezet például a szepszis sokk tüneteinek kialakulásához.

β -toxin (szfingomielináz C, *hly*):

Szfingomielináz, ami az ebben a lipidben gazdag membránokat károsítja. A szfingomielint víz jelenlétében N-acil-szfingozinra (ceramid) és foszforil-kolinra bontja. A legtöbb humán izolátum nem termel β -toxint, mert egy bakteriofág beékelődött a génbe (negatív génkonverzió). Sok fág, mely inaktiválja a β -toxin gént, enterotoxin és staphylokinázt gént hordoz. Ezzel szemben a szarvasmarha tőgygyulladást okozó törzsek többsége termel β -toxint, tehát valószínűleg ez a toxin szükséges a tőgygyulladás kialakulásakor (Aarestrup, *et al.*, 1999).

δ -toxin (PSM γ , *hld*):

A δ -toxin egy nagyon kicsiny peptid, melyet a törzsek többsége termel. *S. epidermidis* és *S. lugdunensis* törzsek is termelik. A PSM (phenol soluble modulín) család tagja, detergens hatású toxin, széles spektrumú citolitikus hatással rendelkezik.

γ -toxin (*hlg*) és Panton Valentine leukocidin (*lukF-PV*, *lukS-PV*):

Ezek kétkomponensű fehérjetoxinok, melyek az érzékeny sejtek membránját károsítják. A fehérjék külön expresszálódnak és a membránban formálnak multimereket. A γ -toxin lókusztól 3 fehérje íródik át: a B és C komponensek leukotoxint alkotnak, hemolitikus aktivitásuk alacsony, az A és B komponens hemolitikus és csak gyengén leukotoxikus.

A klasszikus Panton Valentine (PV) leukocidin erős leukotoxin, de nem hemolitikus. A toxint expresszáló izolátumok nagy része súlyos dermonekrotikus léziókat okoz, vagyis ez a toxin fontos a nekrotizáló bőrfertőzések kialakításában. Azt feltételezik, hogy a tüdő fertőzéseiben is fontos szereppel bír, de ezzel ellentétes eredményre vezető kutatások is szép számmal fellelhetők (Schlievert, *et al.*, 2010). Az 1990-es években az USA-ban felbukkant bőrkontaktussal terjedő CA-MRSA törzsek is termelik ezt a toxint, valamint a CA-MSSA (community-associated methicillin-sensitive *S. aureus*) törzsek (Schlievert, *et al.*, 2010). Profágon kódolt, leuko- és neurotoxikus, a makrofágokat, myeloid leukocytákat és a PMN-sejteket károsítja, citolitikus hatásának alapja a heteroheptamerként való pórusképzés. A toxin gyulladási mediátorokat szabadít fel neutrofil granulocytákból, degranulációhoz vezetve. Ez okozhatja a dermonekrotizáló fertőzések szövettani képét (értágulat, infiltráció és centrális nekrosis).

Pirogén, toxikus szuperantigének (PTS): enterotoxinok és toxikus sokk szindróma toxin:

A *S. aureus* három különböző típusú, szuperantigénként viselkedő toxint képes termelni: A, B, Cn, D, E, I szerotípusba tartozó enterotoxinokat (staphylococcal enterotoxins, SEs), az enterotoxinokhoz hasonlító fehérjéket (staphylococcal enterotoxin-like proteins, SELs), melyek G, H, és J-től U-ig szerotípusba tartozhatnak és toxikus sokk szindróma toxint (TSST-1). A szuperantigének hatására akár minden ötödik T-sejt aktiválódhat, míg más antigének hatására csak minden tízezredik stimulálódna az antigén prezentálás során. A szuperantigének

közvetlenül az antigénprezentáló sejtek MHC II molekulájának szokásos antigén-kötő baráz-dáján kívül kapcsolódnak. Ez a komplex a T-sejt receptoroknak csak a V β elemét ismeri fel, ezért az összes, megfelelő V β elemmel rendelkező T-sejt stimulálódik, míg más antigének esetében a kötődéshez normálisan szükség van antigén specifitásra is (Schlievert, *et al.*, 2010).

Az enterotoxinok hőstabilak, pepszinre mérsékelten érzékenyek, gyomor és belek falában levő receptorokhoz kötődnek. Hatásukra csökken a belekben a víz felszívódása, míg a béllu-men felé irányuló iontranszport fokozódik, fokozódik a belek perisztaltikus mozgása is, va-gyis hasmenést okoznak és hányást (központi idegrendszeri hatás), ezek felelősek a staphylococcus okozta ételmérgezésekért. A vérkeringésbe kerülve toxikus sokk szindrómát okoznak (TSS), a B és C típusú enterotoxinok felelősek a nem menstruációs TSS feléért. Lymphocyta proliferációt váltanak ki, IL-2 (interleukin-2), TNF- β (tumor nekrosis faktor- β), IF- γ (interferon- γ) szabadul fel a CD4⁺ T-sejtekből és IL-1 β (interleukin-1 β) valamint TNF- α (tumor nekrosis faktor- α) a makrofágokból.

A TSST-1 nem sok rokonságot mutat az enterotoxinokkal, hánytató hatása sincs. A TSS-ek 75%-áért felelős, beleértve az összes menstruációs esetet. TSS léphet fel bármely staphylococcus fertőzés következményeként, ha enterotoxin vagy TSST-1 kerül a vérkerin-gésbe, és a szervezet nem rendelkezik megfelelő semlegesítő antitestekkel. A tamponhaszná-lat következtében fellépő TSS nem is igazi fertőzés, mert a *S. aureus* a tamponon nő, és csak a toxin szívódik fel. Citokinek szabadulnak fel nagy mennyiségben, ez okozza a TSS tüneteit. A toxin érzékenyíti a szervezetet az LPS hatásával szemben és károsítja az endothel sejteket.

Epidermolitikus (exfoliatív) toxin (*eta*, *etb*):

Ez a toxin az oka a forrázott bőr szindrómának újszülöttekben (SSSS = Staphylococcus Scalded Skin Syndrome), mely nagy kiterjedésű hólyagzással és a felhám elvesztésével jár. A toxinnak két, antigénikusan elkülönülő változata van, ETA és ETB. Mindkét toxin szekvenci-ája hasonlít a *S. aureus* szerin proteázáéhoz, és a három legfontosabb aminosav az aktív cent-rumban konzervált. Az ET-knek azonban nem proteolitikus, hanem észteráz aktivitásuk van. A bőr stratum granulosum rétegében lévő intercelluláris hidakat (desmosomákat) hasítják, targetjük a desmoglobin-1 (DG-1) (Kobayashi & Deleo, 2009).

2.1.1.4. Más extracelluláris fehérjék

Koaguláz (coagulase, coa):

A prothrombinhoz kapcsolódik, így kialakítva a staphylothrombint, melyben aktiválódik a thrombin proteáz aktivitása, ami a fibrinogént fibrinné alakítja. Az extracelluláris koaguláz fibrinogénhez is kapcsolódhat, helyi vérrögök kialakításával a baktérium védekezhet a szervezet védelme ellen. A koaguláz kis része erősen kötődik a bakteriális felszínhez, ekkor a prothrombinnal reagál.

Staphylokináz:

Sok törzs termel egy staphylokináz nevű plasminogén aktivátort. A gén lizogén bakteriofágokban található. A staphylokináz komplexet képez a plazminogénnel, és aktiválódik a plazmin-szerű proteolitikus aktivitás, ami fibrin rögök feloldásához vezet. Nem virulencia faktor, bár a lokalizált fibrinolízisnek lehet szerepe a baktérium terjedésében.

Extracelluláris enzimek:

A *S. aureus* proteázokat, lipázt (*geh*), hialuronidázt (*hysA*), foszfatázt, fibrinolysint, nukleázokat (DNázt, RNázt) és zsírsav módosító enzimet (fatty acid modifying enzyme = FAME) termel. Ezek valószínűleg a baktérium tápanyagellátását biztosítják, de szerepük van a virulenciában is. A lipázok lipolitikus enzimek, lehetővé teszik a zsírszövetben történő szaporodást és terjedést. A hialuronidáz a sejtek közötti hialuronsav bontásával a szövetek közötti terjedést teszi lehetővé. A foszfatáz termelődése a patogenitás megbízható jele, foszfátvegyületek bontását végzi. A fibrinolizin a fibrin gátat oldja, elősegíti az inváziót. A DNáznak is lehet szerepe a baktérium inváziójában, mert az immunválasz során sejtek pusztulnak el, és tályog képződik. Az elpusztult sejtekből kiszabaduló DNS viszkozitása magas, ami lassítja a baktérium mozgását. A DNáz csökkenti a viszkozitást, lehetővé téve a gyorsabb terjedést. A FAME fontos lehet a tályogok kialakulása során, mivel módosítani képes az antibakteriális lipideket és meghosszabbítja a baktérium életidejét.

2.1.2. Virulencia faktorok és egyéb szekretált fehérjék termelődését szabályozó rendszerek

Nagyon sok virulencia faktor és szekretált fehérje termelődése kétkomponensű regulátor rendszereken keresztül szabályozódik. Ezek a rendszerek jellemzően egy szenzorból állnak, melynek citoplazmatikus doménje hisztidin kináz aktivitással rendelkezik, és egy válasz regulátorból, mely speciális DNS szekvenciákhoz képes kötődni, és effektorokat kódoló géneket

aktivál. A szenzort aktiváló szignálok különbözőek lehetnek, például autoindukáló peptid koncentrációja (Agr rendszer), baktérium denzitás, pH, CO₂ koncentráció. A szignál érheti közvetlenül vagy egy receptor közvetítésével a szenzort. A szenzor ilyenkor autofoszforylálódik egy hisztidinen, ez a foszforscsoport kerül át a regulátor egy aszpartátjára. Ilyen kétkomponensű regulátor rendszerek a 1. táblázatban jellemzett *agr*, *sae*, *ssrAB*, *arlSR*, *lytRS* lókuszok (Bronner, *et al.*, 2004).

1. Táblázat: Virulencia faktorok kifejeződését szabályozó rendszerek a *Staphylococcus aureus*-ban: kétkomponensű regulátor rendszerek.

Szabályozórendszer	Szenzor / Regulátor	Fázis	Aktivál	Gátol	Megjegyzés
Agr (accessory gene regulator)	AgrC / AgrA, sejtdenzitás-függő módon aktiválódik (az agrD-ről termelődő AIP = autoindukációs peptid koncentrációjától függő módon)	posztexponenciális	exoproteineket pl.: α-toxin, β-toxin, TSST-1, leukotoxinok, <i>lrgA</i> , <i>lrgB</i> (kb. 104 gént)	sejtfal asszociált fehérjéket pl.: protein A, koaguláz, fibronectin-kötő fehérje (kb. 34 gént)	1, az effektor az RNSIII 2, agr I, II, III, IV csoportok vannak, az egyes AIP-ok gáto- lják más Agr csoportok szignalizációját, és más-más toxinok termelését szabályozák 3, az <i>agr</i> lókusz mutációja csökkenti a penicillin-indukálta lizist, de növeli a penicillin baktericid hatását
<i>sae</i> (<i>S. aureus</i> exoprotein expression)	SaeS / SaeR		α-toxint, β-toxint, koagulázt		
SrrAB (staphylococcal respiratory response) = SrrSR	SsrB (SrrH) / SsrA (SrrS)	anaerob körülmények között	fermentatív növekedéshez szükséges fehérjéket (pl.: alkohol-dehidrogenáz, L-laktát dehidrogenáz)	oxigén igényes expressziójú virulencia faktorokat (α-toxin, TSST-1)	anaerob körülmények között overexpresszálódik, toxintermelést részben az RNSIII transzkripciójának repressziójával, részben az RNSIII-től független útvonalon gátolja
arlSR (autolysis-related locus)	ArlS / ArlR	exponenciális, posztexponenciális	<i>sarA</i> lókuszt	<i>agr</i> lókuszt, α-toxint, β-toxint, lipázt, szerin proteázt, koagulázt protein A-t	az <i>arlR</i> megszakítása a peptidoglikán-hidroláz aktivitás növekedéséhez és autolízishez vezet
LytRS (lytic)	LytS / LytR		<i>lrgA</i> , <i>lrgB</i> géneket (a gének termékei gáto- lják a murein-hidrolázok extracelluláris aktivitását)		A LytS transzporter is, után- sokban nő az autolízis és mó- dosul a murein-hidroláz aktivi- tás szintje

A regulátor rendszerek másik nagy csoportját a *sarA* és homológjai képezik (2. táblázat). Ezek nem kétkomponensű rendszerek, de kölcsönhatnak főként az Agr rendszerrel, és a rendszerek működésének eredője határozza meg, hogy mely fehérjék fejeződjenek ki (Bronner, *et al.*, 2004). Például a *hla* átíródását a növekedés kezdetén a Rot, SarT és SarS gátolja, de az

exponenciális, posztexponenciális fázisra megemelkedik az RNS III koncentrációja a SarA és SarU működésének következtében, és gátolni fogja az α -toxin termelődését gátló molekulákat. Ebben a szakaszban a *sae* is serkenti a *hla* expressziót. Ezzel szemben a protein A termelődését az exponenciális fázis kezdetén serkenti a Rot a SarS aktivációja miatt. Ahogy az exponenciális fázisban megemelkedik az RNS III szintje, úgy aktiválódik a SarA, a két molekula gátolja a SarS-t és így a *spa* átíródását (Bronner, *et al.*, 2004).

2. Táblázat: Virulencia faktorok kifejeződését szabályozó rendszerek a *Staphylococcus aureus*ban: SarA és SarA homológok.

Szabályozórendszer	Aktivátor / Gátló	Fázis	Aktivál	Gátol	Megjegyzés
sarA (staphylococcal accessory regulator)	SarA aktiválja a saját expresszióját, SarR gátolja	P1, P2 promóterről exponenciálisig; P3 promóterről később exponenciális, stacioner és stressz alatt posztexponenciális	<i>agr</i> lókuszt, α -toxint, δ -hemolysint, γ -hemolysint közvetlenül is, fibronektin-kötő fehérjét	protein A, kollagén adhezin	SarA mutációja megnövekedett penicillin-indukálta lizist és baktericid hatást okoz
SarA homológ SarR				<i>sarA</i>	
SarA homológ SarS (SarH1)	<i>sarA</i> és <i>agr</i> gátolják		δ -hemolysint, protein A-t, <i>ssp-t</i>	α -toxint	
SarA homológ SarT	<i>sarA</i> és <i>agr</i> gátolják			α -toxint, <i>agr</i> lókuszt (RNS III)	A SarA a <i>sarT</i> gátlásával is aktiválja a <i>hla-t</i>
SarA homológ SarU	<i>sarT</i> , RNSIII gátolja		RNSII, RNSIII, <i>agr</i> target gének	sejtfal-asszociált fehérjék (pl. koaguláz)	
SarA homológ Rot (repressor of toxin)	RNSIII posztexponenciális fázis során poszttranszkripcionálisan gátolhatja	exponenciális	sejtfal asszociált fehérjéket	exoproteineket	<i>agr</i> -rel ellentétes hatás

2.2. Sejtfalszerkezet és -szintézis

A baktériumok sejtfala nélkülözhetetlen és specifikus sejttalkotó, mely kívülről veszi körül a sejtet, biztosítva a sejt integritását ellenállva a belső nyomásnak, fenntartva a sejt alakját és vázat szolgáltatva számos hozzákapcsolódó molekulának, mint a fehérjék és teikolsavak. A Gram-pozitív baktériumok sejtfala meglehetősen porózus, mintegy 10 kDa molekulatömegig képes az anyagokat szabadon átengedni. Külső membrán nincs, legfeljebb tokot képesek kiválasztani. A sejtfalalkotók fertőzéskor citokin termelést (IL-1 és TNF- α) indukálnak, gátolják a fagocitózist és a kemotaxist.

A staphylococcusok sejtfalának alapszerkezetét peptidoglikán láncok alkotják, amelyek β -1 \rightarrow 4 glikozidos kötéssel egymáshoz kapcsolódó alternáló N-acetil-glükózaminból (GlcNAc)

és N-acetil-muraminsavból (MurNAc) állnak. Hasonlóan a többi Gram-pozitív baktériumhoz a sejt falban akár 40 peptidoglikán (murein) réteg is jelen lehet, a sejt fal 40-60%-át ez teszi ki. Az *S. aureus*-ban a glikánláncok rövidek, átlagosan 18 diszacharid egységből állnak, a legtöbb lánc mindössze 3-10 diszacharid egységből áll, a 26 diszacharid egységnél hosszabb láncok aránya mindössze 10-15% (Vollmer, *et al.*, 2008). A redukáló végeken mind MurNAc, mind GlcNAc előfordulhat, vagyis a glikánláncot hasíthatja N-acetil-glükózaminidáz (Boneca, *et al.*, 2000). A láncokon belül a MurNAc D-laktoil csoportjához kötött tetrapeptidek között kialakuló kapcsolat révén jön létre a háromdimenziós térhálós rendszer. Jellemzője a bonyolult transzpeptidáció (a tetrapeptideket 5 glicin molekula kapcsolja össze), mely a sejt falat fizikokémiai és biológiai szempontból is rendkívül ellenállóvá teszi. A tetrapeptidek eredetileg pentapeptidként (a staphylococcusok esetében ez L-alanin – D-glutaminsav – L-lizin – D-alanin – D-alanin) kapcsolódnak egy-egy MurNAc-hoz, a terminális D-alanin a keresztkötések kialakulásakor hasad le. A pentaglicin híd a D-alanin karboxilcsoportja és a szomszédos tetrapeptid L-lizinjének ϵ -amino csoportja között alakul ki. Az D-glutaminsav α -karboxil-csoportja gyakran amidált (tehát a pentapeptid második aminosava D-izoglutamin), ami elősegíti a keresztkötések kialakulását (Berger-Bächi & Tschierske, 1998). A peptidek kb. 90%-a vesz részt keresztkötésben (Berger-Bächi & Tschierske, 1998). Mivel a keresztkötések sűrűsége határozza meg a sejt fal erősségét, ez különösen a Gram-pozitívoknál mint a staphylococcusok nagyon fontos a magas belső ozmotikus nyomás miatt, ami elérheti akár a 25 atmoszférát is.

A sejt fal másik jellemző eleme a teikolsav (vagy másként a teichoinsav), élettani szerepe a baktérium növekedésében és osztódásában, valamint az ionegyensúly fenntartásában van. A MurNAc C6-hoz kapcsolódhat (ide egyébként acetil csoport is kötődhet), és össztömege a sejt fal tömegének akár 20-50%-át is kiteheti. A murein töltött aminosavjai és a teikolsavak foszfátjai miatt a sejt fal jobbra kirekeszti a hidrofób molekulákat, a sejtet mondhatni egy hidrofíli réteg veszi körül.

A teikolsav faj-specifikus, gerincét glicerol-foszfát (glicerolteikolsav, *S. epidermidis*) vagy ribitol-foszfát (ribitolteikolsav, *S. aureus*) polimer alkotja, amelyhez különböző cukrok, aminosavak kapcsolódnak. A teikolsav molekulák, melyek a baktériumok egyik fontos felszíni antigénjét jelentik és a sejt adhéziójában fontosak (kötődnek a fibronectinhez), kovalens kötést hoznak létre a MurNAc-komponensekkel (Xia, *et al.*, 2010). Bakteriofág receptoraként is működnek. A Gram-pozitív sejt falhoz még szénhidrátok és fehérjék kapcsolódhatnak, ezeknek kolonizációs szerepük van, és lehetővé teszik a baktériumok szerológiai osztályozását (Giesbrecht, *et al.*, 1998). Bizonyos teikolsavak a citoplazma membránba merülő lipid kom-

ponenst is tartalmaznak (lipoteikolsav), ezeknek feltehetően a membránnak a sejtfalhoz való horgonyzásában van szerepük. *S. aureus*-ban a teikolsavakhoz D-alanin észterek és N-acetil-glükózamin kapcsolódhat. A D-alanin észterek pozitív töltést hordoznak, így módosítják a felszíni töltést, meghatározzák a sejt pozitív töltésű molekulákat kötő kapacitását és modulálják az autolitikus aktivitást.

A sejtfal szintézise a citoplazmában indul az UDP-N-acetil-muraminsav-pentapeptid létrejöttével. Először UDP-GlcNAc jön létre fruktóz-6-foszfátból, az UDP-MurNAc az UDP-GlcNAc-ból alakul tovább UDP-N-acetil-glükózamin-enolpiruvil transzferáz(ok) közreműködésével (MurA és MurZ, előbbi a fő enzim, de ellentétben a MurZ-vel, nem indukálódik a termelése sejtfalszintézist gátló antibiotikumok jelenlétében) (Blake, *et al.*, 2009), és az UDP-MurNAc-hoz kapcsolódik a pentapeptid rész. Ennek a szintézisét Mur ligázok végzik ATP felhasználásával. A MurC ligáz kapcsolja az első aminosavat (L-Ala) az UDP-MurNAc-hoz. A második aminosav kapcsolásáért (D-Glu vagy izo-D-Glu) a MurD, a harmadik aminosavéért (L-Lys) a MurE ligáz felelős. A két terminális D-Ala dimerként kapcsolódik a peptidlánchoz. A D-Ala-D-Ala dimer szintézisét a Ddl enzim, a beépítését a MurF ligáz végzi (Barreteau, *et al.*, 2008). Az így létrejött komplex egy carrier-lipidhez (undekaprenil-foszfát – C₅₅-P vagy bactoprenol) kapcsolódik UMP lehasadásával és így szállítódik át a membránon. A folyamatot az MraY transzferáz (transzlokáz I) katalizálja, undekaprenil-pirofoszforil-MurNAc-pentapepidet (lipid I) létrehozva. Ehhez kapcsolja a MurG transzferáz (transzlokáz II) az N-acetil-glükózamint UDP felszabadulása mellett, létrehozva az undekaprenil-pirofoszforil-MurNAc-(pentapepid)-GlcNAc-ot, vagyis a lipid II molekulát (Bouhss, *et al.*, 2008). Gram-pozitívoknál a keresztkötő interpeptid híd a lipid II-höz kapcsolódik, és a D-izoglutamin is ekkor alakul ki. A pentaglicin interpeptid hidat Fem transzferázok szintetizálják, melyek nemriboszómális peptidkötés-kialakító enzimek. A glicineket aminoacil-tRNS-szintetázok kapcsolják tRNS-ekhez, így válnak a Fem transzferázok szubsztrátjává. A FemX (vagy más néven FmhB) végzi az első glicin kapcsolását, a következő kettőjét a FemA, az utolsó kettőjét pedig a FemB (Bouhss, *et al.*, 2008). Az FemX eszenciális enzim, mert a D,D-transzpeptidáz nem tudja keresztkötni közvetlenül a pentapeptideket. A *femA*, *femB* nullmutánsok ezzel szemben életképesek, és 1-3 Gly egységet tartalmazó kereszthidakat hoznak létre (2. ábra) (Stranden, *et al.*, 1997).

A sejtfalhoz számos fehérje is kapcsolódik, mint a protein A, fibronectin-kötő fehérjék, adhezinek, stb, melyek fontos szerepet játszhatnak a patogenezisben. A fehérjéket a szortáz A kapcsolja a lipid II-höz kapcsolódó sejtfalegység peptidjében az L-Lys oldalláncának amino-

csoportjához, miután hasította a fehérje szignál-szekvenciáját (Leu-Pro-Xaa-Thr-Gly; Xaa bármely aminosav) a Thr és a Gly között (Dramsi, *et al.*, 2008).

Átjutva a membránon a carrier-lipid leválik, és az új egység beépül a sejtfalba (transzglykozilezés). A keresztkötések a pentapeptid terminális D-alaninjának lehasadásával jönnek létre a penicillin-kötő fehérjék (penicillin-binding proteins, PBPs) transzpeptidáz doménje hatására (transzpeptidáció, 2. ábra).

A penicillin-kötő fehérjéknek két nagy csoportját különböztetjük meg: nagy (HMM – high molecular mass) és kis molekulatömegű (LMM – low molecular mass) penicillin-kötő fehérjék. A HMM PBP-k multimoduláris PBP-k, melyek a peptidoglikán polimerizációjáért és a már meglévő sejtfalba való beillesztéséért felelősek. C-terminális doménjük minden esetben transzpeptidáz aktivitással rendelkezik. Az N-terminális domén aktivitása alapján újabb két csoportot különítünk el. Az A osztályú HMM PBP-k N-terminális doménje glikoziltranszferáz aktivitással rendelkezik, vagyis ezek az enzimek felelősek a nem keresztkötött glikán láncok meghosszabbításáért. Ebbe az osztályba sorolunk még olyan egyfunkciós enzimeket is, melyek a HMM PBP-k glikoziltranszferáz doménjére hasonlítanak (MGTs – monofunctional glikozyltransferases). A B osztályba olyan PBP-k tartoznak, melyek nem rendelkeznek glikoziltranszferáz aktivitással, N-terminális doménjük a sejt morfogenezisében játszhat szerepet sejtciklus fehérjékkel kölcsönhatva. Az LMM PBP-k csoportosítása többféleképpen is történhet, besorolhatóak A, B, C osztályba, vagy ha az összes LMM PBP-t a PBP-k C osztályának tekintjük, akkor C1, C2, C3 osztályba, de osztályozhatóak az *Escherichia coli* LMM PBP-éhez való hasonlóság alapján is (4, 5, 7 és AmpH típusok, a megfelelő *E. coli* PBP-k után) (Zapun, *et al.*, 2008).

Az *S. aureus*-nak három nagy molekulatömegű (PBP1, PBP2, PBP3) és egy kis molekulatömegű (PBP4) penicillin-kötő fehérjéje van. A PBP-k a membránnal asszociáltak, és megtalálhatóak a sejtek szétválásáért felelős rendszerben és a keresztfal szerkezetében is (Labischinski, 1988).

A PBP1 a B osztályú HMM PBP-k közé tartozik, N-terminális penicillin-kötő fehérje, mely dimerizációs doménnel, transzpeptidáz doménnel és két C-terminális PASTA (Penicillin-binding protein And Serine/Threonine kinase Associated) doménnel rendelkezik. Az utóbbi lehet felelős a fehérje megfelelő lokalizációjáért, mivel feltehetően a pentapeptid részeket ismeri fel a nem keresztkötött peptidoglikánban (Yeats, *et al.*, 2002, Jones & Dyson, 2006). Fontos szerepet játszik az utódsejtek szétválásakor, és nélkülözhetetlen a sejtnövekedés során (Beise, *et al.*, 1988, Wada & Watanabe, 1998), de a transzpeptidáz domén mutációja esetén is növekednek a sejtek és szeptum is képződik, egyedül a sejtek szétválása nem történik meg (a

növekedés egy-három meg nem történt osztódás után leáll), és az autolizinek szintézise represszálódik (Pereira, *et al.*, 2009). Ez alapján feltételezik, hogy az autolizinek regulációjában játszhat szerepet.

A PBP2 az egyetlen A osztályú PBP az *S. aureus* ban, vagyis az egyetlen olyan PBP, mely transzpeptidáz és transzglykoziláz aktivitással is rendelkezik. Az *S. aureus* esetében peptidoglikán beépülés csak az osztódás helyén történik (divizóma), vagyis nincs elongáz komplexük, ezért a PBP2 a szeptumban található, de csak akkor kerül oda, ha van jelen transzpeptidációt igénylő szubsztrát.

A PBP3 nem működik közre közvetlenül a szeptumképzésben, hiányának egyetlen jele a csökkent mértékű autolízis. A PBP4 a D,D-karboxipeptidáz aktivitással rendelkező *E. coli* PBP5-höz hasonlít, de azzal ellentétben rendelkezik transzpeptidáz aktivitással, mely szükséges az extrém mértékű keresztkötések kialakításához. A D,D-karboxipeptidázok lehasítják a pentapeptid részről a végálló D-Ala-t, így meggátolják a transzpeptidációt és a szeptumképzést, de az *S. aureus* PBP4 másodlagos transzpeptidáz reakcióban vesz részt, és keresztkötések alakít ki (Wyke, *et al.*, 1981).

A methicillin-rezisztens törzsek rendelkeznek egy ötödik PBP-vel, a PBP2a-val vagy PBP2'-vel, ami egy B osztályú HMM PBP transzpeptidáz. Affinitása sokkal kisebb a β -laktámokhoz, mint a többi PBP-nek, ezért β -laktám antibiotikumok jelenlétében is képes sejtfal szintézisre (Reynolds & Brown, 1985). A *femA*, *femB* nullmutációkban a PBP2a által létrehozott methicillin-rezisztencia megszűnik, jelezve, hogy a PBP2a nem képes keresztkötni nem teljes oldalláncú prekursorokat, bár valószínűleg nem ez az egyetlen oka a jelenségnek (Stranden, *et al.*, 1997).

A *S. aureus* ORF-ek között találtak még két olyan fehérjét, melyek valószínűsíthetően transzglykoziláz doménnel rendelkeznek, ezek az SgtA és SgtB (Kuroda, *et al.*, 2001). Az utóbbiról Wang és munkatársai ki is mutatták, hogy peptidoglikán elongációt katalizál (Wang, *et al.*, 2001), ők Mgt-nek nevezték a fehérjét.

A sejtek szétválasztásáért felelős rendszer feltehetően periódikusan rendezett csöves csomagokból áll, ezek a muoszómák, melyek autolitikus enzimeket tartalmaznak. A keresztfal képződése után ezek az enzimek szeparálják a sejteket, autolizin gyűrűt alkotva a sejtfelszín szeptális részén (Yamada, *et al.*, 1996).

Az autolizinek vagy peptidoglikán (murein) hidrolázok a baktérium által termelt, saját sejtfalukat bontó enzimek. Mivel a peptidoglikán rétegek kovalens héjat képeznek a baktérium felszínén, ezért az új sejtfalanyagoknak a meglévő sejtfalba való beillesztése olyan enzimeket is igényel, melyek hasítani képesek a sejtfal peptidoglikán szerkezetét. Ezek az enzimek fon-

tosak a sejtfal turnoverben, a sejtosztódásban, és az antibiotikum indukálta lízisben is. A sejtfalszintézis dinamikus folyamat, a szintézis és a lebontás egyensúlyban van egymással, az autolizinek szintézise szabályozott. Azonban a sejtfal turnoverben szerepet játszó autolizinek megtartják aktivitásukat penicillin és származékai jelenlétében is, de a transzpeptidáció ilyenkor gátolt, ezért a folyamatok eltolódnak a sejtfal bontás irányába, és a sejt előbb-utóbb lizál. A *S. aureus* minimum 4 különböző peptidoglikán hidrolázt termel: két N-acetil-muraminsav-L-alanin amidázt, az Atl-t és az Sle1-et (a MurNAc és az L-Ala között hasítanak), egy endo- β -N-acetil-glükózamidázt, mely szintén az *atl* génről íródik át (a glikán láncot hasítja), és legalább egy endopeptidázt. Az *atl* gén terméke egy bifunkcionális autolizin, amidáz és endo- β -N-acetil-glükózaminidáz doménnel rendelkezik, fő feladata a keresztfal hasítása az osztódás után. A génről először egy 138 kDa pro-Atl fehérje képződik, amiről először a szignál peptid távolítódik el, majd proteolitikus hasítás után felszabadul az 51 kDa endo- β -N-acetil-glükózamidáz és a 62 kDa N-acetilmuramil-L-alanin amidáz. Mindkettőnek van szekretált és sejtfelszínnel asszociált formája is. Az Sle1 (vagy Aaa) egy 32 kDa-os N-acetilmuramil-L-alanin amidáz, szintén a keresztfal hasításában működik közre, de autolízist közvetlenül nem indukál. Sle1 mutánsok patogenitása csökkent, mivel a fehérje egyúttal fibrinogénhez és fibronectinhez való adhéziót is biztosít (Vollmer, *et al.*, 2008). Korántsem ismert még az összes autolizin, sőt van olyan fehérje is, pl. LytM, melyről bebizonyosodott, hogy éppen génjének deléciója vezet lízishez, és a korábban feltételezett endopeptidáz aktivitása sem bizonyított (Singh, *et al.*, 2010).

A fentieket átgondolva egyértelmű, hogy a stacioner fázisú tenyészetnél miért nem igazán hatásosak a β -laktám antibiotikumok, hiszen ha egy sejt nem növekszik, nem osztódik, akkor nincs transzpeptidáció és az autolizinek sem működnek. Az autolitikus enzimek csökkent aktivitása is kialakíthat a β -laktámokkal szembeni ellenállást, ekkor a baktériumok szaporodását, növekedését gátolja a letális antibiotikum koncentráció, de nem feltétlenül pusztítja el őket. Feltételezik ezért, hogy a β -laktámok egyik hatása az autolizinek inhibitorainak gátlása. Mindazonáltal a sejtek antibiotikumok kiváltotta pusztulásának elsődleges és fő oka a sejtosztódás során a keresztfalak nem megfelelő képződése, s nem az autolizinek aktiválódása /eltolódott mértékű működése.

2.3. *Staphylococcus aureus* sejtfallszintézisére ható antibiotikumok, a sejtfallat hidrolizálni képes enzimek és az ellenük kialakuló rezisztencia

A bakteriális fertőzések kezelésekor négy fő ponton intézhetünk támadást: gátolhatjuk a DNS és/vagy RNS szintézist, a fehérje szintézist, a folát szintézist (és ezen keresztül az előbbi folyamatok monomerjeinek szintézisét) vagy más metabolikus útvonalat és végül gátolhatjuk a sejtfallszintézist (Tenover, 2006). Újabban egy ötödik lehetőség is felmerült: a lipopeptid antibiotikumok, mint a daptomycin Ca^{2+} -függő módon hozzákapcsolódnak a membránhoz, oligomerizálódnak pórust vagy ioncsatornát létrehozva a membránban, és a sejt membrán-depolarizáció miatti pusztulását okozzák (Tenover, 2006, Gold & Pillai, 2009). A daptomycin nagy koncentrációban (>8 mg/ kg/ nap) is biztonságos, bár nagyobb koncentrációban miopátiát, neuron degenerációt is okozhat, mivel hatása eukarióta sejteken is érvényesül (Tally & DeBruin, 2000).

Mivel a DNS replikáció, a transzkripció és a transláció enzimeit különböznek eukariótákban, ezért ezek az antibiotikumok elvileg nem jelentenek veszélyt az emberi sejtekre, de a bennük lévő mitokondriumokra igen. A folát szintézis inhibitorai szintén szelektíven hatnak a baktériumokra, hiszen az eukariótákból hiányzik ez az útvonal. Azonban a baktériumok is képesek felvenni a környezetből a folátot vagy a segítségével előállítandó monomereket, és szintén gond az emberi szervezet folát szintézisének (mitokondriumokban) és folát felvételének esetleges gátlása (Lambie & Johnson, 1985, Pereira & Kelley, 2011).

A peptidoglikán sejtfallat szintézise ezzel szemben valóban csak a baktériumokra jellemző folyamat, tehát alapesetben nem kell számolnunk az emberi sejtek közvetlen károsításával, ezért is használjuk ezeket az antibiotikumokat a fertőzések kezelésére, hacsak nem rezisztensek a törzsek, vagy a paciens nem mutat túlérzékenységi/ allergiás reakciót a kezelés során.

2.3.1. Sejtfallszintézist gátló antibiotikumok

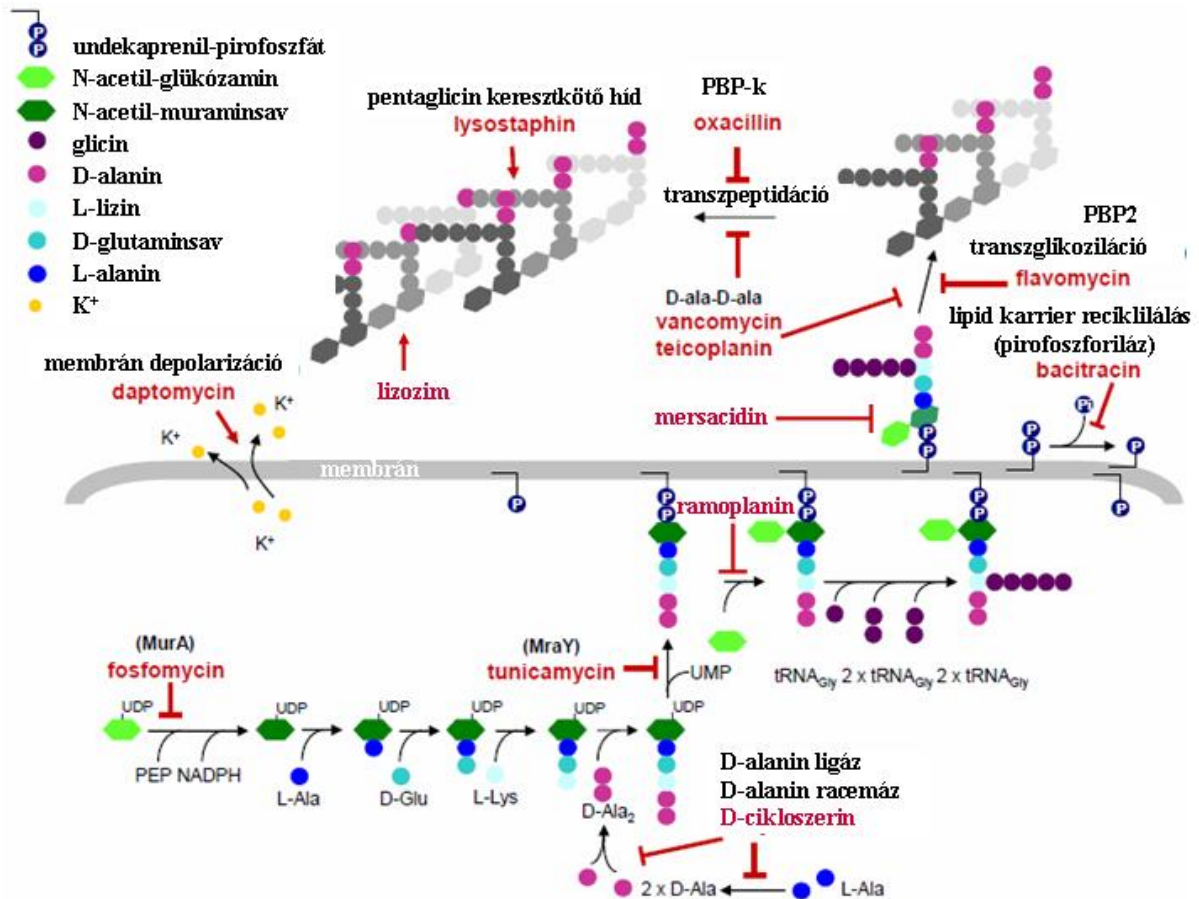
2.3.1.1. Nem β -laktám antibiotikumok

PEP analóg:

A foszfomicin a MurA (UDP-N-acetilglükózamin-3-enolpiruvil transzferáz) enzim működését gátolja, mely foszfoenolpiruvátot (PEP) kapcsol az UDP-N-acetilglükózaminhoz UDP-N-acetilmuraminsavat (UDP-MurNAc) kialakítva (2. ábra) (Proctor, 2008).

Oxazolidinonok:

A D-cikloszerin gátolja a D-alanin-D-alanin ligázt és az alanin racemázt, megakadályozva így a D-alanin peptidoglikán prekursorhoz való hozzákötődését (2. ábra) (Noda, *et al.*, 2004). Ez az egyetlen oxazolidinon, mely a sejtfallszintézisre hat, az összes többi ebbe a csoportba tartozó molekula (pl. linezolid) a fehérjeszintézist gátolja.



2. ábra: A *Staphylococcus aureus* sejtfallszintézise, a sejtfallszintézist gátló antibiotikumok és a sejtfallat degradáló enzimek (Dengler, *et al.*, 2011).

Nukleozidok:

A tunikamicin homológ nukleozid antibiotikumok keveréke, amellyel, hogy eukariótákban gátolja a glikoproteinek szintézisét, prokariótákban gátolja a peptidoglikán prekursor (foszfo-MurNAc-pentapeptid) transzferét a lipid carrier undekaprenil pirofoszfátra (C55-isoprenil pirofoszfát), mely reakciót az MraY transzlokáz katalizálja (2. ábra) (Ohlsen & Donat, 2010). Szubletális koncentrációban gátolja a TagO-t is, mely a sejtfall teikolsav útvonal első enzime (Kern, *et al.*, 2010).

Foszfoglitolipid antibiotikumok:

A flavomicin (egy moenomycin komplex) és a moenomycin, a transzglykozilációt gátolják (2. ábra), hozzákötődve a PBP2 transzglykoziláz doménjéhez (Lovering, *et al.*, 2007).

Peptid részt tartalmazó antibiotikumok:

A bacitracin ciklikus polipeptidek keveréke, fémion jelenlétét igénylő komplexet alakít ki a lipid carrier undekaprenil pirofoszáttal, ezáltal meggátolva a lipid carrier defoszforilációját és reciklálását (2. ábra) (Hesketh, *et al.*, 2011).

A glikopeptid antibiotikumok, mint a vancomycin és teicoplanin a sejtfalszintézist gátolják a peptidoglikán diszacharid-pentapeptid prekursor C-terminális végéhez (a lipid II D-Ala-D-Ala részéhez) kapcsolódva, és sztérikusan akadályozzák a transzglykozilációt (és a transzpeptidációt, 2. ábra) (Nailor & Sobel, 2009). A teicoplanin aktivitását elősegíti a citoplazma membránnal való kölcsönhatása. Ellene a baktérium védekezhet úgy, hogy a D-Ala-D-Ala vég helyett D-Ala-D-Lac vagy D-Ala-D-Ser véget állít elő. A klorobifenil-vankomicinnek a foszfoglitolipidekhez hasonló aktivitása van (Goldman, *et al.*, 2000).

A ramoplanin glikolipodepsziptid, *Actinoplanes* spp. termeli. A lipid I N-acetilglükózaminil transzferáz által katalizált lipid II-vé alakítását gátolja (2. ábra) (Somner & Reynolds, 1990, Montecalvo, 2003).

A mersacidin lantibiotikum, 20 aminosavból áll, a *Bacillus* sp. HIL-Y85/54728 törzs riboszómán szintetizálja. Komplexet képez a peptidoglikán prekursor lipid II feji cukor-foszfát csoportjával, gátolva így a peptidoglikán szintézis transzglykoziláz reakcióját (2. ábra) (Sass, *et al.*, 2008).

A daptomycin egy lipopeptid, a membrán depolarizációját okozza, de lehet a peptidoglikán szintézist közvetlenül vagy közvetve gátló aktivitása is (2. ábra) (Muthaiyan, *et al.*, 2008).

2.3.1.2. β -laktám antibiotikumok

A β -laktám antibiotikumok fő közös alkotóeleme a β -laktám gyűrű, ez felelős a hatásért, míg a hozzá kapcsolódó oldalláncok a vegyület stabilitását, farmakokinetikáját és antibakteriális spektrumát határozzák meg, és ezek alapján végezhetjük el a csoportosításukat is. Az alapszerkezet hasonlóságára vezethető vissza, hogy az egyes csoportokon belüli származékok, sőt más-más csoportbeliek között is felléphet keresztrezisztencia. Szerkezetük a transzpeptidázok szubsztrátjához, a keresztköti pentapeptid terminális D-Ala-D-Ala konformációhoz hasonlít, a keresztköti létrehozó enzim szubsztrátként elfogadja az antibiotikumot. Az enzim penicillin-kötő fehérjeként (PBP) működik, viszont a molekulát nem képes

hidrolizálni, kovalens penicilloil-enzim intermedier képződik és így az enzim inaktiválódik. A β -laktám antibiotikum jelenléte következtében a keresztkötések képződése csökkent mértékű lesz, azaz a sejtfa instabilabbá válik, amit a baktérium végül már nem tud tolerálni, és a sejtfa autolitikus enzimeinek hatására a sejt elpusztul (Tipper, 1985).

Penicillinek:

Penám vázas vegyületek, vagyis alapvázukban a β -laktám gyűrűhöz tiazolidin gyűrű kapcsolódik. Alapvegyületük a 6-amino-penicillánsav, amelyben a β -laktám gyűrűhöz kapcsolódó nitrogénnek két hidrogénnel kívül nincs más ligandja.

A baktériumok által termelt β -laktamázok a β -laktám gyűrű hasításával inaktiválják a rájuk érzékeny penicillineket, ezért a cél az, hogy a β -laktamázoknak minél inkább ellenálló vegyületeket állítsanak elő.

1) Természetes penicillinek

Ezeket a penicillineket penészgomba fajok termelik (pl. *Penicillium chrysogenum*), belőlük állítják elő félszintézissel a mesterséges penicillineket. A β -laktamázok inaktiválják ezeket a vegyületeket, ezért β -laktamáz termelő törzsek esetén alkalmazásuk nem célravezető. Általában *Streptococcus*, *Treponema*, *Borrelia*, és anaerob baktériumok okozta fertőzések kezelésére használatosak.

a) Penicillin G (savlabil, szájon át nem alkalmazható)

b) Penicillin V (savstabil, szájon át is alkalmazható)

2) Félszintetikus penicillinek

A természetes penicillinek oldalláncának lehasításával nyert 6-amino-penicillánsavval reagáltatják a kívánt oldallánc aldehid formáját, ami egy amid-kötésen keresztül kapcsolódik a penám vázhoz.

a) Penicillináz-rezisztens penicillinek (pl. methicillin, oxacillin, nafcillin, cloxacillin)

leginkább penicillin-rezisztens *Staphylococcus aureus* ellen alkalmazhatók, nem hatnak Gram-negatív baktériumokra.

b) Széles spektrumú penicillinek (ampicillin, amoxicillin)

β -laktamáz termelő Gram-negatív és Gram-pozitív baktériumok ellen hatásosak. Savstabil, de β -laktamáz érzékeny vegyületek. Mára nagyfokú rezisztencia fejlődött ki ellenük, így alkalmazhatóságuk csökkent.

c) Pseudomonas illetve egyéb Gram-negatív anaerob fajok ellen hatásos penicillinek

Karboxipenicillinek: carindacillin, carbenicillin, ticarcillin.

Ureidopenicillinek: mezlocillin, azlocillin, piperacillin. Széles spektrum jellemzi őket, de nem savstabilak. Az enterococcusok sejtfaát és sejtmembránját degradálják;

Staphylococcusok és Gram-negatívok által termelt β -laktamázokkal szemben nem ellenállók.

Cefalosporinok:

A cephem vázas vegyületekben a β -laktám gyűrűhöz dihidro-tiazin gyűrű kapcsolódik. Az alapvegyület a 7-amino-cephalosporánsav, melyet a *Cephalosporium acremonium* által termelt cephalosporin C-ből állítanak elő, és a többi cephalosporin félszintézissel történő előállítására használják. A 7-es helyen lévő oldallánc felel az antimikrobiális hatásért, míg a 3-as helyzetben levő a farmakokinetikai tulajdonságokért. A Streptomycesek termelik a cephamycineket, melyek a 7-es helyzetben metoxi csoportot tartalmaznak, ami nagyobb stabilitást eredményez β -laktamázokkal szemben.

1) Első generációs cephalosporinok

Gram-negatív baktériumok ellen mérsékelt, Gram-pozitívok ellen elég jó hatással rendelkeznek. Ide tartozó vegyületek, pl.: cefazolin, cefalotin, cefalexin.

2) Második generációs cephalosporinok

Az első generációsokhoz képest kifejezettebb hatást mutatnak a Gram-negatív baktériumok ellen. Ide tartozó vegyületek, pl.: cefamandol, cefuroxim, cefoxitin.

3) Harmadik generációs cephalosporinok

Hatásspektrumuk még inkább eltolódott a Gram-negatív baktériumok irányába, ezzel együtt hatékonyságuk csökkent a Gram-pozitív cocciak, különösen a *Staphylococcus aureus* ellen. Ide tartozó vegyületek, pl.: ceftazidim, cefoperazon, cefotaxim, de ide tartozik a moxalaktám is, melyet a penicillin-G-ből kiindulva szintetizálnak, és amely érdekessége, hogy oxacephem vázat tartalmaz.

4) Negyedik generációs cephalosporinok

Mind Gram-pozitív, mind Gram-negatív baktériumok elleni hatással rendelkeznek. β -laktamáz stabilak, ebből fakadó fokozott aktivitás jellemzi őket a Gram-negatív bélbaktériumokkal szemben. A többi cephalosporinhoz képest jobb penetrációs képességgel rendelkeznek.

Karbapenemek:

Alapvázuk a penem váz, mely csak abban különbözik a penám vázától, hogy a tiazolidin gyűrűben kettős kötés található, és szén helyettesíti a kén atomot, de az oldallánc kénatomon keresztül kapcsolódik a maghoz.

Széles spektrummal rendelkeznek, egyaránt jól hatnak Gram-pozitív, Gram-negatív és anaerob baktériumokra, Pseudomonasra. Ellenállóak a β -laktamázokkal szemben, bár az utóbbi időben ellenük is kezd rezisztencia kialakulni.

Idetartozó vegyületek:

- a) imipenem (proximális tubulus dipeptidáza gyorsan elhidrolizálja, ezért egy dehidropeptidáz inhibitorral adják együtt)
- b) meropenem (kevésbé aktív Gram-pozitív coccusokkal szemben, de hat néhány imipenem rezisztens *Pseudomonas*ra is. Renális dipeptidázokra nem érzékeny)
- c) ertapenem (nem használható MRSA törzsek, ampicillin-rezisztens enterococcusok, *Pseudomonas aeruginosa* vagy *Acinetobacter* fajok ellen)
- d) doripenem (ultraszéles spektrumú antibiotikum, *Pseudomonas aeruginosa* ellen is hatásos, kórházi fertőzések esetén is használható)

Monobaktámok:

Az alapvázban csak a β -laktám gyűrű található meg. Gram-negatív baktériumokra fejtik ki hatásukat. Nem lép fel velük szemben allergia. β -laktamáz rezisztensek. Jellemző vegyület az aztreonam. A monobaktámok antimikrobiális aktivitása az aminoglikozidokéra hasonlít, kitűnőek az Enterobaktériumok és a *Pseudomonas aeruginosa* ellen. *In vitro* igen aktívak a *Neisseria gonorrhoeae*-vel és a *Haemophilus influenzae*-vel szemben is.

2.3.1.3. β -laktamáz gátlók

Önmagukban antimikrobás hatást nem mutatnak, de gátolják az antibiotikumokat degradáló bakteriális enzimeket, ezáltal lehetővé téve, hogy az antibakteriális szerek valóban ki tudják fejtetni hatásukat. Az enzimgátlás lehet reverzibilis, mikor a gátló molekula viszonylag gyorsan, és lehet irreverzibilis, amikor nem, vagy csak nagyon lassan disszociál az enzimről (Bush & Sykes, 1983).

A reverzibilis inhibitorok két csoportra oszthatók fel. Az egyik csoport a kompetitív gátlószereké, ezek a vegyületek specifikusan az enzim aktív centrumához kapcsolódnak, mert szerkezetük analógiát mutat a szubsztrát molekuláéval. Gátló hatásukat tulajdonképpen a szubsztrát bekötődésének akadályozásával érik el, vagyis csökken az enzim-szubsztrát komplex koncentrációja, de az enzim működésének maximális sebességét nem befolyásolják. A szubsztrát és az inhibitor az enzim ugyanazon helyéért vetélkedik, ezért megnövelt szubsztrát koncentrációval a gátlás visszaszorítható.

A másik csoportba a nem kompetitív gátlószerek tartoznak, melyek nem az aktív centrumhoz, hanem az enzim más részéhez képesek kötődni, befolyásolják az enzim szerkezetét, így működésének maximális sebességét is, de nem befolyásolják a szubsztrát bekötődését, és a szubsztrát koncentrációjának növelésével nem szoríthatók le az enzimről.

Az irreverzibilis inhibitorok közé tartoznak az aminosav módosítók, melyek az enzim aminosavaival kovalens kötést alakítanak ki, pl. pCMB-cisztein, és ide tartoznak az ún. öngyilkos inaktívátorok (Bush & Sykes, 1986), melyek az enzim aktív centrumába kötődnek, majd a katalitikus reakció eredményeképpen fragmentálódnak, és a fragmentek az enzimen maradnak kovalensen kötve. Így hat a pl. a klavulánsav és a szulbaktám. Terápiás jelentősége is ez utóbbi csoportnak van, hiszen tartós és valóban érvényre jutó hatást a reverzibilis gátlószerekkel nem érhetünk el. Ezeket az anyagokat a terápiában β -laktámokkal kombinációban alkalmazzák. Néhány példa ezekre: Augmentin (amoxicillin + klavulánsav), Timentin (ticarcillin + klavulánsav), Unasyn (ampicillin + szulbaktám), Sulperazon (cefoperazon + szulbaktám), Sultamicillin (ampicillin + szulbaktám észtere), Tazocin (piperacillin + tazobaktám).

2.3.1.4. β -laktám antibiotikumokkal szemben kialakuló rezisztencia általános okai

Megváltozott target:

A β -laktámok targetjeit PBP-knek, penicillin-kötő fehérjéknek nevezzük, melyek szerkezete megváltozhat úgy, hogy csökken az affinitásuk ezen antibiotikumok iránt, így a mikroorganizmus ún. intrinsic rezisztenciára tesz szert.

Permeabilitási rezisztencia (target elérésének akadályoztatottsága):

A Gram-pozitív baktériumokban általában nem játszik szerepet, mert ott a sejtfalon kívül legfeljebb tok lehet, ami nem képez akadályt a kis molekulású β -laktám átjutásával szemben, szöges ellentétben a Gram-negatívok külső membránjával, amelyen csak néhány kisméretű hidrofíl antibiotikum képes átdiffundálni az ún. porin fehérjék alkotta csatornán keresztül.

Az antibiotikum eltávolítása a sejtől (efflux):

Sok esetben a humán patogén törzsek antibiotikum-rezisztenciája az efflux pumpák génjeinek emelkedett szintű expressziójával függ össze. Csaknem az összes antibakteriális szerre találhatunk legalább egy efflux pumpát, mely képes azt eltávolítani a sejtől. Néhány efflux pumpa csak az antibiotikumok bizonyos típusát képes eltávolítani, mások nem rokon szerkezetű antibiotikumokon is ki tudják fejteni hatásukat, így multidrog rezisztenciát hozva létre. Az efflux pumpáknak öt nagy családjuk van, ezek: ATP-kötő kazetta család (ATP binding cassette – ABC – family), fő facilitátor szupercsalád (major facilitator superfamily – MFS), multidrog és toxikus komponens kilökő család (multidrug and toxic compound extrusion – MATE – family), rezisztencia nodulációs sejtosztódási család (resistance nodulation cell division – RND – family) és a kis multidrog rezisztencia család (small multidrug resistance – SMR – family). Míg a MATE és SMR efflux pumpa családokat többnyire a Gram-pozitív

baktériumokban figyelhetjük meg, az RND családokba tartozó efflux pumpákat gyakran Gram-negatív baktériumokban találjuk. Az MFS és ABC családba tartozó efflux pumpák mind Gram-pozitív, mind Gram-negatív baktériumokban előfordulhatnak (Poole, 2007).

Az antibiotikumot hidrolizálni képes enzimek termelése:

Ezek az enzimek a β -laktamázok, melyek aktív centruma általában szerint tartalmaz. Ennek a szerinnek a hidroxil-csoportjával a CO-N kötés közt felhasított β -laktám gyűrű penicilloil enzimet képez (Livermore, 1991). A különbség a PBP-khez képest az, hogy az enzim gyorsan el is hidrolizálja az antibiotikumot, és vízfelvétellel regenerálja hidroxil-csoportját.

A β -laktamázok képesek lehetnek akár több fajta vegyület ilyen módon történő inaktiválására, de lehetnek specifikusak is. A baktériumok sokféle β -laktamázt termelnek, de egy törzs általában csak néhányfélét állít elő: ezeket a Gram-pozitív baktériumok többnyire kiválasztják a környezetükbe, bár membránkötött formák is előfordulnak, míg a Gram-negatívoknál a periplazmatikus térben találhatóak. A termelődésük lehet konstitutív és indukálható is.

Olyan β -laktamázok is hozzájárulhatnak a rezisztenciához, melyek megkötni képesek az antibiotikumot, de hidrolizálni csak igen lassan; ez az ún. trapping mechanizmus, mely jelentősége az adott törzs rezisztenciájában az ilyen β -laktamázok mennyiségétől és képződésének intenzitásától függ, de amely önmagában nem okoz nagyobb mértékű rezisztenciát (Vu & Nikaido, 1985, Livermore, 1987).

A rezisztencia eredete:

1) Természetes eredetű (intrinsic) rezisztencia

Genetikailag determinált, a speciesen belül minden egyedre egyformán érvényes rezisztencia-féleség, pl.: minden *Pseudomonas* rezisztens G-penicillinre.

2) Szerzett (extrinsic) rezisztencia

a) kromozómális eredetű

Spontán mutációk által jön létre, 10^{-5} - 10^{-10} valószínűséggel

b) extrakromozómális eredetű

i) plazmid által kódolt: a plazmid egy R-plazmid, mely tartalmazza a rezisztencia gént, és az átvihető egyik sejtől a másikba

ii) transzpozon által kódolt: 1-2 gént tartalmaznak, nem autoreplikatívak, gyakran integrálódnak plazmidba vagy kromozómába.

2.3.2. A sejtfalet hidrolizáló enzimek

A *Staphylococcus aureus* sejtfalet enzimatis emésztésére két enzimet szokás használni, a lizozimot és a lisostaphynt (2. ábra). A lizozim fő célpontja a peptidoglikán gerincét alkotó N-acetil-glükózamin és N-acetil-muraminsav közötti kötés. A két cukorkomponens közötti kötés felszakításával tönkreteszi a polimert. Azonban a *S. aureus* képes volt rezisztenciát kifejleszteni ellene, méghozzá úgy, hogy az N-acetil-muraminsav 6. szénatomját acetilálja (Vollmer, 2008).

Nemrég kimutatták, hogy a rezisztencia kialakulásában szerepe lehet a *tagO* génnek is. A génről termelődő fehérje a teikonsav és a sejtfalet cukor egységeinek összekötésében vesz részt. A *tagO* deléciós mutáns, mely egyúttal O-acetiláció deficiens is volt, érzékenyebbnek bizonyult a lizozimra, mint a vad törzsek, bár a *tagO* deléciója vad típusú törzsek esetében nem vezetett fokozott lizozim-érzékenységhez. Ez azzal magyarázható, hogy ezeknél a törzseknél az N-acetil-muraminsav, ahová a teikonsav kötődne, eleve O-acetilált lehet a *tagO* mutánsokban (Bera, *et al.*, 2005).

Azt is feltételezik, hogy a sejtfalet teikonsav polimerek, amelyek hozzávetőlegesen minden kilencedik N-acetil-muraminsav C6-hoz kapcsolódnak, megátolják, hogy a lizozim szubtráktó zsebe felismerje a molekulát (Bera, *et al.*, 2007).

A lysostaphinnak három enzimatis aktivitása is van: glicil-glicin endopeptidáz, endo- β -N-acetil-glükózaminidáz és N-acteil-muramil-L-alanin amidáz. A glicil-glicin endopeptidáz aktivitás az, ami hatékonyá és specifikussá teszi az enzimet a *S. aureus* sejtfaletának bontásában, ugyanis a glicil-glicin endopeptidáz specifikusan hasítja a glicin-glicin kötéseket, amelyek kifejezetten a *S. aureus* sejtfaletában található interpeptid kereszthidakra jellemzőek (Kumar, 2008).

2.4. A *Staphylococcus aureus* methicillin rezisztenciája

A CLSI (Clinical Laboratory and Standards Institute korábban NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards) legújabb irányelvei szerint oxacillin-érzékeny (MSSA) és oxacillin-rezisztens (MRSA) törzsekről beszélhetünk (a methicillint már nem használják a klinikumban, de a nevezéktanban még igen), a rezisztens törzsek agar dilúcióval meghatározott oxacillin MIC-e nagyobb, mint 6 $\mu\text{g/ml}$, az érzékeny törzsek MIC-e ez alatt van (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2011). A methicillin-rezisztencia

homorezisztens és heterorezisztens formában is megjelenhet *Staphylococcus aureus*-ban. Az előbbi egységesen magas rezisztenciát jelent, vagyis triptikus szója táptalajon tenyésztett sejt-populációnak több mint 1%-a nő ki 50 µg/ml methicillinnel indukálva, míg az utóbbi esetén ez az arány kevesebb, mint 1%, jellemzően 1 sejt 10^4 - 10^7 -ből (Hartman & Tomasz, 1986). A heterorezisztens sejtek detektálásához a tenyészetet 30-35°C-on kell inkubálni, mivel a heterorezisztencia nem jelenik meg 37°C-on (Hartman & Tomasz, 1986). A médiumnak 2-4% NaCl-ot is kell tartalmaznia, a magas sókoncentráció ugyanis előnyös feltételeket teremt a β -laktamáz produkcióhoz és kibocsátáshoz, amivel a mikroorganizmusok védekezni tudnak a β -laktámokkal szemben, amíg a rezisztencia ki nem fejlődik (Kim & Chipley, 1974, Hartman & Tomasz, 1986). További különbség, hogy a homorezisztens MRSA populáció egységes rezisztenciájú sejtekből áll, míg a heterorezisztens MRSA-nak van egy rezisztensebb szubpopulációja, és a legtöbb sejt alacsonyabb alaprezisztencia szinttel rendelkezik.

2.4.1. A rezisztencia fő oka: új target szintetizálása

A penicillin érzékeny staphylococcusok négyféle penicillin-kötő proteint tartalmaznak, ezek a korábban említett PBP1 (87 kDa), PBP2 (80 kDa), PBP3 (72 kDa) és PBP4 (41 kDa) (Georgopadakou & Sykes., 1983). Az MRSA törzsekben jelen van egy további PBP is, a PBP2a (78 kDa), mely alacsony kötőképességgel rendelkezik a β -laktám antibiotikumok iránt, így képes átvenni a többi PBP szerepét, mikor azok már telítődtek. Kimutatták, hogy a PBP2a-nak 2-10-szer magasabb penicillin koncentrációra van szüksége a telítődéshez, mint a PBP2-nek, és 20-szor magasabbra, mint a PBP1-nek (Brakstad & Maeland, 1997). A rezisztencia további növeléséhez hozzájárul az is, hogy a methicillin indukálja ezen PBP-k termelését, ennek ellenére semmilyen összefüggés sem mutatható ki a termelt PBP2a mennyisége és a methicillinre kapott MIC értéke között. A PBP2a szekvenciája egyedinek tekinthető, ellene monoklonális antitestet lehet termeltetni: ez felhasználható az MRSA törzsek identifikálásakor (Brakstad & Maeland, 1997).

További érdekesség, hogy a PBP2a nem jelenik meg 5,2-es pH-n, ami érthetővé teszi, hogy az ilyen pH-n tenyésztett kultúrák miért csak érzékeny törzseket tartalmaznak (Hartman & Tomasz, 1986).

A PBP2a-t a kromoszómális *mecA* kódolja, ez a gén az MRSA törzsekben található meg (Brakstad & Maeland, 1997). Alapvető homológia figyelhető meg a *mecA* és az *Escherichia coli* PBP kódoló génjei között, de a staphylococcalis BlaZ penicillinázt kódoló génnel is

nagyfokú hasonlóságot mutat. Erre alapozva feltételezik, hogy a *mecA* β -laktamáz kódoló gének és normál PBP-k génjeinek rekombinációja folytán keletkezett.

Maga a gén az SCC*mec* (staphylococcal cassette chromosome *mec*) kromoszómális területen helyezkedik el (Ito, *et al.*, 2003). Ez egy 21-64 kb nagyságú mobilis kromoszómális régió. Itt található a *mecA* expresszióját szabályozó gének is, valamint a további rezisztencia determinánsok, amelyek a multirezisztencia elérését eredményezik (Deurenberg & Stobberingh, 2008).

A *mecA* transzkripciójának szabályozásáért a *mec* régió belüli *mecI*, mely egy represszor proteint kódol, és *mecRI*, egy transzmembrán proteint kódoló szabályozó elem a felelős. A szabályozás hasonló mechanizmussal történik, mint az alább jellemzett BlaZ β -laktamáz expressziójának szabályozása, és a két szabályozórendszer keresztszabályozást mutat.

A PBP2 szintén fontos szerepet játszik a methicillin-rezisztenciában. Transzglykoziláz aktivitása szükséges a PBP2a működéséhez, hogy a rezisztencia megjelenjen (Pinho, *et al.*, 2001). Nem rezisztens sejtekben a β -laktám antibiotikum acilezi a PBP2-t, és ez vagy a természetes szubsztrát megvonása a fehérje szeptumból a sejt felszínre való áthelyeződését okozza. Ezzel szemben MRSA törzsekben a PBP2 a szeptumban marad, mutatva, hogy a PBP2a igényli a jelenlétét (Berger-Bächi, *et al.*, 2009).

A PBP4 nem esszenciális transzpeptidáz, együttműködik a PBP2-vel és a PBP2a-val. Bizonyos törzsekben elvesztése a rezisztencia kismértékű csökkenését eredményezi csak, de a CA-MRSA törzsekben a *pbp4* (*pbpD*) elvesztése nagymértékben csökkenti a methicillin rezisztenciát (Berger-Bächi, *et al.*, 2009).

2.4.2. Kiegészítő gének a methicillin rezisztenciában

Ezek a *fem* (factors enhancing methicillin resistance) és az *aux* (auxiliary – kiegészítő) gének, melyek a methicillin rezisztencia kifejlődését elősegítik, és a kromoszómán, a *mec* régió kívül helyezkednek el. Többségüket Tn551 transzpozonnal végzett mutagenizálás során detektálták. A fő *fem* gén termékei a peptidoglikán monomerek szintéziséhez szükségesek. A FemA és FemB alapvetőek a peptidoglikán transzpeptidációjához, egyikük inaktiválása lényegesen csökkent methicillin rezisztenciához vezet, míg a *femAB* mutánsok teljesen érzékennyé válnak. A *femC* nem más, mint a glutamin szintetáz operon (*glnRA*) represszora (*glnR*). Mutációjának szerteágazó hatása van, mivel az operon központi szerepet játszik a nitrogén metabolizmusban. A represszor mutációja miatt végső soron lecsökken a glutamin szint

a sejtben, ami egyebek közt az D-Glu csökkent amidálásához és így csökkent izoglutamin (D-iGln) kialakulásához vezet, ezek a peptidek pedig kevésbé vesznek részt keresztkötésben, és a törzsek methicillin-rezisztenciája jelentősen csökken. Az ilyen törzsekben megjelennek alacsony gyakoriságban olyan szubklónok, melyekben egy kompenzatórikus mutáció visszaállítja a methicillin-rezisztenciát. A *femD* (vagy *femR*) a foszfoglükóz-mutáz génje (*glmM*), ami a glükóz-6-foszfátot alakítja át glükóz-1-foszfáttá, és valószínűleg csökkent mértékű peptidoglikán-prekursor kialakulásához vezet. Normál körülmények között kis százalékban tapasztalható alanin kapcsolódása az L-lizin ϵ -amino-csoportjához glicin helyett, ezeknek a módosulásoknak az aránya csökkent a *femD* mutánsokban. Ezek a mutánsok nemcsak csökkent methicillin, hanem csökkent teicoplanin rezisztenciájúak is. A *femE* mutánsok methicillin-rezisztenciája enyhén csökkent, de a sejt falban eltérések nem tapasztalhatóak. Összességében az inaktivált *fem* gének esetén keletkezett, strukturálisan különböző peptidoglikán prekursorok nem fognak a PBP2a-hoz kapcsolódni, ezért több methicillin kötőhely áll rendelkezésre, és a methicillin-rezisztencia csökken.

Egyéb gének is szerepet játszhatnak a methicillin-rezisztencia támogatásában. Az *fntA* terméke egy membránkötött fehérje, mely két konzervált doménnel is rendelkezik a penicillin-kötő fehérjék három ilyen jellegű doménjéből. Átírása megemelkedik β -laktám antibiotikumok jelenlétében, gyenge interakciót mutat β -laktám antibiotikumokkal és peptidoglikánnal. Mutációja csökkent D-izoglutamin képződéshez és csökkent keresztkötés arányhoz vezet (Komatsuzawa, *et al.*, 1999). Teikonsavak sem szintetizálódnak, és az ilyen mutációt hordozó törzsek nem képeznek biofilmet. Mutációja csökkent methicillin-rezisztenciát okoz, és gyorsabb lízist Triton X-100 hatására (Berger-Bächli, *et al.*, 2009). Úgy tűnik, a gén egy N-formiltranszferáz kódol (Margolis, *et al.*, 2000), mely az eubaktériumok iniciátor tRNS-ének formilálásához szükséges.

Ha a sejtek magas sókoncentráció jelenlétében nőnek, a teikolsavakhoz nem kapcsolódnak D-alanin észterek, ami a sejt megnövekedett anionos töltését eredményezi és az autolitikus aktivitás gátlását. Az autolitikus aktivitás poszttranszlációs modulálásában fontos szerepe van a teikolsavaknak, mely hatással van a methicillin-rezisztenciára is. A teikolsavak D-alanin észterifikálásáért felelős *dtl* operon (az operonon belül a *dtlB*) inaktiválása növelte a methicillin-rezisztenciát. Ha overexpresszáltatták a GraR-t, mely az operon pozitív regulátora, a sejtek oxacillin-rezisztenciája csökkent (Berger-Bächli, *et al.*, 2009).

Az *llm* (szinonima: *tagO*) egy undekaprenil-foszfát- α -N-acetil-glükózaminil-1-foszfát transzferáz, mutációja az autolízist érinti (néhány mutánsban növeli, másokban csökkenti), de

a növekedés és a methicillin-rezisztencia mindig csökkent, a Triton X-100 okozta lízist pedig fokozza, és a sejtfalban nincsenek teikolsavak (Berger-Bächli, *et al.*, 2009).

Az alapfeltételezés az volt, hogy az autolízis mértéke is csökkent a methicillin-rezisztens törzsekben, de van olyan törzs, ahol éppen növekedést tapasztaltak. Az első esetre példa az N-acetil-muraminsav-L-alanin amidázokkal homológiát mutató *lytH*, mely mutációja jelentősen megnöveli a methicillin-rezisztenciát a törzsekben, de az *atl* mutációja kismértékű csökkenést okoz (Berger-Bächli, *et al.*, 2009).

Néhány kétkomponensű szabályozórendszer szintén hatással van a methicillin rezisztenciára illetve a β -laktám toleranciára az általuk reguláltan kifejeződő fehérjék működésén keresztül. Az egyik ilyen rendszer a LysSR, mely az *lrgA-lrgB* kifejeződését kontrolálja. Az LrgA és az LrgB antiholinok, csökkentik az extracelluláris murein hidroláz aktivitást. A holin a Cid fehérje, melyet a *cidABC* operon kódol. A holinok olyan fehérjék, melyek pórust képeznek a membránban, és lehetővé teszik molekulák kijutását a sejtől, ebben az esetben a murein hidrolázokét. Az antiholin Lrg és a holin Cid kontrolálja a murein hidrolázokat és valószínűleg a környezeti stimulusok által kiváltott sejthalál útvonal elemei. Ha a sejt *cidA* mutáns volt, akkor a penicillin sejthalált kiváltó hatása sokkal kevésbé érvényesült, míg az *lrg* inaktiválása fokozott murein hidroláz aktivitást eredményezett (Berger-Bächli, *et al.*, 2009).

A magas inhibitorikus koncentrációjú β -laktámok a VraSR rendszeren keresztül aktiválják a sejtfal stressz stimulont. A VraSR rendszer koordinálja a murein monomer prekursorok szintézisét a MurZ és a peptidoglikán polimerizációját a PBP2 és SgtB kifejeződésének szabályozásával. Ha inaktiváljuk a VraSR rendszert, akkor megnő a sejtek érzékenysége a sejtfal-szintézist gátló antibiotikumokkal szemben (foszfomicin, β -laktám, glikopeptid), valószínűleg az előbb felsorolt fehérjék kiesése miatt. A rendszer egyéb gének (*fmtA*, *vraDE*, *tcaRAB*) kifejeződését is szabályozza, melyek kiesése a β -laktám rezisztencia csökkenését eredményezi (a *tcaRAB* esetén ez együtt jár a teikoplanin rezisztencia egyidejű növekedésével) (Berger-Bächli, *et al.*, 2009).

A *sigB* inaktiválása szintén csökkenti a methicillin-rezisztenciát. A SigB az általános stressz válaszáért felelős alternatív szigma faktor, de általános sejtfolymatokért is felelős, tehát elég széles az általa regulált gének és rendszerek skálája. Hatása a methicillin-rezisztenciára valószínűleg indirekt módon, az YabJ-SpoVG regulációs rendszeren keresztül érvényesül (Berger-Bächli, *et al.*, 2009, Schulthess, *et al.*, 2009).

Mind az *agr* és *sarA* operon inaktiválása csökkentette a heterorezisztens MRSA törzsek képességét, hogy nagyobb mértékű rezisztenciát mutató variánsokat hozzanak létre. A PBP2a

mennyisége nem változik ilyenkor, de a PBP1 és a PBP3 mennyisége csökkent (Berger-Bächi, *et al.*, 2009).

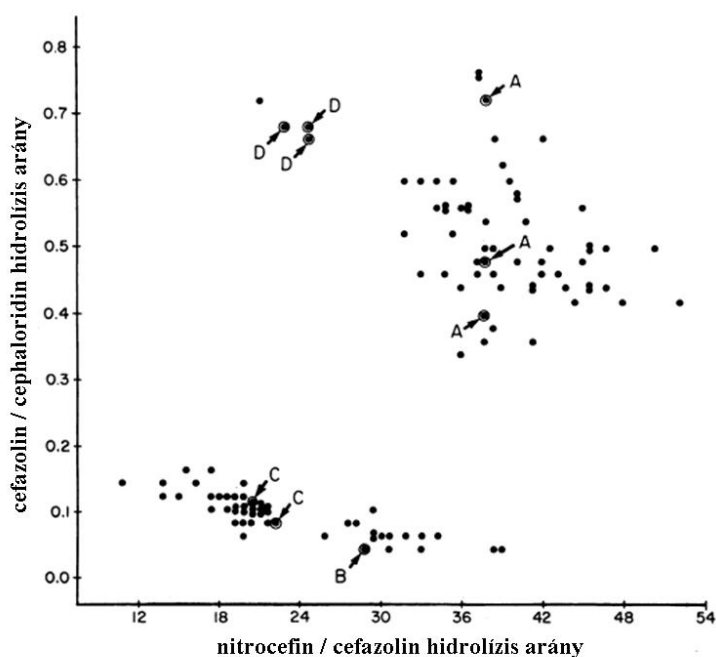
Mivel a glutaminsav és a lizin a murein monomer prekursor eszenciális alkotói, ezért az útvonal génjeinek inaktiválása szintén a sejtfa stabilitásának és az antibiotikum rezisztenciának a csökkenését eredményezi (Berger-Bächi, *et al.*, 2009).

A methicillin-rezisztencia kapcsolt a glükóz metabolizmussal is, ugyanis a CcpA (carbon catabolite protein A) génjének inaktiválásakor kiderült, hogy nem csak a glükóz elsődleges szénforrásként való hasznosítására van hatással, hanem virulencia faktorok termelődésére, biofilm kialakítására és antibiotikumokkal szembeni rezisztenciára is (Berger-Bächi, *et al.*, 2009).

2.4.3. A *Staphylococcus aureus* β -laktamázai

A β -laktamázok valószínűleg PBP-kből alakultak ki (Fuda, *et al.*, 2005). A *Staphylococcus aureus* β -laktamázok szerológiailag négy csoportba (A, B, C, D) sorolhatók. A különböző csoportokba tartozó enzimek szubsztráthidrolízis-profilja is eltérő. A meghatározást teljes sejtten vagy β -laktamáz extraktummal végzik el különböző, főként cephalosporin szubsztrátokat használva. 100 μ M nitrocefín, cephaloridin és cefazolin, esetleg 500 μ M G-penicillin hidrolízisét követik spektrofotométerrel, és megállapítják az enzimaktivitást μ M antibiotikum/ perc/ standard sejt tömeg vagy mg fehérjemennyiség egységben megadva. Két-két antibiotikum egymáshoz viszonyított bontásának arányát (cefazolin/cephaloridin, nitrocefín/cephaloridin, nitrocefín/cefazolin, esetleg G-penicillin/cephaloridin) számítják ki, és ismert β -laktamáz típusú törzs β -laktamázának hidrolízis-profiljához hasonlítják (Kernodle, *et al.*, 1990, Zygmunt, *et al.*, 1992) (3. ábra).

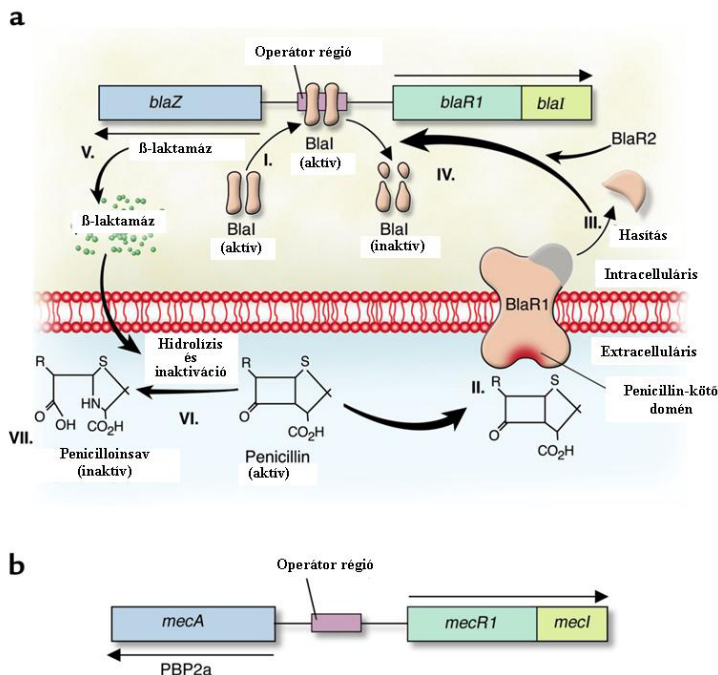
Az A, C és D típusú β -laktamázok génje általában plazmidon található, míg a B típusúaké kromoszómális lokalizációjú. Szekvenciájuk nagyon hasonló, pár aminosavnyi eltérés van csak közöttük, melyek közül a 128-as és 216-os aminosav-maradék mutációjával az enzimek átalakíthatók egymásba, vagyis például ha egy A típusú enzim 216-os aszparaginját szerinre cseréljük, az enzim kinetikai paraméterei megkülönböztethetetlenek lesznek a C típusú enzimétől, és a 128-as treonin alaninra való cseréjével az A típusú enzim átalakítható D típusúvá. Természetesen mindkét esetben a fordítottja is igaz, vagyis C és D típusú enzimből is készíthetünk ezen aminosavak cseréjével A típusút (Voladri, *et al.*, 1996).



3. ábra: β -laktamázok osztályozása szubsztráthidrolízis-profiljuk alapján (Kernodle, *et al.*, 1990).

A β -laktamázok termelése kétkomponensű rendszer segítségével szabályozódik. A törzsek többsége indukció nélkül is termel β -laktamázt, de indukció hatására a termelt mennyiség sokszorosára nőhet. A regulációért a 14 kDa-os BlaI (represszor) és a 69 kDa-os BlaR1 (transzmembrán szignál transzducer) felel. A *blaR1* és a *blaI* azonos promoterről íródik át, a *blaZ*-nek saját promotere van, az operátor régió közös, a két ellentétes irányú promóter között helyezkedik el. Az ellentétes irányba átíródó *blaR1* és *blaZ* között található két diadikus (kételemű szimetriát mutató) operátor régióhoz (R1 diad, -27 – -10 régió, Z diad -4 – +21 régió a *blaZ*-hez viszonyítva, mely +102-nél kezdődik) egy-egy represszor dimer kapcsolódik nem kooperatív módon, meggátolva a *blaZ* és a *blaR1* átírását. β -laktámok kötődése a BlaR1 extracelluláris szenzor doménjéhez autokatalitikus hasításhoz vezet, aktiválva a citoplazmatikus cink metalloproteáz domént. Az így aktivált BlaR1 ezután direkt vagy indirekt módon, egy eddig ismeretlen kofaktor (BlaR2) segítségével hasítja a BlaI represszort, ami nem tud többé kötődni az operátorokhoz, lehetővé téve így az operon átírását (4. ábra) (Thumanu, *et al.*, 2006).

A *mecA* hasonlóan regulálódik, csak ott MecI és MecR1 a neve a represszornak és a transzmembrán szenzornak (4. ábra). Két-két MecI szintén dimerként kötődik két kettős szimetriát mutató operátor régióhoz a *mecA* előtt.



4. ábra: A BlaZ expressziójának szabályozása (a) és a PBP2a operon szerkezete (b) (Lowy, 2003).

A *blaZ* és *mecA* szabályozása keresztreakciót mutat, vagyis represszoraik, a BlaI és MecI a másik operont is képesek gátolni, ugyanahhoz a régióhoz kötődve, ellenben a transzmembrán szenzorok csak a saját operonjukra hatnak (McKinney, *et al.*, 2001). A *mecA* indukciója sokkal lassabb, percek helyett órákat vesz igénybe, ami akár a sejt pusztulását is okozhatja. Valószínűleg ezt elkerülendő sokszor a szabályozási rendszer nem is működik az MRSA törzsekben.

2.4.4. A borderline methicillin- vagy oxacillin-rezisztencia

A borderline oxacillin-rezisztens törzsek rezisztensek penicillin G-re (penicillin G MIC \geq 64 μ g/ml), az oxacillin MIC értékük pedig a 2001 előtt izolált törzsekre 1 és 2, a 2001 után izolált törzsekre 2 és 4 μ g/ml közé esik. Újabbán a mind rezisztensebb törzsek megjelenésével a CLSI nem is különíti el ezt a csoportot, és az érzékeny és rezisztens törzsek közötti választóvonalat képező MIC érték is egyre emelkedik (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2011).

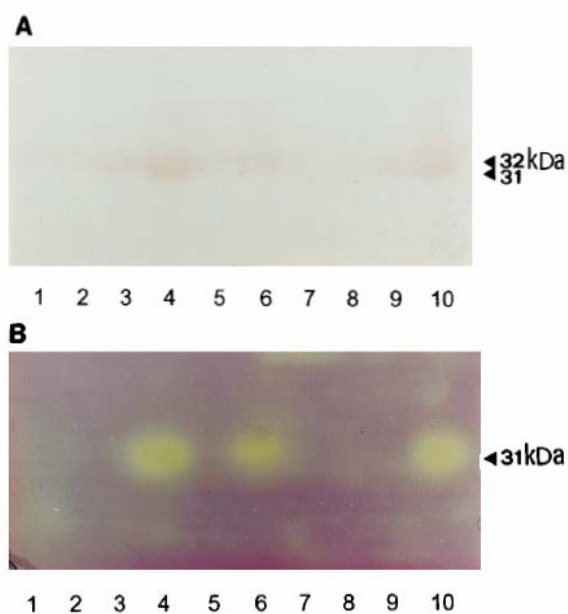
A borderline methicillin- vagy oxacillin-rezisztens törzsek nagyobb fokú rezisztenciájának több oka is lehet (Brown, 2001):

1. nagy mennyiségű penicillináz termelése: a törzs nagy mennyiségben termeli a BlaZ fehérjét
2. módosult PBP-k termelése: valamelyik, bármely *Staphylococcus aureus* törzsben meglévő PBP mutációval alacsonyabb antibiotikum-kötőképessévé válik, pl. PBP2. Általában

mind a PBP1 és PBP2 módosul, és a törzs megnövekedett mértékben termeli a PBP4 fehérjét (Berger-Bächi, *et al.*, 2009). Ilyen törzsek előállíthatók érzékeny törzsekből is, egyre növekvő antibiotikum koncentrációval történő szelektálással, de antibiotikum hiányában könnyen elveszítik ezt a képességet, mivel a megnövekedett antibiotikum-rezisztencia lassabb növekedéssel jár együtt, és ezek a lassan növekvő sejtek kisselektálódnak antibiotikum hiányában.

3. *mecA* hordozása: ezeknél a törzseknél az expresszió nagyon heterogén, a sejtpopuláció igen kis részében fejeződik ki nagyobb fokú rezisztencia. Ezeknél a törzseknél auxiliary gének tűnnek felelősnek a fenotípus kialakulásáért (Resende & Figueiredo, 1997). Sok szerző ezeket a törzseket nem is tekinti borderline methicillin-rezisztensnek a PBP2a termelése miatt.

Az emelkedett MIC-ért legtöbbször nagy mennyiségű β -laktamáz termelése a felelős, de az oxacillin MIC emelkedéséhez nem elég a β -laktamáz génjét bejuttatni egy érzékeny törzsbe, és ott túltermeltetni azt (Barg, *et al.*, 1991). A *blaZ*-t hordozó 17,2 kD pBW15 plazmid transzformálásával csak a 94/96 (V.) fágcsoportba tartozó törzsek tehetők borderline oxacillin rezisztenssé. Ha a plazmidot elveszti a törzs, akkor érzékennyé válik a penicillináz-rezisztens penicillinekre (PRP-kre), vagyis a plazmidon jelen kell lennie a megnövekedett rezisztenciáért felelős faktor génjének (Barg, *et al.*, 1991).



5. ábra: β -laktamáz aktivitás detektálása öt *S. aureus* törzs membránjában SDS-PAGE-t követő renaturálással és az enzimaktivitás detektálásával a kromogénikus cefalosporinok nitrocefin (A) és PADAC (B) szubsztrátként való alkalmazásával. Sávok: 1, 3, 5, 7, 9, a90, a3, a28, a40, a56, nem indukált; 2, 4, 6, 8, 10, ugyanezek a törzsek 0,5 μ g/ml methicillin jelenlétében tenyésztve (Massidda, *et al.*, 1996).

Egy olasz kutatócsoport kimutatta, hogy methicillin indukció hatására az általuk vizsgált törzsek membránjában a *BlaZ* mellett (32 kDa) megjelent egy kisebb, 31 kDa molekulatömegű enzim (Massidda, *et al.*, 1992, Massidda, *et al.*, 1996). Ez a nitrocefin és a penicillin mellett hidrolizálta a methicillint, oxacillint és a PADAC-ot is (a nitrocefin és a PADAC is színes

cefalosporin származék, mely kiváló β -laktamáz jelenlétének kimutatására, mivel ha a β -laktamáz hidrolizálja, akkor megváltozik a színe sárgáról pirosra, illetve sötétliláról sárgára). Úgy gondolták, hogy ez valószínűleg egy új, a BORSA törzsekre specifikus methicillináz enzim (5. ábra).

Ezt a feltevésüket megerősítette, hogy a *blaZ*-t hordozó plazmidot transzformálva *Escherichia coli*-ba, a transzformált törzs által termelt β -laktamáz nem hidrolizálta a PRP-ket, vagyis vagy amiatt, hogy csakúgy, mint a nem V. fágcsoportba tartozó *Staphylococcus aureus* törzsek esetében, az *E. coli* esetében is genetikai háttéré különbözősége miatt nem fejeződik ki a borderline methicillin-rezisztenciát kialakító faktor, vagy ez a faktor mégsem a *blaZ*-t hordozó plazmidon található (Massidda, *et al.*, 1994). Azt feltételezték, hogy ez az új enzim a BlaR1 mutációjával keletkezhetett, de biztosat nem tudtak a mibenléte felől (Massidda, *et al.*, 1996). A mi célunk pedig éppen ez volt, hogy azonosítsuk, milyen β -laktamáz aktivitású molekulákkal is rendelkeznek a borderline methicillin-rezisztens törzsek.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Vizsgált baktérium törzsek

3.1.1. Humán eredetű törzsek

A törzsek a Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum (DE OEC) Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet (korábban Gyógyszertani Intézet) humán beteganyagból származó törzsgyűjteményébe tartozó törzsek és referencia törzsek (3. táblázat). A referencia törzsek Dr. Douglas S. Kernodle-től (Vanderbilt University, Nashville, Tennessee, USA) származnak. Az 56, humán mintából izolált törzset (52 *Staphylococcus aureus*, 4 *Staphylococcus epidermidis*) a DE OEC Microbiológiai Intézet azonosította és bocsátotta a Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet rendelkezésére. Két törzs (a36 és a53) az Institute of Microbiology, University of Ancona Medical School, Italy gyűjteményéből származik, szintén klinikai izolátumok, melyeket Dr. Orietta Massida közbenjárására Dr. Marina Mingoia-tól kaptunk.

Korábbi kísérletek során az összes törzs penicillin, methicillin és oxacillin MIC értékét meghatároztuk önállóan és szulbaktámmal illetve klavulánsavval kombinációban makrodilúciós technikával (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2000). Ez alapján öt törzsről állapítottuk meg, hogy BORSA törzs, a 4. táblázatban ezeknek az oxacillin MIC-eit tüntettem fel (és a két Olaszországból kapott törzsét).

További klinikai izolátumokat kaptunk Dr. Rozgonyi Ferenctől (Semmelweis Egyetem, Orvosi Mikrobiológiai Intézet, Budapest), két *Staphylococcus aureus* és négy *Staphylococcus epidermidis* törzset. A törzseket az alábbi módszerek segítségével jellemezték:

- 1) Oxacillin érzékenység meghatározás korongdiffúziós teszttel (1 µg oxacillin). Az érzékeny törzsek esetén a kioltási zóna >13 mm, intermedier (átmeneti) rezisztenciájú törzseknél 11-12 mm, míg a rezisztens törzsek esetében <10 mm.
- 2) A *mecA* kimutatása PCR-ral történt (Hedin & Lofdahl, 1993, Bignardi, *et al.*, 1996).

3. Táblázat: A kísérletbe bevont klinikai izolátumok és referencia törzsek. Az S. e. rövidítés *Staphylococcus epidermidis*-t jelöl.

törzs	származás	törzs	származás	törzs	származás
NCTC 9789	referencia	S. e. 2292	klinikai	S. e. 1665	klinikai
ST 79741 (97741)	referencia	S. e. 2209	klinikai	760	klinikai
22260	referencia	279 CNS	klinikai	168	klinikai
DK 3177 (SR 177)	referencia	S. e. 2419	klinikai	13820	klinikai
PC1	referencia	2339	klinikai	13851/2	klinikai
VU94	referencia	1931/2	klinikai	13975	klinikai
RN9	referencia	1744/2	klinikai	14007	klinikai
FAR 10	referencia	9784	klinikai	14036	klinikai
FAR 8	referencia	9800	klinikai	14045	klinikai
a36	klinikai	9847	klinikai	14055	klinikai
a53	klinikai	9989	klinikai	14081	klinikai
822	klinikai	10129	klinikai	14086	klinikai
3621	klinikai	10182/3	klinikai	14090/2	klinikai
14498	klinikai	10236	klinikai	14093/3	klinikai
14054	klinikai	10243	klinikai	14136	klinikai
14057/1	klinikai	10278/1	klinikai	14287/1	klinikai
9584	klinikai	10375	klinikai	14287/2	klinikai
9624	klinikai	10506	klinikai	14460/1	klinikai
9720	klinikai	10530	klinikai	14510	klinikai
9722	klinikai	10590	klinikai	110003	klinikai
176	klinikai	222	klinikai	2294	klinikai

4. Táblázat: A borderline methicillin-rezisztensként besorolt klinikai izolátumok MIC értékei oxacillinre és oxacillinre β -laktamáz gátlókkal kombinációban meghatározva.

törzs	oxacillin MIC ($\mu\text{g/ml}$)	oxacillin + klavulánsav MIC ($\mu\text{g/ml}$)	oxacillin + szulbaktám MIC ($\mu\text{g/ml}$)
VU94	2	0,5	0,5
822	2	2	<0,25
9800	1	0,5	<0,25
9989	1	1	0,5
14287/1	2	1	0,5
a36	1	<0,25	<0,25
a53	2	<0,25	<0,25

5. Táblázat: Emberi beteganyagból származó törzsek Dr. Rozgonyi Ferenc gyűjteményéből. Az S. e. rövidítés *Staphylococcus epidermidis*-t jelöl.

törzs	származás	kioltási gyűrű Ø (mm) (1 µg oxacillin)	<i>mecA</i>
9194	klinikai	12	-
31171	klinikai	11	-
S. e. 19460	klinikai	11	-
S. e. 20377	klinikai	10	-
S. e. 18989	klinikai	11	-
S. e. 18402	klinikai	11	-

3.1.2. Állati eredetű törzsek

Az állati fertőzésekből illetve élelmiszerből izolált törzseket az Országos Állategészségügyi Intézetől (OÁI, Budapest) kaptuk (Kaszanyitzky, *et al.*, 2002). 1921 törzs közül választották ki azt a 28-at, melyek *mecA* negatívak voltak és korongdiffúzióval és E-teszttel vizsgálva kevésbé voltak érzékenyek penicillinre és/vagy oxacillinre (6. táblázat). A törzsek jellemzését izolálásuk és *Staphylococcus aureus*-ként való besorolásuk után a következő módszerekkel végezték el az Országos Állategészségügyi Intézet munkatársai:

- 3) A törzsek antibiotikum-érzékenységének meghatározását korongdiffúziós teszttel végezték a CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, korábban NCCLS = National Committee on Clinical Laboratory Standards) irányelvei szerint:
 - a) Penicillinre történő érzékenység meghatározáskor a korong 10 U penicillint tartalmazott (1 U megfelel 0,6 µg penicillin G penicillin-aktivitásának). Rezisztens törzsek esetén a kioltási zóna <28 mm, érzékeny törzsek esetén >29 mm.
 - b) Oxacillinre történő érzékenység meghatározáskor a korong 1 µg/ml oxacillint tartalmazott. Az érzékeny törzsek esetén a kioltási zóna >13 mm, intermedier (átmeneti) rezisztenciájú törzseknél 11-12 mm, míg a rezisztens törzsek esetében <10 mm.
- 4) E-teszt: a tesztcsík egy antibiotikum (itt: oxacillin) felezőhígításos léptékű koncentráció-sorozatát tartalmazza. Ahol a gátlási zóna eléri a tesztcsíkot, az az érték adja meg az adott törzs oxacillin MIC-ét.
- 5) A *mecA* kimutatása PCR-ral történt (Jaffe, *et al.*, 2000).

6. Táblázat: Az általam vizsgált 28 törzs az Országos Állategészségügyi Intézet által meghatározott jellemzői.

törzsek	forrás	kioltási gyűrű Ø (mm) (10 U penicillin)	kioltási gyűrű Ø (mm) (1 µg oxacillin)	oxacillin MIC E-teszttel (µg/ml)	<i>mecA</i>
13218/216	tehén tőgygyulladás	12	11	1,5	-
13218/255	tehén tőgygyulladás	13	10	1,5	-
16391/4091	tehéntej	16	13	0,38	-
16391/4094	tehéntej	23	13	0,5	-
16391/4241	tehéntej	25	13	0,25	-
15884/156	tehén tőgygyulladás	28	9	4/ 0,5	-
15884/197	tehén tőgygyulladás	30	15	3/ 0,5	-
15884/206	tehén tőgygyulladás	23	13	1,5/ 0,38	-
17052/11	tehén tőgygyulladás	11	10	3	-
17052/81	tehén tőgygyulladás	14	14	1	-
17766/78	tehén tőgygyulladás	15	12	1	-
17766/87	tehén tőgygyulladás	15	11	1,5	-
19599/3A	tehén tőgygyulladás	11	9	1,5	-
19599/3B	tehén tőgygyulladás	11	9	1,5	-
2461/1457	sertés kolbász	9	13	0,5	-
2986/416	sertés kolbász	0	14	0,5	-
14452/2199	sertés kolbász	13	15	0,25	-
16391/3811	sertés kolbász	15	15	0,25	-
7789/2	tehén tőgygyulladás	15	6/7	4/3	-
7789/39	tehén tőgygyulladás	18	6/8	6/3	-
7789/47	tehén tőgygyulladás	16	10	2	-
7789/57	tehén tőgygyulladás	16	10/12	1,5	-
7789/84	tehén tőgygyulladás	17	8	2	-
7789/98	tehén tőgygyulladás	15	7	3	-
7789/109	tehén tőgygyulladás	17	8	3/2	-
7789/110	tehén tőgygyulladás	15	9/12	2/1,5	-
7789/132	tehén tőgygyulladás	18	11/11	2/1,5	-
7789/138	tehén tőgygyulladás	18	12	3	-

A saját vizsgálatainkat négy szarvasmarha tőgygyulladásból izolált *Staphylococcus aureus* törzsön végeztük, amelyeket makrodilúciós MIC meghatározás segítségével a kapott 28 törzs közül választottunk ki.

3.2. Makrodilúciós MIC meghatározás

A makrodilúciós MIC meghatározást a CLSI irányelvei szerint végeztük (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2000). Mivel munkánk Orietta Massida és munkatársai kísérleteinek a folytatása, ezért a törzsek borderline methicillin-rezisztensként

való besorolásakor az ő kísérleteik során alkalmazott kritériumrendszert alkalmaztuk (oxacillin MIC 1-2 µg/ml, mely β-laktamáz gátló hatására 1 µg/ml alá csökken).

A törzseket 2% NaCl-dal kiegészített Mueller-Hinton (MH) tápfolyadékban (Oxoid, Basingstoke) tenyésztettük 35 °C-on, egy éjszakán át. (A Mueller-Hinton tápfolyadék 5 g/l húskivonatot, 17,5 g/l kazeint és 2 g/l glükózt tartalmaz, pH 7,4.) A tenyészetet 10⁶ CFU/ml sűrűségűre hígítottuk, ebből a baktérium-szuszpenzióból mértünk 200 µl-t minden csöbe (a végtérfogat 2 ml lévén ez 10⁵ CFU/ml kezdeti sejtsűrűséget jelent). Az egyes antibiotikumokra a MIC értéket 128 µg/ml-től 0,25 µg/ml-ig vizsgáltuk felezőhígításos sorban, kombinációs meghatározáskor kiegészítve 5 µg/ml klavulánsavval illetve 20 µg/ml szulbaktámmal. Az antibiotikumok hígítását és a meghatározást is 2% NaCl-dal kiegészített MH tápfolyadékban végeztük. Amelyik csöben már nem tapasztaltunk növekedést 24 illetve 48 óra után, azt tekintettük a törzs MIC-ének az adott antibiotikumra illetve antibiotikum kombinációra vonatkozóan.

A tenyészet sűrűségének beállításakor a CLSI kritériumainak megfelelően 0,5 McFarland oldat opálosságához viszonyítottuk a tenyészetet. A 0,5 McFarland oldat 0,5 rész 1% (0,048 M) BaCl₂ oldata 99,5 rész 1% (0,18 M) kénsavban, opálossága megfelel 1,5×10⁸ CFU/ml sejtsűrűségnek.

3.3. PBP2a termelés kimutatása

A humán törzsgyűjtemény esetében közvetlenül a PBP2a termelését mutattuk ki latex agglutinációs teszttel (PBP2a latex agglutination test, Oxoid, Basingstoke, UK), majd néhány törzs esetében a *mecA* jelenlétét illetve hiányát PCR-rel is megerősítettük (Dr. Ghidán Ágoston segítségével).

A PBP2a kimutatásához PBP2a elleni monoklonális antitesttel szenzitizált teszt latexet, a fals pozitív eredmények kizárásához az előbbi antitesttel azonos IgG alosztályba tartozó, de a *S. aureus* fehérjével reakciót nem adó monoklonális antitesttel szenzitizált kontroll latexet alkalmaz a kit.

A meghatározás kivitelezése a gyártó leírása alapján történt. A törzseket 4 ml MH tápfolyadékba oltottuk le először, és 36°C-on 24 óráig tenyésztettük. A tenyészetből szintén MH tápfolyadékban 1 McFarland opálosságú baktérium szuszpenziót készítettünk (3×10⁸ CFU/ml sejtsűrűségnek felel meg), majd 200 µl-t 2% NaCl-ot tartalmazó MH agarra szélesztettük (MH tápfolyadék kiegészítve 17 g/l agarral), és a táptalaj közepére felhelyeztünk

egy 1 µg oxacillint tartalmazó korongot (Oxoid, Basingstoke, UK). A törzseket 37 °C-on növesztettük 24 óráig, majd egy-egy 1,5 ml-es Eppendorf-csőben egy-egy 5 µl-es kacsnyi (kb. $1,5 \times 10^9$ CFU/ml), az oxacillin koronghoz legközelebb eső területről lekapart sejtet összekevertünk 4 csepp Extraction Reagent 1-gyel. A mintákat 3 percig forraltuk, majd lehűtöttük szobahőmérsékletűre, hozzáadtunk 1 csepp Extraction Reagent 2-t, és alapos összekeverés után centrifugáltuk $1500 \times g$ -vel. A teszthez a felülúszót használtuk. 50-50 µl felülúszót kicsöpöpentettünk a kithez mellékelt sötét hátteret biztosító lapocskák körrel jelölt részére, és az egyik mintához 1 csepp Test Latex-et, a másikkhoz 1 csepp Control Latex-et csöpöpentettünk. Három perc várakozás után a kicsapódás illetve az összecsapódás hiánya alapján megállapítottuk, hogy termel-e az adott törzs PBP2a-t. Akkor értékeltük pozitívként az eredményt, ha összecsapódást csak a Test Latex-szel összekevert mintában tapasztaltunk, de a Control Latex-szel összekevert mintában nem, negatívként pedig akkor, ha sehol sem tapasztaltunk kicsapódást. A módszer ellenőrzésére kontroll törzsekkel is elvégeztük a kimutatást, vagyis olyan törzsekkel, melyekről biztosan tudtuk, hogy PBP2a-t termelnek, vagy éppen nem termelnek. Az alkalmazott negatív kontroll törzs az ATCC 25923 volt, pozitív kontrollként az 1931/2 törzset alkalmaztuk.

Az 1 McFarland oldat összetétele: 1 rész 1% (0,048 M) $BaCl_2$ és 99 rész 1% (0,18 M) H_2SO_4 .

A törzsekben a *mecA* jelenlétének kimutatása PCR-ral történt (Dr. Ghidán Ágoston, Semmelweis Egyetem, Orvosi Mikrobiológiai Intézet, Budapest) (Hedin & Lofdahl, 1993, Bignardi, *et al.*, 1996). Az alkalmazott primer párok:

5`- CTCAGGTAAGTCTATCCACC -3`

5`- CACTTGGTATATCTTCACC -3`

A gén megléte esetén egy 449 bp-nyi DNS fragment volt detektálható.

3.4. Fágtypizálás

A fágtypizálás a debreceni Állami Népegészségügyi és Tisztiorvosi Szolgálat (ÁNTSZ) nemzetközi fágSOROZATÁVAL történt, a helyi fágLABOR (SZTROJ Taiszija munkacsoportja) kivitelezésében. A typizálást két hígítással végezték a protokollnak megfelelően: standard teszthígítással (RTD – routine test dilution, rutin tesztelő hígítás = 1 munkadózis: az a hígítás, amelynél a fág összefolyó lízist okoz a kijelölt fenntartó törzsben) és $100 \times$ -os töménységű rutin teszthígítással (= 100 munkadózis) (Blair & Williams, 1961).

A felhasznált fágcsoportok:

- I. fágcsoport: 29, 52, 52A, 79, 80
- II. fágcsoport: 3A, 3C, 55, 71
- III. fágcsoport: 6, 42E, 47, 53, 54, 75, 77, 83A, 84, 85
- IV. fágcsoport: 42D
- V. fágcsoport: 94, 96
- Vegyes fágcsoport: 81, 95, 187
- MRSA fágok: 616, 617, 618, 620, 622, 623, 625, 626, 629, 630
- Bovin fágok: 116, 102, 107, 117, 118, 119, Ae1, 78

3.5. Oxacillináz aktivitás meghatározása biológiai titrálással

A titráláshoz használt táptalaj összetétele a következő:

- 5 g/l húskivonat
- 1 g/l Na₂HPO₄
- 0,1 g/l KH₂PO₄
- 0,5 g/l pepton
- 15 g/l agar

Egy titráló tálcába 100 ml felolvasztott steril táptalajt mértünk, amihez előzőleg kézmeleg állapotban 100 µl *Bacillus subtilis* ATCC 6633 szuszpenziót adtunk. A táptalaj vastagsága a tálcában kb. 0,3 cm volt. A táptalaj dermedése után sablon segítségével egyenletes távolságokban 1 cm átmérőjű lyukakat fűrtünk az agarba.

A lyukak egy részébe 50 µl minta (membrán szuszpenzió vagy fermentlé) és 50 µl 80 µg/ml koncentrációjú oxacillin oldat 30 percig 37°C-on előinkubált elegye került.

A kontroll lyukakba 50 µl minta és Na-foszfát puffer szintén 30 percig előinkubált elegye került, míg a lyukak harmadik csoportjába 100 µl 10, 20, 40, és 80 µg/ml koncentrációjú oxacillin oldatot mértünk: ezek alapján állítottuk fel a kalibrációs görbét.

A kiértékelést 24 órás, 37°C-on történő inkubálás után végeztük a kioltási gyűrűk tolmérővel való lemérése segítségével.

3.6. Felhasznált antibiotikumok és szubsztrátok

A következő vegyületeket alkalmaztuk kísérleteinkben: methicillin (Bristol Laboratórium, Párizs, Franciaország), penicillin G (TEVA, Debrecen, Magyarország), oxacillin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), cefaloridin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), cefamandol (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), cefoperazon (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), klavulánsav (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), szulbaktám (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), nitrocefin (Oxoid, Basingstoke, UK), lizozim (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).

3.7. A minták előkészítése

3.7.1. A törzsek tenyésztése

A törzsek tenyésztését 1%-os, pH 7,4 CY (casein-yeast – kazein-élesztőkivonat) táptalajban végeztük. A táptalaj összetétele a következő:

- 0,001 M $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 0,028 M glükóz
- 1% élesztő kivonat
- 1% kazein
- 0,02 ml/l nyomelem oldat (0,5% CuSO_4 , 0,5% ZnSO_4 , 0,5% FeSO_4 , 0,2% MnCl_2 , 10% HCl)
- 16,3 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$
- 3,3 g/l $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- 0,5 $\mu\text{g/ml}$ methicillin, amit a táptalaj sterilizése után adunk hozzá steril szűrőn átszűrve

A tenyésztés során azért tartottuk megfelelőbbnek a táptalaj Na-foszfát pufferrel való pufferolását, mert így nagyobb a membránkött enzimek aránya, és kevesebb extracelluláris enzim kötődik specifikusan a sejtfalhoz, mintha Tris-HCl puffert alkalmaztunk volna.

Először előinokulumot készítettünk, 4 ml tápfolyadékba oltottunk le kacsnyi baktériumot, majd 37°C-on 8 óráig inkubáltuk. Az inokulumhoz kb. 100-150-szeresére hígítottuk az előinokulumot (az előinokulum sűrűségétől függően), a tenyésztést egy éjszakán (16 h) át végeztük, 37°C-on történő rázatással.

3.7.2. A membrán izolálása

3.7.2.1. A membrán izolálása sorozatos centrifugálással

A sejteket centrifugálással összegyűjtöttük (1100 g), és 0,05 M Na-foszfát-pufferrel mostuk. A mosás után az üledéket 1 mg/ml lizozim tartalmú Na-foszfát-pufferben szuszpendáltuk, és 37°C-on 1-1,5 óráig inkubáltuk.

1100 g-n 10 percig centrifugálva az épen maradt sejtek leülepedtek, míg a protoplasztok és a sejtfaltörmelék a felülúszóban maradt. Az épen maradt protoplasztokat a felülúszó 27000 g-n 20 percig való centrifugálásával üleptítettük ki, majd 5 ml desztillált vízben felvettük, és 10 percig állni hagytuk, hogy kipukkanjanak. Ezután 2,5 mg/5 ml MgCl₂-ot és 0,45 mg/5 ml DNáz-t (Merck, Darmstadt, Németország) adtunk az oldathoz, és 37°C-on 1 órát inkubáltuk.

A nagyobb sejttörmelékeket 3000 g-n 10 perces centrifugálással üleptítettük ki: a citoplazma- és membránfrakció a felülúszóban maradt, amely 27000 g-s, 20 perces centrifugálásával nyert üledéke tartalmazta a membránt. Ezt az üledéket felvettük 1 ml bidesztillált vízben (ddH₂O), és háromszor mostuk, -20 °C-on tároltuk.

3.7.2.2. A membrán izolálása ultrahangos sejtfeltárással és sorozatos centrifugálással

Ha a fenti eljárással nem sikerült kielégítő mennyiségű membránt preparálni, akkor az összegyűjtött és mosott sejteket ultrahangos sejtfeltárással felvettük (Branson Sonifier 250, micro tip limit output control = 3; 50% duty cycle; jégen) és 10 percig centrifugáltuk 3000 g-vel 4°C-on a nagyméretű sejttörmelék eltávolítása végett. A sejtmembrán-frakciót a felülúszó 4°C-on történő 27000 g-s 20 perces centrifugálásával gyűjtöttük össze.

3.7.2.3. Sejtfeltárással X-Press-szel

Az a53 törzs nagyfokú lizozim-rezisztenciája miatt a membrán izolálása helyett a teljes sejt feltárással végezte el X-Press készülékkel (X 25, AB Biox, Göteborg, Svédország) Dr. Emri Tamás (DE TTK Mikrobiális Biotechnológiai és Sejtbiológiai Tanszék).

3.7.3. A fermentlé ultraszűrése

A fermentlé sterilre szűréséhez 0,45 µm pórusátmérőjű membránt (Millipore, Bedford, USA) használtunk, míg az ultraszűrést Diaflo PM10 (10 kDa molekulatömeg kizárású) illetve YM5 (5 kDa molekulatömeg kizárású) Amicon ultrafiltrációs membránnal (Millipore, Bedford, USA) végeztük 2 atmoszféra nyomású nitrogén gázzal, 4°C-on, állandó kevertetés mellett. A kiindulási térfogat 50 ml volt, ezt 3-5 ml-re tudtuk csökkenteni. Ha a fehérjetartalom alacsony volt, végső lépésben a mintát 1 ml-re töményítettük Centricon YM-3 (3 kDa molekulatömeg kizárású) szűrőegységekben (Millipore, Bedford, USA) való 6500 g-s centrifugálással.

3.7.4. A minták fehérjetartalmának meghatározása

A minták fehérjetartalmát a Coomassie Protein Assay Reagent-tel (Pierce) határoztuk meg. A kimutatás a Bradford eljárás alapján, azaz a Coomassie Brilliant Blue G-250 oldat savas közegben fehérjékkel kék színű komplexet képez. Az abszorbancia változása arányos a minta fehérjetartalmával és 595 nm-en mérhető.

A fermentlé fehérjetartalmának meghatározására a standard teszt cső protokollt (100-1500 µg/ml), az izolált membránfrakciók esetében a mikro teszt cső protokollt (1-25 µg/ml) alkalmaztuk. A standard protokoll esetében 100 µl mintához adtunk 5 ml reagenst, míg a mikro protokoll alkalmazásakor 1 ml mintához adtunk 1 ml reagenst. Az utóbbi esetben a membránfrakciók 1000× hígításával dolgoztunk. A minták fehérjetartalmát BSA (bovine serum albumin) hígítási sorozat alapján állapítottuk meg.

3.8 β-laktamázok detektálása egydimenziós (1-D) és kétdimenziós (2-D) SDS-PAGE segítségével és azonosításuk tömegspektrometriával

3.8.1. 1-D SDS-PAGE és a β-laktamázok detektálása

3.8.1.1. 1-D SDS-PAGE, Laemmli-szerinti elrendezésben

Az SDS-poliakrilamid gélelektroforézis során a Laemmli által leírt módszer szerint jártunk el (Laemmli, 1970).

A fehérjék elválasztását nem folytonos pufferrendszerben végeztük. Az alsó, szeparáló gél 8,8-as pH-jú, 375 mM tris(hidroximetil)amino metán (Tris) oldatot tartalmazott, és a 29,1% akrilamidból és 0,9% N,N'-metilén-biszakrilamidból összetevődő akrilamid törzsoldatból 13%-ot. A felső, tömörítő gél 6,8-as pH-jú 125 mM Tris oldatot, és 5% akrilamid törzsoldatot tartalmazott. Mindkét gélben volt még 0,1% SDS, 0,1% ammónium-perszulfát, és a szeparáló gél esetében 0,05%, míg a tömörítő gél esetén 0,1% N,N,N',N'-tetrametil-etiléndiamin (TEMED) oldat. Az SDS feladata a fehérjék egyenletes negatív töltéssel való bevonása, az ammónium-perszulfát szabadgyököket generál, elősegítve az akrilamid polimerizációját, a TEMED pedig stabilizálja ezeket a gyököket.

A minták felvitele a felső géllal megegyező pH-jú és Tris koncentrációjú minta pufferben történt, mely 20% glicerint, 4% SDS-t, 10% 2-merkaptotanol és 0,002% brómfenolkéket tartalmazott, és amelyet a fehérje vizes oldatához a vele megegyező térfogatban adtunk.

Alacsony fehérjetartalmú (nagy térfogatú) minták esetén a mintákat 30 percig jégen együtt inkubáltuk azonos térfogatú 20%-os acetonnal 1:1 arányban hígított TCA-val, majd a kicsapódott fehérjéket mostuk alkohol és éter 1:1 arányú elegyével. Ezután vagy kis térfogatú (10 – 30 µl) 0,1 N NaOH-val feloldottuk a csapadékot, és az előbb leírt minta puffert adtuk hozzá, vagy úgynevezett „cracking” minta pufferrel (50 mM Tris-HCl, pH 6,8, 1% SDS, 15% glicerol, 1% β-merkaptotanol, 0,05% brómfenolkék) közvetlenül végeztük el a fehérjék oldatba vitelét.

A minták fehérjetartalma kb. 100 µg volt. A mintákat maximum 5 percig együtt forraltuk a minta pufferrel, hogy az SDS kötődése hatékonyabban végbemenjen.

A futtatást 25 mM Tris, 200 mM glicin és 1% SDS tartalmú, 8,3 pH-jú elektroforézis pufferben végeztük, 30 mA folyamatos árammal, kb. 2 óráig hűtött körülmények között vagy 200 V állandó feszültség mellett kb. 50 percig előhűtött elektroforézis pufferrel (a gél mérettől illetve a rendelkezésre álló készüléktől függően). A gélt ezután vagy megfestettük Coomassie Brilliant Blue R-250-et tartalmazó festőoldattal, vagy regeneráltuk.

3.8.1.2. A fehérjék detektálása, és molekulásúly szerinti azonosítása

Az elektroforézis után az egyik gélt megfestettük 2,5% Coomassie Brilliant Blue (CBB) R-250-et, 40 % metanolt és 7 % ecetsavat tartalmazó oldattal, majd a csak metanolt és ecetsavat tartalmazó differenciáló oldattal kimostuk a felesleges festéket.

A fehérjék molekulásúlyának meghatározására kétféle molekulatömeg standard-et használtunk kísérleteink során:

Boad range molecular weight standards-t (széles molekulatömeg tartományú standard, Amersham Biosciences, Piscataway, USA). A standard sávjainak méretei: 205 kDa, 116 kDa, 97 kDa, 80 kDa, 66 kDa, 55 kDa, 45 kDa, 30 kDa, 21 kDa, 14 kDa és 6,5 kDa. Mivel 13 %-os gélben dolgoztunk, ezért a standard első két sávját nem vettük figyelembe a standard görbe felállításánál, ugyanis 97 kDa felett az elválasztás nem arányos a molekulatömeggel.

Rainbow coloured protein molecular weight marker-t, low molecular weight range (Rainbow színes fehérje molekula tömeg marker, alacsony molekula tömeg tartomány, Amersham Biosciences, Piscataway, USA), a sávok: 45000 Da, sárga; 30000 Da, narancssárga; 20100 Da, kék; 14300 Da, magenta; 6500Da, kékesfekete; 3500 Da, kék; 2500 Da, kék.

A β -laktamázok molekulatömegét úgy határoztuk meg, hogy a gélt először regeneráltuk, az enzimaktivitást detektáltuk nitrocefínnel, az így detektált sávokat megjelöltük, és ezután a géleket megfestettük.

3.8.1.3. A gélben elválasztott β -laktamázok regenerálása, és a β -laktamáz aktivitás detektálása

Ahhoz, hogy az SDS-sel denaturált fehérjék visszanyerjék eredeti szerkezetüket, és vele aktivitásukat, 37°C-on 6 óráig inkubáltuk a gélt 0,1 mM $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -t és 1% Triton X-100-at tartalmazó 0,01 M, pH 7 Na-foszfát pufferben. A Triton X-100 kiszorítja az SDS-t a fehérjék környezetéből, a cink-szulfát pedig a fehérjék helybenntartásáról gondoskodik (Massidda, *et al.*, 1991).

A renaturált fehérjéket tartalmazó géltre 1% agarózt és 100 $\mu\text{g/ml}$ nitrocefint tartalmazó gélt rétegeztünk.

3.8.2. Kétdimenziós gél elektroforézis (2-D PAGE)

A kétdimenziós gél elektroforézissel a fehérjéket nem csak molekulatömegük, hanem izoelektromos pontjuk szerint is elválasztjuk, így jobb felbontást kapunk a géleken.

A folyamat során a mintát először felvisszük a megfelelő hosszúságú és pH tartományú IEF gélcsikra (izoelektromos fókuszáló gélcsík vagy strip: előre gyártott műanyagcsíkok, melyekre akrilamid gél van polimerizálva; a gélben amfolittal pH gradienst alakítanak ki a gyártás során), majd izoelektromosan fókuszáljuk. Ennek során a fehérjék izoelektromos pontjuk szerint válnak egymástól.

Ezután az IEF gélcsíkokat equilibráljuk, majd SDS-poliakrilamid gél tetejére helyezük. A gél elektroforézis során a már izoelektromos pontjuk szerint szétválasztott fehérjék molekula-tömegüknek megfelelően vándorolnak a poliakrilamid gélben.

3.8.2.1. Minta előkészítése 2-D gél elektroforézishez

A minta tisztítását és sómentesítését ReadyPrep 2-D Cleanup Kit segítségével (Biorad) végeztük. Mivel a fermentleveknél a jelenlévő DNS rontotta az elválasztás minőségét, ezért a mintákat a membránizolálásnál ismertetett módon DNS mentesítettük (2,5 mg /5 ml MgCl₂-ot és 0,45 mg /5 ml DNáz-t adtunk az oldathoz, és 37°C-on 1 óráig inkubáltuk), és ezután végeztük el a minta tisztítását. A folyamat során végig jégen dolgoztunk.

Maximum 100 µl mintát (1-500 µg fehérjetartalmú lehet: 7 cm-es IEF gélcsíkok esetében 100 µg, 17 cm-es IEF gélcsíkoknál 400 µg mennyiséget tisztítottunk meg, néha több csőben) 1,5 ml-es centrifuga csőbe pipettáztunk. A mintához 300 µl precipitating agent 1-et adtunk. Alaposan összekevertük és jégen inkubáltuk 15 percig. A mintához az inkubálás végén 300 µl precipitating agent 2-t adtunk, alaposan összekevertük, és 5 percig centrifugáltuk 12000 g-vel 4°C-on, majd eltávolítottuk a felülúszót. 40 µl wash reagent 1-et pipettáztunk a csapadékra, majd 5 percig centrifugáltuk 12000 g-n 4°C-on, és lepipettáztuk a folyadékot a csapadékról. 25 µl ultra tiszta vizet mértünk a csapadékra, és 10-20 másodpercig alaposan összekevertük. Hozzáértünk 1 ml -20°C-os wash 2-t, és hozzáadtunk még 5 µl wash 2 additive-t, és egy percig alaposan kevertük. 30 percig inkubáltuk -20°C-on, 10 percenként 30 másodpercig keverve a mintát. Az inkubáció után 5 percig 16000 g-vel centrifugáltuk.

Az ekkor fehér csapadékot maximum 5 percig szárítottuk szobahőmérsékleten, míg áttetszővé nem vált. Ezután feloldottuk a megfelelő térfogatú (7 cm-es IEF gélcsíkok esetében 125 µl) 2-D rehidráció mintá pufferben, legalább fél percig alaposan kevertük, majd szobahőmérsékleten inkubáltuk 3-5 percig, és 1 percig újra kevertük vagy pipettával szuszpendáltuk. A membránfehérjék vizsgálatakor a mintát 20-50 µl 2-D tiourea-t tartalmazó rehidráció mintá pufferben vettük fel. Végül a mintát 16000 g-vel 2-5 percig centrifugáltuk szobahőmérsékleten, a felülúszó volt a minta, ez -80°C-on tárolható.

2-D minta puffer összetétele az extracelluláris fehérjék vizsgálata esetén:

8 M urea, 2% CHAPS, 50 mM DTT, 0,2% Bio-Lyte 3/10 amfolit, 0,002% bromofenolkék

2-D minta puffer összetétele a membránkötött fehérjék vizsgálata esetén:

7 M urea, 2 M tiourea, 4% CHAPS, 50 mM DTT, 0,2% Bio-Lyte 3/10 amfolit, 0,002% bromofenolkék

3.8.2.2. Az IEF gélsíkok rehidrálása

Az IEF gélsíkok rehidrálása passzív módon történt minden esetben. A tisztított mintákat egy rehidráló tálca egy–egy vályújába pipettáztuk, ezután a -20°C -ról nem sokkal előbb kivett IPG IEF gélsíkokról (immobilizált pH gradiens izoelektromos fókuszáló gélsíkokról) csipesz segítségével lehúztuk a védőfóliát, majd a vályúba hasaltattuk. Ásványi olajat pipettáztunk minden vályúba, hogy az IEF gélsíkok ne száradhassanak ki. 16 órán keresztül állni hagytuk, hogy beszívja a mintát.

3.8.2.3. Izoelektromos fókuszálás (IEF)

Az izoelektromos fókuszáláshoz 7 cm-es, pH 3-10 IPG IEF gélsíkokat használtunk, melyeket az olaj leitatása után géllal lefelé áthelyeztünk a fókuszáló tálcára. Minden IEF gélsík alá ultra tiszta desztillált vízzel (ddH_2O) átitatott szűrőpapírsíkot helyeztünk az elektródokra, a kiszáradás elkerülése érdekében kb. 1,5 ml olajat pipettáztunk az IEF gélsíkokra, majd elindítottuk a fókuszálást.

Az IEF lépései az extracelluláris fehérjék vizsgálata esetén:

250 V, 20 perc (egyenletes feszültség emelés); 4000 V, 2 óra (egyenletes feszültség emelés); ezután 4000 V-on 10000 Vh (gyors feszültség emelés).

3.8.2.4. „Cup loading”

A cup loading egy módosított mintafelviteli technika IEF-hez, melyet kis pH tartományok, illetve rossz oldékonyságú fehérjék vizsgálatára fejlesztettek ki. Ebben az esetben a 7 cm-es pH 3-10 IEF gélsíkokat 135-135 μl , illetve a french press-el feltárt sejtek esetében a 17 cm-es pH 3-10 IEF gélsíkokat 330-330 μl mintát nem tartalmazó rehidráló pufferben rehidratáltuk kb. 16 órán át (egy éjszakán keresztül). Ez után az IEF gélsíkokat a rehidratálódott gélfelületükkel fölfelé a futtatótálcába helyeztük úgy, hogy az IEF gélsík pozitív vége a tálca anódja felé, negatív vége pedig a katódja felé nézzen, majd 4,2 mm széleségű, 8-10 μl ddH_2O -val megnedvesített papírdarabkákat tettünk az IEF gélsíkok végein a gélre, ide helyeztük fel a két elektródot úgy, hogy azok az IEF gélsíkokkal érintkezzenek. Ezt követően a mintatartó csészécskéket (cup) a gélre illesztettük közel az anódhoz, és belepipettáztuk a mintákat, amelyeket olajjal fedtünk le, végül az IEF gélsíkokat is olajjal borítottuk.

Az IEF lépései a membránkötött fehérjék vizsgálata esetén:

Klasszikus technika: 250 V 30 perc (gyors feszültség emelés), 4000 V, 2 óra (lassú feszültség emelés), ezután 4000 V-on 10000 Vh (gyors feszültség emelés).

Cup loading: 250 V 30 perc (gyors feszültség emelés), 10000 V, 2 óra (lassú feszültség emelés), ezután 10000 V-on 40000 Vh (gyors feszültség emelés).

3.8.2.5. Az IEF gélcsíkok (stripek) equilibrálása az IEF után

A fókuszálás után az IEF gélcsíkokról leittattuk az olajat, géllal felfelé befektettük egy rehidráló tálca egy-egy vályújába, majd 2,5-2,5 ml (17 cm-es IEF gélcsíknál 6-6 ml) equilibráló puffer I-t mértünk rájuk. 10 percig végeztük az equilibrálást, azután leöntöttük a folyadékot az IEF gélcsíkokról, és 2,5-2,5 ml (illetve 6-6 ml) equilibráló puffer II-t mértünk rájuk. Az equilibrálást ebben az esetben is 10-10 percig végeztük.

Az IEF gélcsíkokat egyenként 1x-es elektroforézis pufferbe mártottuk rövid időre, közben felolvasztottuk a fedő agarózt, és az equilibrálás végeztével rápipettáztuk az akrilamid gél tetejére, majd az IEF gélcsíkokat behelyeztük a fedő agarózba. Az agaróz megszilárdulása után elindítottuk a futtatást.

Equilibráló puffer I összetétele: 6 M urea, 2% SDS, 0,357 M Tris (pH 8,8), 20% glicerin, 2% DTT (a DTT-t mindig frissen adtuk hozzá).

Equilibráló puffer II összetétele: 6 M urea, 2% SDS, 0,357 M Tris (pH 8,8), 20% glicerin, 2,5% jódcetamid (ezt mindig frissen adtuk hozzá).

Fedő agaróz összetétele: 0,5% alacsony olvadáspontú agaróz oldva 25 mM Tris, 192 mM glicin, 0,1% SDS és nyomnyi bromofenol kék elegyében.

3.8.2.6. A gélek összetétele és a futtatás körülményei

Az SDS-poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE) során a Laemmli által leírt módszer szerint jártunk el. Az elválasztó és a tömörítő gél összetétele megegyezett a 3.8.1.1. pontban leírtakkal.

A futtatást szintén az előzőekben már leírt elektroforézis pufferben végeztük, 20 cm-es gélek esetén 30 mA/gél állandó áramerősséggel (kb. 6 óra), 7 cm-es gélek esetén állandó 200 V feszültséggel (kb. 50 perc).

3.8.2.7. Az enzimek regenerálása és a β -laktamáz aktivitás detektálása a gélben

Az SDS-PAGE (a második dimenzió) után a két párhuzamos gél közül az egyiket 8-10 órán át inkubáltuk 37°C-on a regeneráló oldatban, majd regenerálás után 1 mg/ml koncentrációjú nitrocefín oldattal detektáltuk az enzimek elhelyezkedését a gélen, oly módon hogy nitrocefínbe mártott Whattman-papírcsíkot tettünk a gél megfelelő régiójára. A nitrocefín színváltozása (sárgából piros lett) alapján jól látható volt a β -laktamáz aktivitás. A másik gélt pedig megfestettük, és a regenerált gélen detektált enzimaktivitás segítségével azonosítottuk rajta a β -laktamáz aktivitású fehérjéket.

Regeneráló oldat összetétele: 1% Triton X-100 és 0,1 mM ZnSO₄ oldva 0,01 M pH 7,0 Na-foszfát pufferben.

3.8.2.8. A gélek festése

A gélek festését Coomassie Brilliant Blue (CBB) R-250 vagy CBB G-250 (Blue Silver, kolloidális Coomassie (Candiano, *et al.*, 2004)) festőoldattal kiviteleztek.

CBB R-250 festőoldat: 0,25% CBB R-250, 40% metanol, 7% ecetsav, előhívás a szintén 40% metanolt és 7% ecetsavat tartalmazó differenciálól oldattal történik.

Blue Silver festőoldat: 0,12% CBB G-250, 10% ammónium-szulfát, 10% foszforsav, 20% metanol, a differenciálás desztillált vízben történik.

3.8.3. Fehérjék tömegspektrometriás analízise

A fehérjék tömegspektrometriai analízisét Szegeden végezte Dr. Medzihradzky Folkl Katalin Proteomikai Kutatócsoportja (Magyar Tudományos Akadémia Szegedi Biológiai Központ) illetve a Kromat Kft. (ugyanott) munkatársai.

A fehérjék azonosítása MALDI-TOF (matrix assisted laser desorption ionization–time of flight) detektorral vagy LC-MS/MS (liquid chromatography–tandem mass spectrometry) elrendezésben történt (Birko, *et al.*, 2009).

3.9. β -laktamáz aktivitás mérése spektrofotometriásan

A β -laktamáz aktivitású fehérjék antibiotikumbontó képességének vizsgálatát Perkin-Elmer λ 12 UV/VIS termosztálható spektrofotométerrel végeztük. Ehhez hat különböző antibiotikum törzsoldatát használtuk fel, a paramétereiket a 7. táblázatban tüntettem fel:

7. Táblázat: A spektrofotometriás enzimaktivitás méréséhez felhasznált antibiotikumok és a mérés jellemző adatai.

antibiotikum	törzsoldat koncentrációja (mM)	hullámhossz (nm)	ϵ (mM ⁻¹ cm ⁻¹)
nitrocefín	0,11	486	16,7
oxacillin	1	260	0,45
penicillin G	0,1	233	0,94
cefaloridin	0,1	260	10,2
cefamandol	0,1	274	10,3
cefoperazon	0,1	273	9,0

A fotometrázás 37°C-on történt, minden esetben 10 percig követtük a reakciót. A vak 0,1 ml Na-foszfát-puffert (0,05 M, pH 7,0) és 0,9 ml törzsoldatot tartalmazott, a minta 0,1 ml enzimből (illetve 10 mg/ml lizozim törzsoldatból 0,1 ml) és 0,9 ml antibiotikum törzsoldatból állt. A nitrocefín kivételével mindegyik antibiotikum törzsoldatot tízszeres hígításban alkalmaztuk.

Az enzimaktivitást az alábbi képlet segítségével számoltuk ki:

$$\frac{dA}{dt} \times \frac{1000 \text{ l}}{\epsilon} \times \frac{V_s}{1000 \text{ l}} \times D_e$$

ahol:

dA: abszorpció változása

dt: idő változása

ϵ : extinkciós (abszorpciós) koefficiens

V_s : minta térfogata (ml)

D_e : enzim hígítása

4. EREDMÉNYEK

Több munkacsoport (Massidda, *et al.*, 1992, Massidda, *et al.*, 1996, Montanari, *et al.*, 1996, Gál, *et al.*, 2001) eredményei alapján feltételezhető volt, hogy a *Staphylococcus aureus* törzsek methicillin illetve oxacillin hidrolíziséért nem a már ismert penicillináz, a BlaZ a felelős, hanem egy másik, eddig még nem jellemzett enzim. Az enzim jelenlétét két borderline methicillin-rezisztens törzs esetében írták le. Az új enzim methicillin indukció hatására termelődött, és molekulatömege kissé eltért a BlaZ-jétől. Hogy azonosítsuk az oxacillin hidrolíziséért felelős enzimeket, humán betegek mintáiból, illetve állati fertőzésekből származó *S. aureus* törzseket gyűjtöttünk. A törzsek közül makrodilúciós MIC meghatározással kiválasztottuk a borderline methicillin-rezisztenseket, megállapítottuk a fajtípusukat, megvizsgáltuk az enzimtermelésüket, végül azonosítottuk β -laktamázaikat.

4.1. Az Országos Állategészségügyi Intézet és a Semmelweis Egyetem, Orvosi Mikrobiológiai Intézete által rendelkezésünkre bocsátott törzsek MIC meghatározása

Az izolátumok MIC meghatározását oxacillinre végeztük el, klavulánsavval illetve szulbaktámmal kombinációban is. A 8. táblázatban tüntettem fel a kapott értékeket, az inverz sorok mutatják a törzseket, melyeket borderline rezisztenseknek fogadtunk el.

4.2. A PBP2a termelés kimutatása

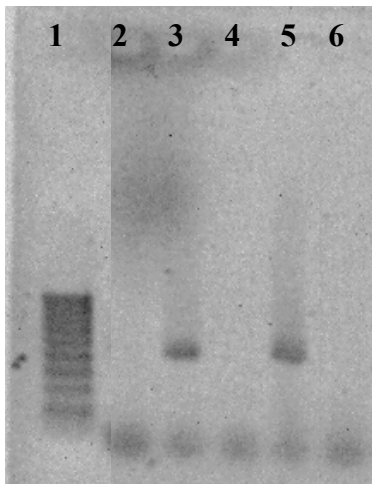
Az összes klinikai izolátum esetében elvégeztük a PBP2a kimutatását (9. táblázat). Az eredmények korreláltak a makrodilúciós MIC-ek alapján vártakkal, vagyis a methicillin- és oxacillin-rezisztens törzsek termeltek PBP2a-t, míg az érzékeny és borderline rezisztens törzsek nem. Ez alól csak egy kivétel volt, a 822-es törzs, melyet a MIC alapján a BORSA törzsek közé soroltunk, de PBP2a termelőnek bizonyult. Ebben az esetben PCR-rel is megerősítést nyert a *mecA* jelenléte (6. ábra).

8. Táblázat: Az Országos Állategészségügyi Intézet és Dr. Rozgonyi Ferenc által rendelkezésünkre bocsátott törzsek oxacillinre és β -laktamáz gátlókkal kombinációban meghatározott MIC értékei. A fekete alapon fehér betűkkel jelölt törzseket soroltam a borderline methicillin-rezisztensek közé.

törzsek	oxacillin ($\mu\text{g/ml}$)	oxacillin + klavulánsav ($\mu\text{g/ml}$)	oxacillin + szulbaktám ($\mu\text{g/ml}$)
13218/216	<0,25	<0,25	<0,25
13218/255	<0,25	<0,25	<0,25
16391/4091	<0,25	<0,25	<0,25
16391/4094	0,25	0,25	0,25
16391/4241	<0,25	<0,25	<0,25
15884/156	0,25	<0,25	<0,25
15884/197	0,25	<0,25	0,25
15884/206	<0,25	<0,25	<0,25
17052/11	<0,25	<0,25	<0,25
17052/81	<0,25	<0,25	<0,25
17766/78	0,5	<0,25	<0,25
17766/87	2	2	2
19599/3A	1	0,25	0,25
19599/3B	1	<0,25	<0,25
2461/1457	0,5	<0,25	<0,25
2986/416	0,5	<0,25	0,5
14452/2199	<0,25	<0,25	<0,25
16391/3811	<0,25	<0,25	<0,25
7789/2	0,5	<0,25	0,5
7789/39	0,5	<0,25	0,5
7789/47	1	1	0,5
7789/57	0,5	<0,25	<0,25
7789/84	0,5	<0,25	<0,25
7789/98	1	<0,25	0,5
7789/109	0,5	<0,25	<0,25
7789/110	0,5	<0,25	0,5
7789/132	0,5	<0,25	<0,25
7789/138	0,5	<0,25	<0,25

9. Táblázat: Az emberi mintákból izolált BORSA törzsek PBP2a termelése.

törzs	PBP2a termelés
VU94	-
822	+
9800	-
9989	-
14287/1	-
a36	-
a53	-



6. ábra: Emberi beteganyagból származó törzsek *mecA* hordozásának kimutatása. A gélen látható minták: 1. marker (100 bp létra), 2. VU94, 3. 822 *mecA*+, 4. 10278, 5. 1931/2 *mecA*+, 6. ATCC 25923

4.3. Fágtipizálás

A fágtipizálás a klinikai izolátumok esetében a nemzetközi fágsozozattal történt a WHO előírásainak megfelelően. Az a36 és a53 törzsek tipizálása a törzsek izolálásakor történt meg (ezeket az adatokat is feltüntettem a 10. táblázatban). A szarvasmarha tőgygyulladásból izolált törzsek tipizálását bovin fágsozozattal is elvégeztük (10. táblázat).

10. Táblázat: A BORSA törzsek fágtípusai.

törzs	fágtípus	tipizáló bovin fágok
VU94	V., vegyes	-
822	nem tipizálódott	-
9800	V.	-
9989	V.	-
14287/1	V.	-
a36	V.	-
a53	V.	-
19599/3A	V.	nem tipizálódott
19599/3B	V.	nem tipizálódott
7789/47	III.	102, 107
7789/98	II., III., V.	116, 78

A klinikai izolátumok mind tipizálódtak az V. fágcsoporthoz tartozó fágokkal, kivéve a 822-es törzset, mely egyetlen fággal sem volt fertőzhető (MRSA fágokkal sem). Az 19599/3A és 19599/3B törzs szintén az V. fágcsoporthoz tartozó fágokkal tipizálódott, de nem volt tipizálható a bovin fágokkal, ami emberi eredetre utal. A 7789/47 és 7789/98 törzs tipizálódott bovin fágokkal, de a BORSA törzsekre jellemző V. fágcsoporthoz tartozó fágokkal csak az utóbbi tipizálódott (10. táblázat).

4.4. Oxacillináz aktivitás kimutatása

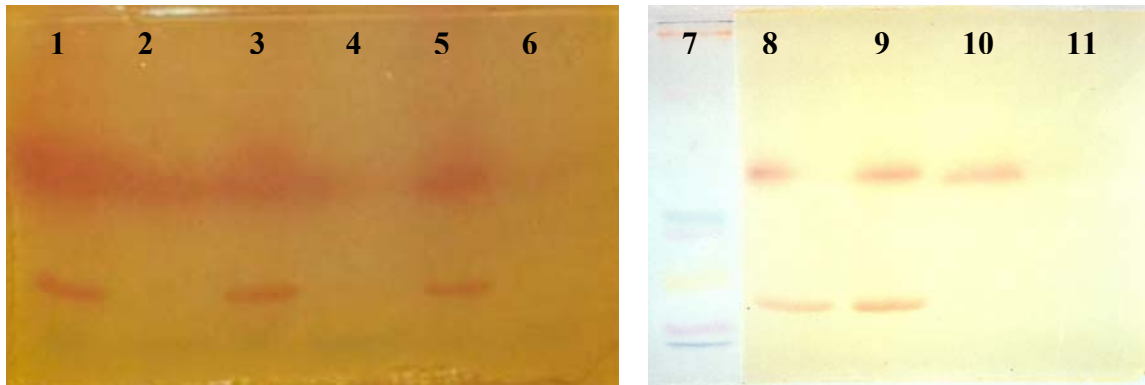
Az először a kísérletekbe bevont törzsek fermentlevének és membránfrakciójának külön-külön határoztuk meg az oxacillináz aktivitását. Spektrofotometriás módon nem sikerült aktivitást mérnünk, de biológiai titrálással igen. A frakciók oxacillináz aktivitása $10^{-4} - 10^{-3}$ μmol oxacillin/mg teljes fehérje/perc tartományban volt, minden vizsgált törzs indukció nélkül is termelt oxacillint bontani képes enzimet. Methicillin indukció hatására a termelt enzim aktivitása (mennyisége) nőtt, bár a törzsek többségénél nem jelentősen.

11. Táblázat: A kísérletekbe először bevont BORSA törzsek és a 822-es törzs extracelluláris és membránkötött β -laktamázainak oxacillin bontása. A nem indukált mintákat methicillin nélkül tenyésztett törzsekből izoláltam, az indukált minták 0,5 $\mu\text{g/ml}$ methicillin jelenlétében tenyésztett sejtekből izolált mintákat jelentenek.

minták	nem indukált minták oxacillináz aktivitása (μmol oxacillin /mg teljes fehérje /perc) $\times 10^{-3}$	indukált minták oxacillináz aktivitása (μmol oxacillin /mg teljes fehérje /perc) $\times 10^{-3}$	indukció mértéke
VU94 fermentlé	0,45	1,76	3,91
822 fermentlé	0,98	1,82	1,86
19599/3A fermentlé	0,97	2,67	2,75
19599/3B fermentlé	0,62	1,04	1,67
7789/47 fermentlé	0,10	0,15	1,50
7789/98 fermentlé	0,21	0,25	1,19
VU94 membránfrakció	1,36	6,44	4,74
822 membránfrakció	5,01	8,88	1,77
19599/3A membránfrakció	3,61	4,21	1,17
19599/3B membránfrakció	2,92	3,61	1,24
7789/47 membránfrakció	0,443	0,544	1,23
7789/98 membránfrakció	2,41	3,10	1,29

4.5. β -laktamázok molekulatömegének meghatározása SDS-PAGE-val

Először a β -laktamázok méretét határoztuk meg, hogy a 2-D gélelektroforézisnél már csak meghatározott régió(k)ra kelljen koncentrálni (7. ábra).



7. ábra: Néhány vizsgált törzs extracelluláris és membránkött β -laktamázának detektálása 1-D SDS-PAGE-val, a enzimek regenerálásával és nitrocefint bontó aktivitásuk detektálásával. Minták: 1. VU94 membránfrakció, 2. VU94 fermentlé, 3. 822 membránfrakció, 4. 822 fermentlé, 5. 14287/1 membránfrakció, 6. 14287/1 fermentlé, 7. molekulatömeg marker, 8. 19599/3A membránfrakció, 9. 19599/3B membránfrakció, 10. 19599/3B fermentlé, 11. 19599/3A fermentlé.

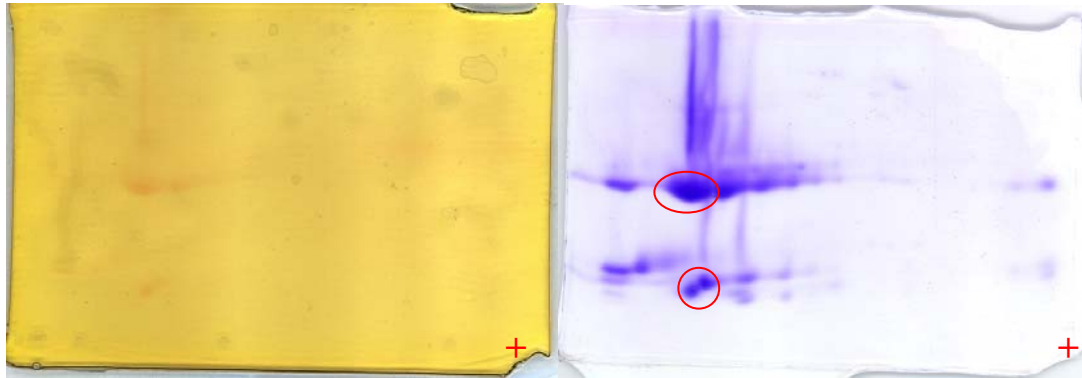
Amint az a 7. ábrán látható, két régióban is detektáltunk β -laktamáz aktivitást: 30-34 kDa és 10-14 kDa körül (a méret-meghatározás bizonytalanságát a gélek kezelés közbeni méretváltozása okozza).

4.6. A 10-14 kDa molekulatömegű „ β -laktamáz” azonosítása

4.6.1. A 10-14 kDa molekulatömegű fehérje azonosítása

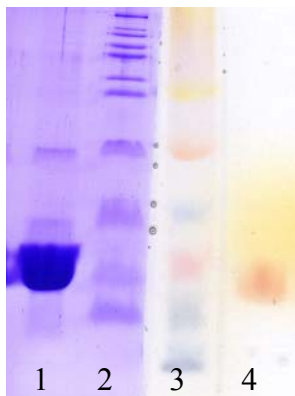
A fehérje azonosítását az 19599/3B törzs membránfrakciójából végeztük el. Az alábbi gélen (8. ábra) mind egy 30-34 kDa, mind egy 10-14 kDa molekulatömegű fehérje detektálható volt.

Ebből a gélből a nagyobb molekulatömegű fehérjét csonkolt (truncated) β -hemolizinként azonosítottuk, de a cup loading technikával a valódi β -laktamázt is sikerült felvinni a géltre, és azokon a géleken ez a fehérje nem volt detektálható. A kisebb méretű fehérjéről a MALDI-TOF analíziskor kiderült, hogy lizozim, ami a membrán izolálásakor maradt a membránhoz kapcsolódva a mintában.



8. ábra 19599/3A törzs membránfrakciójában található β -laktamáz aktivitású fehérjék detektálása. A bal oldali gélben regeneráltuk a fehérjéket és detektáltuk nitrocefín-bontó aktivitásukat. A jobb oldali CBB R-250-nel festett gélen piros körök jelzik az azonosításra elküldött fehérjéket. A gélek levágott sarkában a + szimbólum a pH 3 véget jelzi.

Ellenőrzésként 1 mg/ml lizozim törzsoldatból 10 μ l-t felvittük 1-D SDS-poliakrilamid gélre, és a lizozim regenerálása után detektáltuk a nitrocefínáz aktivitást. Amint az a 9. ábrán látható, a lizozimnak valóban van nitrocefín-bontó aktivitása.

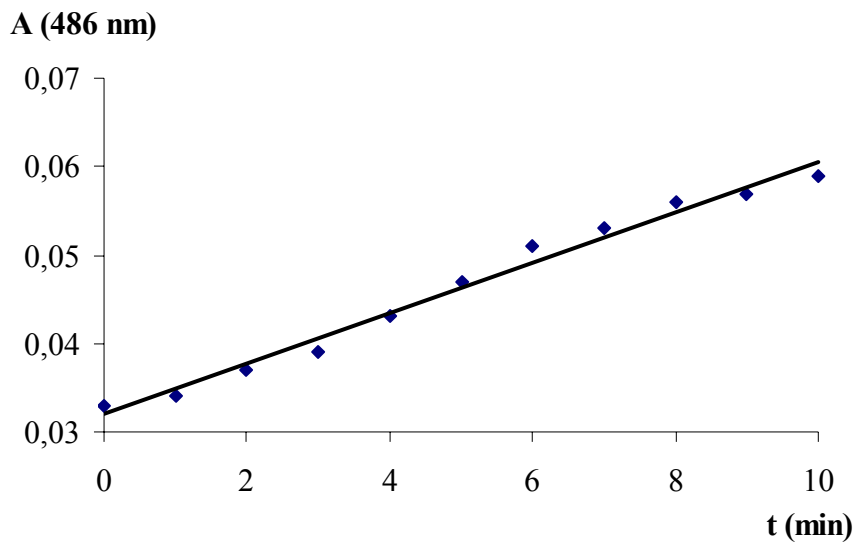


9. ábra: Lizozim nitrocefín bontó aktivitásának demonstrálása SDS-PAGE-val és az enzim regenerálásával. Sávok: 1. Lizozim CBB R-250-nel festve; 2. Széles molekulatömeg tartományú standard (Amersham); 3. Rainbow színes protein molekula tömeg marker (alacsony molekula tömeg tartomány, Amersham); a magenta színű sáv 14300 Da, az alatta lévő kékes sáv 6500Da; 4. a regenerált lizozim nitrocefín bontása (piros sáv).

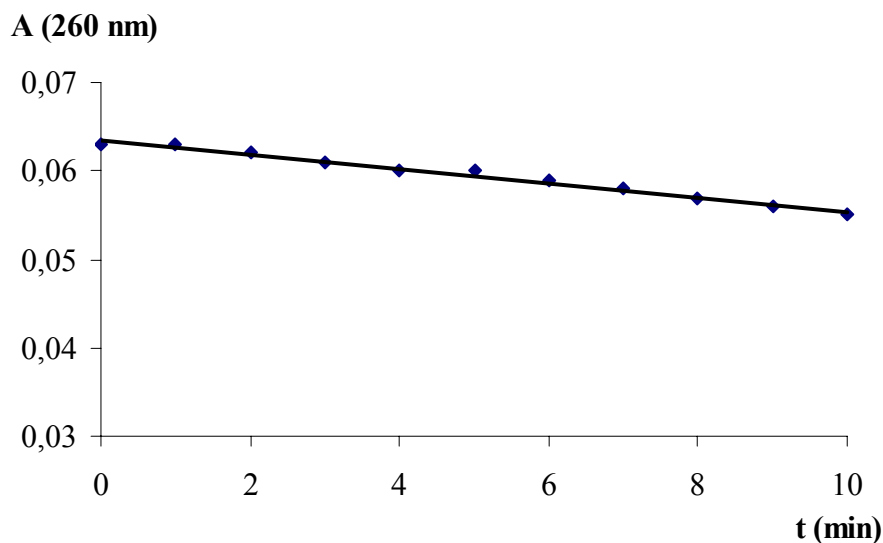
4.6.2. A lizozim antibiotikum bontó aktivitásának mérése

A lizozim nitrocefín (10. ábra) és az I. generációs cefalosporin cefaloridin (11. ábra) bontását sikerült fotometriásan detektálnunk. Nitrocefín esetében a mért enzimaktivitás 0,162 μ mól/ perc/ mg lizozim, cefaloridin esetén 0,0784 μ mól/ perc/ mg lizozim volt. Sem penicillinre és oxacillinre (penám vázas antibiotikumok), sem cefamandolra (II. generációs

cefalosporin), sem cefoperazonra (III. generációs cefalosporin) nem tudunk számottevő hidrolízist kimutatni.



10. ábra: Lizozim nitrocefín-bontó aktivitása spektrofotometriásan detektálva. Az x tengelyen az eltelt időt, az y tengelyen a 486 nm-en mért abszorpció-növekedést ábrázoltam.



11. ábra: Lizozim cefaloridin-bontó aktivitása spektrofotometriásan detektálva. Az x tengelyen az eltelt időt, az y tengelyen a 260 nm-en mért abszorpció-csökkenést ábrázoltam.

4.7. A 30-34 kDa molekulatömegű β -laktamáz azonosítása

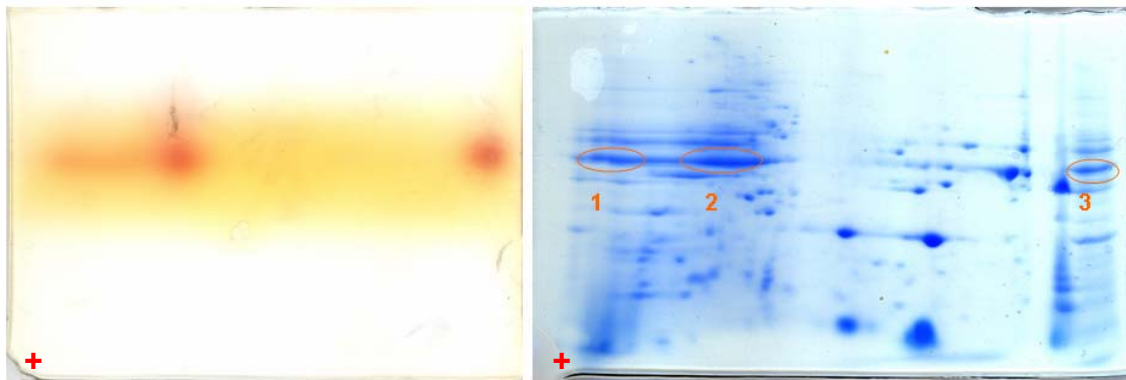
Az azonosítást minden törzs fermentlevegében és membránfrakciójában elvégeztük. A 2-D gél elektroforézis után az enzimaktivitás detektálásakor általában savas és bázikus pH értéknél

is tapasztaltunk nitrocefín-bontó aktivitást. A savas és a bázikus pI-vel rendelkező fehérjék molekulatömege is különbözött kissé, a savas pH-nál található fehérjék kissé nagyobb molekulatömegűnek tűntek, bár ez 2-D gélek esetében nem mindig jelent valós különbséget.

4.7.1. A VU94 törzs azonosított β -laktamáz aktivitással rendelkező fehérjéi

4.7.1.1. A VU94 törzs fermentlevegében azonosított β -laktamáz aktivitással rendelkező fehérjék

Amint az a 12. ábrán látható, három pH értéknél is detektálható volt β -laktamáz aktivitás. Az 1. folt pI értéke kb. 3-4, a 2. folté kb. 5, a harmadiké kb. 9-10 volt.



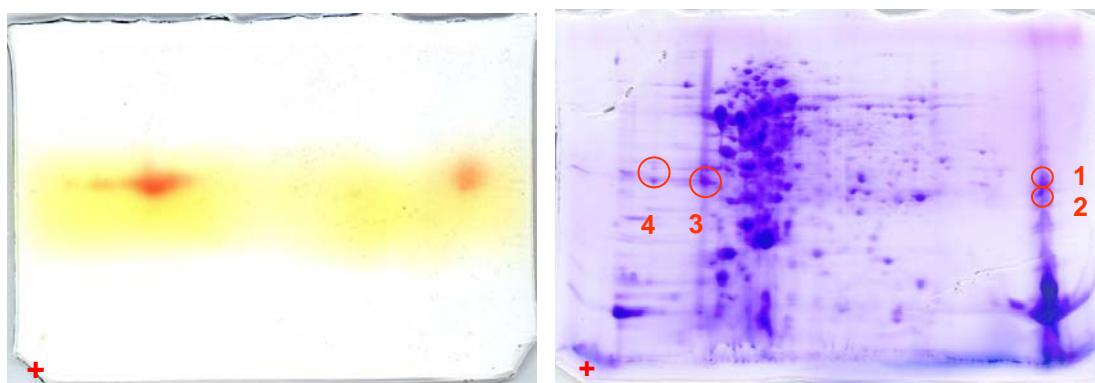
12. ábra: A VU94 törzs extracelluláris β -laktamáz aktivitású fehérjéinek detektálása. A bal oldali gélben regeneráltuk a fehérjéket és detektáltuk a nitrocefín-bontó aktivitásukat. A jobb oldali CBB G-250-nel festett gélen piros körök jelzik az azonosításra elkülönített fehérjéket. A gélek levágott sarkában a + szimbólum a pH 3 véget jelzi.

A különböző pI értékek ellenére mindhárom minta ugyanazt a fehérjét tartalmazta, a BlaZ β -laktamázt. A tömegspektrométerrel azonosított peptideket vastag vörös kiemeléssel jelöltem az alább feltüntetett szekvenciában. Nagyjából az összes foltban azonosítani lehetett ezeket a fragmenteket.

KELNDLEK**KY NAHIGVYALD T**KSGKEVKFN SDKRF**FAYAST SKAINSAILL**
EQVPYNKLNK KVHINKDDIV AYSPILEKYV GKDITLKALI EASMTYSDNT
ANNKIIEIG GIKKVKQRLK ELGDKVTNPV RYEIELNYYS PKSKKDTSTP
AAFGKTLNKL IANGKLSKEN KK**FLLDLMLN NKSGDTLIKD GVPKDYKVAD**
KSGQAITYAS RNDVAFVYPK GQSEPIVLVI FTKDNKSDK PNDKLISETA
KSVMKEF

4.7.1.2. A VU94 törzs membránfrakciójában azonosított β -laktamáz aktivitással rendelkező fehérjék

Ahogy az alábbi gél képeken látható, négy β -laktamáz aktivitással rendelkező fehérjét sikerült detektálnunk a VU94 törzs membránfrakciójában, kettőt a savas (pI 4, 5) és kettőt az erősen bázikus (pI 9-10) tartományban (13. ábra).



13. ábra: A VU94 törzs membránkötött β -laktamáz aktivitású fehérjéinek detektálása. A bal oldali gélben regeneráltuk a fehérjét és detektáltuk a nitrocefín-bontó aktivitásukat. A jobb oldali CBB R-250-nel festett gélen piros körök jelzik az azonosításra elkülöltött fehérjéket. A gélek levágott sarkában a + szimbólum a pH 3 véget jelzi.

MALDI-TOF analízis után mind a négy fehérje a már a fermentléből is kimutatott BlaZ penicillináznak bizonyult. A szekvenciában vörös félkövér betűtípussal jelöltem az összes mintában azonosított részeket, normál vörössel az 1. és 4. mintában, dőlt vörössel a csak a 4. mintában, félkövér kék betűkkel a 3. és 4. mintában, normál kékkel az 1. és 3. mintában és dőlt kékkel a csak az 1. mintában azonosított részeket:

MKKLIFLIVI ALVLSACNSN SSHAKELNDL EKKYNAHIGV YALDTKSGKE
VKFNSDKRFA YASTSKAINS AILLEQVPYN KLNKKVHINK DDIVAYSPIL
EKYVGKDITL KALIEASMTY SDNTANNKII KEIGGIKKVK QRLKELGDKV
TNPVRYEIEL NYYSKSKKD TSTPAAFGKT LNKLIANGKL SKENKKFLLD
LMLNNKSGDT LIKDGVPKDY KVADKSGQAI TYASRNDVAF VYPKGQSEPI
VLVIFTNKDN KSDKPNDKLI SETAKSVMKE F

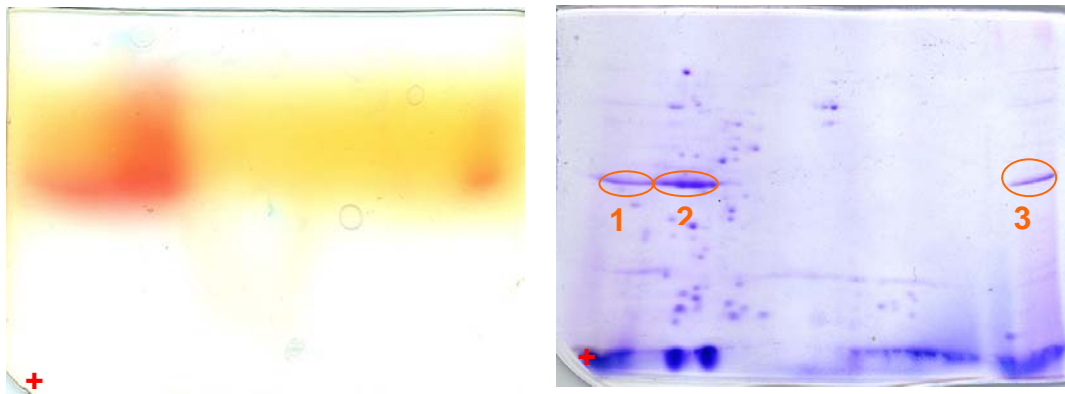
A 2. mintában azonosított peptidek:

⁶⁷AINS AILLEQVPYN K⁸¹, ¹⁵⁷YEIELNYYSK¹⁶¹, ¹⁹⁷FLLD LMLNNK²⁰⁶, ²²⁶SGQAI
TYASR²³⁵, ²³⁶NDVAF VYPK²⁴⁴, ²⁴⁵GQSEPI VLVIFTNK²⁵⁸

4.7.2. A 822-es törzs azonosított β -laktamáz aktivitással rendelkező fehérjei

4.7.2.1. A 822-es törzs fermentlevében azonosított β -laktamáz aktivitással rendelkező fehérjék

Hasonlóan az előző törzshöz, ebben az esetben is savas (pI 3 és 4) és bázikus (pI 9-10 között) pH értékeknél detektáltunk aktivitást a gélen (14. ábra).



14. ábra: A 822-es törzs extracelluláris β -laktamáz aktivitású fehérjéinek detektálása. A bal oldali gélben regeneráltuk a fehérjéket és detektáltuk a nitrocefin-bontó aktivitásukat. A jobb oldali CBB R-250-nel festett gélen piros körök jelzik az azonosításra elkül-dött fehérjéket. A gélek levágott sarkában a + szimbólum a pH 3 véget jelzi.

Mindhárom mintában ugyanazt a BlaZ β -laktamázt lehetett azonosítani.

Az illeszkedő peptideket vörös színnel és vastagítással kiemeltem a szekvenciában:

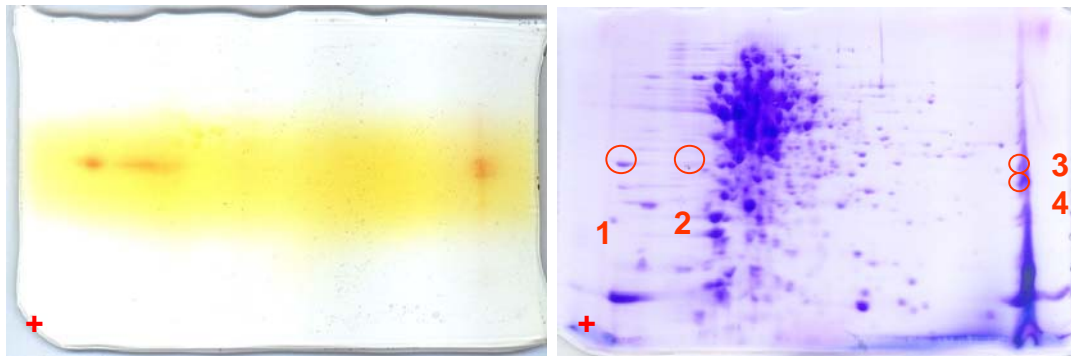
KELNDLEK**KY NAHIGVYALD** TKSGKEVKFN SDKR**FAYAST SKAINSAILL**
EQVPYNKLNK KVHINKDDIV AYSPILEKYV GKDITLKALI EASMTYSNT
ANNKIIKEIG GIKKVKQRLK ELGDKVTNPV RYEIELNYYS PKSKKDTSTP
AAF~~G~~KTLNKL IANGKLSKEN KK**FLLDMLN** NKSGDTLIK**D GVPKDYKVAD**
KSGQAITYAS RNDVAFVYPK GQSEPIVLVI FTKDNKSDK PNDKLISETA
KSVMKEF

A PSD-k határozottan megerősítik a fenti fehérje jelenlétét a mintákban:

1. m/z: 874,5 Da (1., 2., 3. mintában is megtalálható volt), pozíció és szekvencia:
 $^{35}\text{FAYASTSK}^{42}$
2. m/z: 1053,53 Da (1., 2. mintában erősítettük meg a jelenlétét), pozíció és szekvencia:
 $^{202}\text{SGQAITYASR}^{211}$
3. m/z: 1052,6 Da (1., 2., 3. mintában is megerősítettük a jelenlétét), pozíció és szekven-
cia: $^{212}\text{NDVAFVYPK}^{220}$

4.7.2.2. A 822-es törzs membránfrakciójában azonosított β -laktamáz aktivitással rendelkező fehérjék

A törzs membránfrakciójában négy, nitrocefín-bontó aktivitással rendelkező fehérjét sikerült azonosítani, ezúttal is savas (pI 3, 4) és bázikus (pI 9-10) pH tartományban (15. ábra).



15. ábra: A 822-es törzs membránkötött β -laktamáz aktivitású fehérjéinek detektálása. A bal oldali gélben regeneráltuk a fehérjéket és detektáltuk a nitrocefín-bontó aktivitásukat. A jobb oldali CBB R-250-nel festett gélen piros körök jelzik az azonosításra elküldött fehérjéket. A gélek levágott sarkában a + szimbólum a pH 3 véget jelzi.

Az 1., 2. és a 4. fehérje ezúttal is a BlaZ penicillináznak bizonyult, míg a 3. foltban az UPF0082 azonosítási számú konzervált hipotetikus fehérjét tudtuk kimutatni és lizozimot.

A *blaZ* gén által kódolt β -laktamáz (penicillináz) szekvenciája (vörös félkövér betűtípussal jelöltek az azonosított peptidfragmentek):

MKKLIFLIVI ALVLSACNSN SSHAKELNDL EK**KYNAHIGV YALDTKSGKE**
VKFNSDKRFA **YASTSKAINS AILLEQVPYN KLNKKVHINK DDIVAYSPIL**
EKYVGKDITL KALIEASMTY SDNTANNKII KEIGGIKKVK QRLKELGDKV
TNPVRYEIEL NYSPKSKKD TSTPAAFGKT LNKLIANGKL SKENKKFLLD
LMLNKS GDT LIKDGVPKDY KVADKSGQAI TYASRNDVAF VYPKGQSEPI
VLVIFTNKDN KSDKPNDKLI SETAKSVMKE F

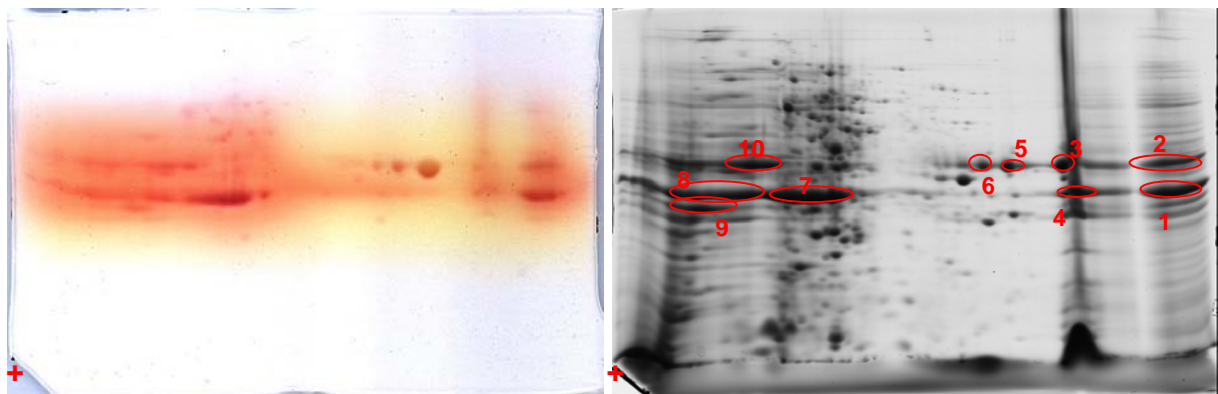
A P67182 lókuszon található gén által kódolt UPF0082 azonosítási számú ismeretlen funkciójú konzervált feltételezett fehérje szekvenciája (vörös félkövér betűtípussal jelöltek az azonosított peptidfragmentek):

MGRKWNNIKE KKAQKDKNTS RIYAK**FGKEI YVAAKSGEPN** PESNQTLRLV
LER**AKTYSVP NHIIDRAIDK** AK**GAGDENYD HLR**YEGFGPN GSMLIVDALT
NNVNRTASDV RAAFNGGN MGVSGSVAYM FDHTATFGVE GKSVDVLET
LMEQDIDVRD VIDDNGLTIV YAEPDQFAQV QDALREAGVE EFKVAEFEML
PQTDIELSEE DQAIFEK**LID ALEDLEDVQN VFHNVDLK**

4.7.3. Az 14287/1 törzs azonosított β -laktamáz aktivitással rendelkező fehérjéi

4.7.3.1. Az 14287/1 törzs fermentlevében azonosított β -laktamáz aktivitással rendelkező fehérjék

A törzs fermentlevének analízise során sok β -laktamáz aktivitással rendelkező foltot találtunk. A gélképen látszik, hogy mivel a háttér elég vörös, valószínűleg a nitrocefín már nem volt elég stabil (időrendben tekintve ez volt az utolsó analizált minta), és valószínűleg minden fehérje, ami egy kicsit képes volt hozzákapcsolódni a nitrocefínhez, a hidrolízisét okozta, ezért csak a jelentősebb hidrolízist mutató 10 pöttyöt analizáltuk (16. ábra).



16. ábra: Az 14287/1 törzs extracelluláris β -laktamáz aktivitású fehérjéinek detektálása. A bal oldali gélben regeneráltuk a fehérjéket és detektáltuk a nitrocefín-bontó aktivitásukat. A jobb oldali CBB G-250-nel festett gélen piros körök jelzik az azonosításra elküldött fehérjéket. A gélek levágott sarkában a + szimbólum a pH 3 véget jelzi.

Az 1., 4., 7., 8. mintában a BlaZ β -laktamázt sikerült azonosítani. A 2. (8 illeszkedő peptid 13 detektáltból, 25,2%-os szekvencia-lefedettség) és 3. (18 illeszkedő peptid 33 detektáltból, 71,2%-os szekvencia-lefedettség) mintában β -hemolizint (truncated β -hemolysin, csonka szekvenciájú génre illeszkedett) detektáltunk, a 3-ban emellett még α -hemolizint is (12 illeszkedő peptid 33 detektáltból, 52,6%-os szekvencia-lefedettség). Ebben a mintában a legintenzívebb peptideken PSD megerősítést is végeztünk:

Csonka β -hemolizin: m/z: 1322.67 ¹⁰³EYPYQTPVLGR¹¹³

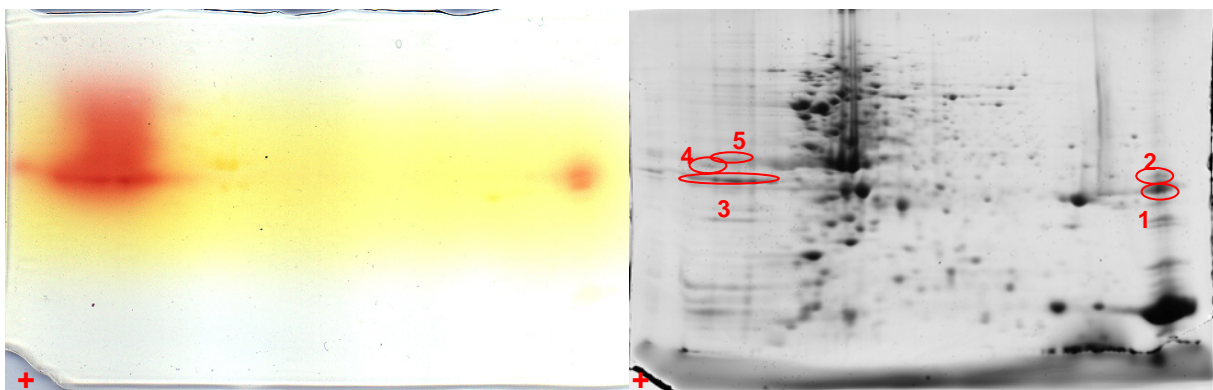
α -hemolizin: m/z: 1378.69 ²⁶⁷QQTNIDVIYER²⁷⁷; m/z: 1754.88 ⁶⁴VFYSFIDDKNHK⁷⁷

Az 5. (28 illeszkedő peptid 34 detektáltból, 62%-os szekvencia-lefedettség), 6. (19 illeszkedő peptid 26 detektáltból, 65%-os szekvencia-lefedettség), 10. (23 illeszkedő peptid 33 detektáltból, 67,9%-os szekvencia-lefedettség) mintában β -hemolysint (más néven foszfolipáz C-t) találtunk, a 9-ben pedig SplB szerin proteázt (8 illeszkedő peptid 9 detektáltból, 32,9%-

os szekvencia-lefedettség). Ez utóbbi mintában is a legintenzívebb peptideken PSD megerősítést is végeztünk: m/z : 1399,66 $^{130}\text{GFNFNDNVTPFK}^{141}$.

4.7.3.2. Az 14287/1 törzs membránfrakciójában azonosított β -laktamáz aktivitással rendelkező fehérjék

Az 14287/1 törzs membránfrakciójának analizisekor öt nitrocefint bontó aktivitással rendelkező foltot analizáltunk (17. ábra). Az 1. és 2. pI-je bázikus (pH 9-10), a többi fehérjéé savas (pH 3-4).



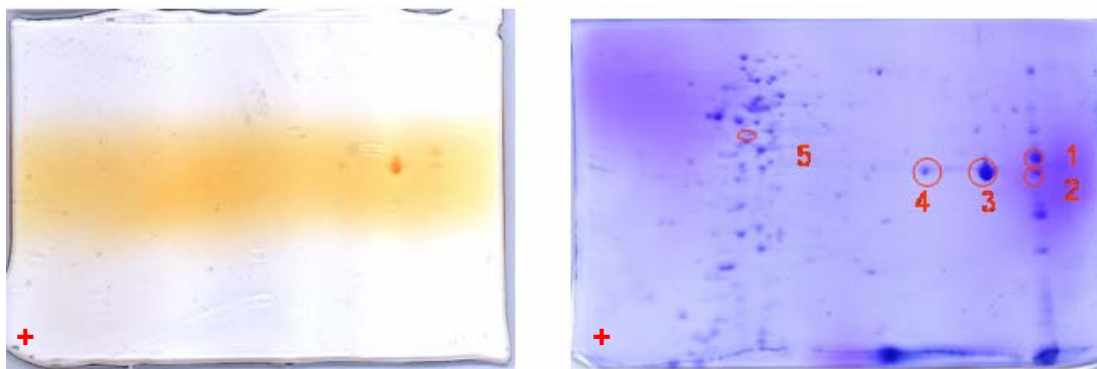
17. ábra: Az 14287/1 törzs membránkötött β -laktamáz aktivitású fehérjéinek detektálása. A bal oldali gélben regeneráltuk a fehérjéket és detektáltuk a nitrocefint bontó aktivitásukat. A jobb oldali CBB G-250-nel festett gélen piros körök jelzik az azonosításra elküldött fehérjéket. A gélek levágott sarkában a + szimbólum a pH 3 véget jelzi.

Az 1. és 2. foltban csak lizozimot lehetett kimutatni. A 3. és a 4. mintában a BlaZ β -laktamázt azonosítottuk, az 5. foltban pedig egy 30S riboszómális alegység S2 fehérjéjét azonosítottuk az m/z 1096,54-as peptid csúcs PSD spektruma alapján, – ami megfelel a fehérje [87-95] szakaszának, (R) AGQFYINQR (W) szekvenciával, 13 illeszkedő peptid 37 detektáltból, 39%-os szekvencia-lefedettség mellett.

4.7.4. A 9989 törzs azonosított β -laktamáz aktivitással rendelkező fehérjéi

4.7.4.1. A 9989 törzs fermentlevegében azonosított β -laktamáz aktivitással rendelkező fehérjék

E törzs esetében már előzetesen megállapítható volt a biológiai titrálás illetve spektrofotometriás enzimaktivitás-mérés alapján, hogy a törzs fermentleve nem mutat intenzív β -laktamáz aktivitást. Ennek ellenére a gélen (18. ábra) látható öt nem túl nagy nitrocefin-bontó aktivitású fehérje, főként a bázikus (1., 2.: pH 9-10; 3.: pH 8) illetve a semleges – kissé savas (4.: pH 7; 5.: pH 4-5) pH tartományban, melyeket azonosítottunk.



18. ábra: A 9989 törzs extracelluláris β -laktamáz aktivitású fehérjéinek detektálása. A bal oldali gélben regeneráltuk a fehérjéket és detektáltuk a nitrocefin-bontó aktivitásukat. A jobb oldali CBB R-250-nel festett gélen piros körök jelzik az azonosításra elkül-dött fehérjéket. A gélek levágott sarkában a + szimbólum a pH 3 véget jelzi.

Az 1. folt (kb 32 kDa, pI 9) γ -hemolizint (B prekursor) tartalmazott. A 2. foltban (kb. 30 kDa, pI 9) α -hemolizin volt jelen. A 3. minta (kb. 28 kDa, pI 8) α - és γ -hemolizint (utóbbi C prekursorát) tartalmazott, csakúgy, mint a 4. pötty (kb. 28 kDa, pI 7). Az 5. minta (kb. 28 kDa, pI 4,5) α -hemolizint tartalmazott. Mivel az azonosítást LC-MS-sel végeztük, és egyetlen fragment sem utalt β -laktamáz jelenlétére, ezért valószínűleg valóban ezek a fehérjék voltak felelősek a nitrocefin hidrolíziséért.

Az α -hemolizin, amit a 2. (17 peptid, 61%-os szekvencia-lefedettség, MS/MS Search Score: 272,23), 3. (10 peptid, 45%-os szekvencia-lefedettség, MS/MS Search Score: 149,4), 4. (27 peptid, 70%-os szekvencia-lefedettség, MS/MS Search Score: 406,74). és 5. (27 peptid, 70%-os szekvencia-lefedettség, MS/MS Search Score: 395,36). folt is tartalmazott, a következő aminosav sorrenddel rendelkezik:

MKTRIVSSVT TTLGSLM NPVAGAADSD INIK**TGTTDI GSNTTVKTGD**
LVTYDKENGM HKKVFYSFID DKNHNKLLV IRTKGTIAGQ YRVYSEEGAN
KSGLAWPSAF KVQLQLPDNE VAQISDYPR NSIDTKEYMS **TLTYGFNGNV**
TGDDTGKIGG LIGANVSIGH TLKYVQPDFK TILESPTDKK VGWKVIFNNM
VNQNWGPYDR DSWNPVYGNQ LFMKTRNGSM KAADNFLDPN **KASSLLSSGF**
SPDFATVITM DRKASKQQTN IDVIYERVRD DYQLHWTSTN WKGTNTKDKW
TDRSSERYKI DWEKEEMTN

A félkövér vörössel jelölt részeket a 2., 4. és 5. mintában azonosítottuk, a normál vörössel jelölteket csak a 4. és 5. mintában, félkövér kékkel a csak 4., normál kékkel a csak 5. mintában.

A γ -hemolizin B prekursor a 1-es feltételben volt megtalálható, 36711,2 Da molekulatömegű (20 peptid, 64%-os szekvencia-lefedettség, MS/MS Search Score: 320,3), és a következő aminosav sorrenddel rendelkezik (a detektált fragmentek szekvenciája félkövér vörössel kiemelve):

MKMNKLVKSS VATSMALLL SGTANAEGKI TPVSVK**KVDD KVTLYKTTAT**
ADSDKFKISQ ILTFNFIKDK SYDKDTLVK ATGNINSGFV KPNPNDYDFS
KLYWGAKYNV SISSQNSDV NVVDYAPKNQ NEEFQVQNTL GYTFGGDISI
SNGLSGGLNG NTAFFSETINY KQESYRTTLS RNTNYK**NVGW GVEAHKIMNN**
GWGPYGRDSF HPTYGNELFL AGRQSSAYAG QNFIAQHQMP LLSRSNPNPE
FLSVLSHRQD GAKKSKITVT YQREMDLYQI RWNGFYWAGA NYKNFKTRTF
KSTYEIDWEN HKVKLLDTKE TENNK

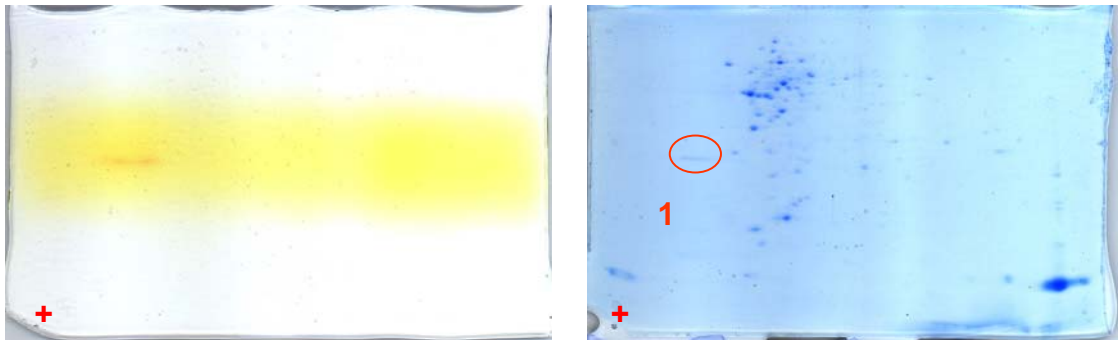
A γ -hemolizin C prekursorát a 3. (15 peptid, 41%-os szekvencia-lefedettség, MS/MS Search Score: 210,75) és 4. (2 peptid, 8%-os szekvencia-lefedettség, MS/MS Search Score: 30,48) feltételben találtuk meg. Ez egy 35642,0 Da tömegű prekursor, aminosav sorrendje az alábbiakban látható:

MLKNKILTTT LSVSLLAPLA NPLENAKAA NDTEDIGK**GS DIEHKRTED**
KTSNKWGVTVQ NIQFDFVKDK KYNKDALILK **MQGFISRTT** YVNYKKTNHV
KAMR**WPFQYN IGLKTNDKYV SLINYLPKNK** IESTNVSQIL GYNIGGNFQS
APSLGGNGSF NYSK**SISYTVQ QNYVSEVEQQ NSKSVLWGVK** ANSFATESGQ
KSAFDSDLFV GYKPHSKDPR DYFVPDSELP PLVQSGFNPS FIATVSHEK**G**
SSDTSEFEIT YGRNMDVTHA IKRSTHYGNS YLDGHRVHNA FVNRNYTVKY
EVNWKTHEIK VKGQN

Félkövér vörös betűtípussal jelöltem a csak a 3. feltételben azonosított, kékkel a mindkét mintában azonosított részeket.

4.7.4.2. A 9989 törzs membránfrakciójában azonosított β -laktamáz aktivitással rendelkező fehérjék

A törzs membránfrakciójában egyetlen β -laktamáz aktivitással rendelkező fehérjét sikerült kimutatnunk a savas (pI 4) tartományban (19. ábra).



19. ábra: A 9989 törzs membránkötött β -laktamáz aktivitású fehérjéinek detektálása. A bal oldali gélben regeneráltuk a fehérjéket és detektáltuk a nitrocefín-bontó aktivitásukat. A jobb oldali CBB G-250-nel festett gélen piros kör jelzi az azonosításra elküldött fehérjét. A gélek levágott sarkában a + szimbólum a pH 3 véget jelzi.

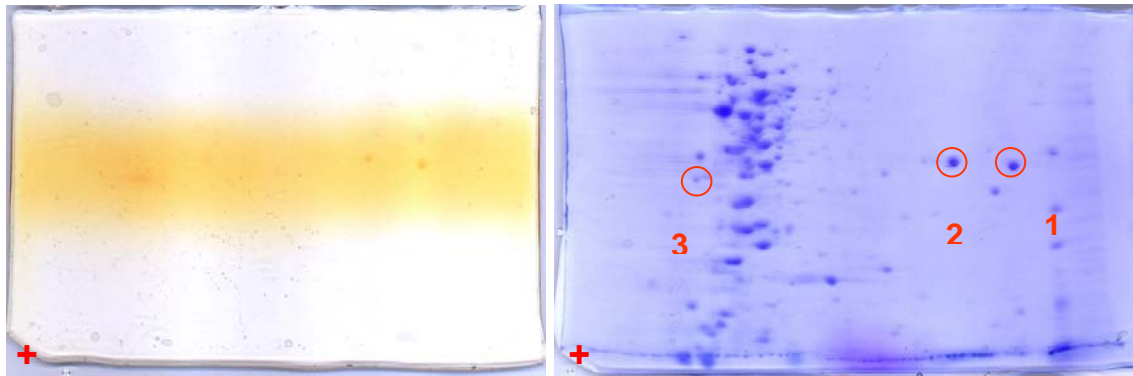
Az azonosított fehérje a BlaZ penicillináz volt. A detektált részek a szekvenciában vörös félkövér betűtípussal vannak jelölve:

MKKLIFLIVI ALVLSACNSN SSHAKELNDL EK**KYNAHIGV YALDTKSGKE**
VKFNSDKR**FA YASTSKAINS AILLEQVPYN KLNKKVHINK DDIVAYSPIL**
EKYVGKDITL KALIEASMTY SDNTANNKII KEIGGIKKVK QRLKELGDKV
TNPVRYEIEL NYYS PKSKKD TSTPAAFGKT LNKLIANGKL SKENKK**FLLD**
LMLNNKSGDT LIKDGVPKDY KVADKSGQAI TYASRNDVAF VYPKGQSEPI
VLVIFTNKDN KSDKPNDKLI SETAKSVMKE F

4.7.5. A 9800 törzs azonosított β -laktamáz aktivitással rendelkező fehérjéi

4.7.5.1. A 9800 törzs fermentlevében azonosított β -laktamáz aktivitással rendelkező fehérjék

Hasonlóan az előző törzshöz, a 9800 sem bizonyult az előzetes mérések alapján sok β -laktamáz termelő törzsnak. Ennek ellenére a gélen látható három nem túl nagy nitrocefín-bontó aktivitású fehérje, bázikus – semleges (1.: pH 8; 2.: pH 7 körül) illetve savas (3.: pH 4-5) pH tartományban, melyeket azonosítottunk (20. ábra).



20. ábra: A 9800 törzs extracelluláris β -laktamáz aktivitású fehérjéinek detektálása. A bal oldali gélben regeneráltuk a fehérjéket és detektáltuk a nitrocefín-bontó aktivitásukat. A jobb oldali CBB R-250-nel festett gélen piros körök jelzik az azonosításra elküldött fehérjéket. A gélek levágott sarkában a + szimbólum a pH 3 véget jelzi.

Az 1. foltban (kb. 30 kDa, pI 8) az α -hemolizint, a 2. foltban (kb. 30 kDa, pI 7) α -hemolizint és β -hemolizint, a 3. foltban (kb. 28 kDa, pI 5) a BlaZ penicillinázt azonosítottunk. Mivel az azonosítást LC-MS-sel végeztük, és az első két foltban egyetlen fragment sem utalt β -laktamázra, ezért ott valószínűleg a hemolizinek voltak valóban felelősek a nitrocefín hidrolíziséért.

Az 1. mintában detektált α -hemolizin a következő aminosav-sorrenddel rendelkezik (26 peptid, 70%-os szekvencia-lefedettség, MS/MS Search Score: 388,11), a szekvenciában a félkövér színes (vörös és kék) betűtípus jelzi a detektált részeket:

MKTRIVSSVT TLLLGSILM NPVAGAADSD INIK**TGTTDI GSNTTVKTGD**
LVTYDKENGM HKKVFYSFID DKNHNKLLV IRT**KGTIAGQ YRVYSEEGAN**
KSGLAWPSAF KVQLQLPDNE VAQISDYYPR NSIDTK**EYMS TLTYGFNGNV**
TGDDTGKIGG LIGANVSIGH TLKYVQPDFK TILESPTDKK VGWKVIFNNM
VNQNWGPYDR DSWNPVYGNQ LFMKTRNGSM KAADNFLDPN KASSLLSSGF
SPDFATVITM DRKASKQQTN IDVIYERVRD DYQLHWTSTN WKGTNTKDKW
TDRSSERYKI DWEKEEMTN

A második folt α - és β - hemolizint tartalmazott. Az ebben a foltban detektált α -hemolizin részeket (13 peptid, 46%-os szekvencia-lefedettség, MS/MS Search Score: 174,55) a fenti szekvenciában vastag vörös betűtípussal emeltem ki.

A β -hemolizin aminosav sorrendje a következő (18 peptid, 47%-os szekvencia-lefedettség, MS/MS Search Score: 273,75), félkövér vörös betűtípussal kiemelve jelöltem az azonosított részeket:

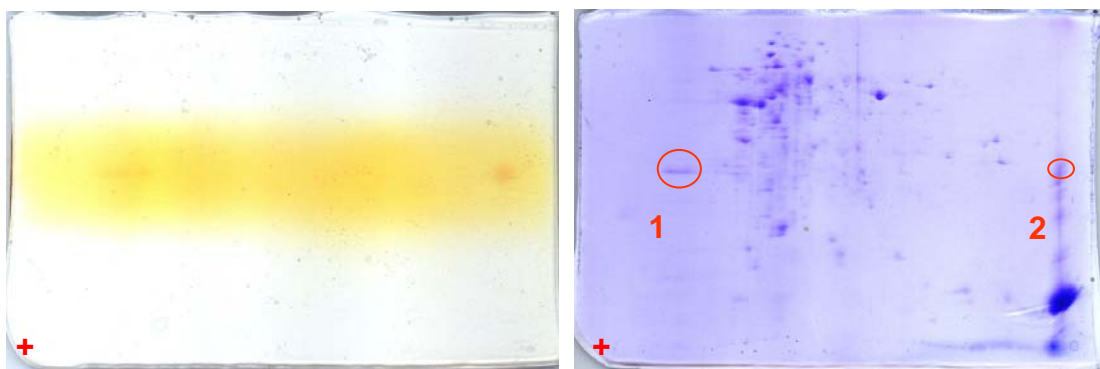
MVKKTKSNSL KKVATLALAN LLLVGALTDN SAKAESKKDD TDLK**LVSHNV**
YMLSTVLYPN WGQYKRADLI GQSSYIKNND VVIFNEAFDN GASDKLLSNV
KKEYPYQTPV LGRSQSGWDK TEGSYSSTVA EDGGVAIVSK YPIKEKIQHV
FKSGCGFDND SNKGFVYTKI EKNGK**NVHVI GTHTQSEDSR** CGAGHDRK**IR**
AEQMKEISDF VKKKNIPKDE TVYIGGDLNV NKGTPFEFKDM LKNLNVNDVL
YAGHNSTWDP QSNSIAKYNV PNGKPEHLDY IFTDKDHKQP KQLVNEVVTE
 KPKPWDVYAF PYYYYVYNDFS DHYPIKAYSK

A 3. mintában a BlaZ β -laktamáz mutattuk ki, a vörös félkövér betűtípussal kiemelt részeket sikerült detektálni a tömegspektrometriai analízis során:

MKKLIFLIVI ALVLSACNSN SSHAKELNDL EKKYNAHIGV YALDTKSGKE
 VKFN**SDKRFA YASTSKAINS** AILLEQVPYN KLNKK**VHINK DDIVAYSPIL**
EKYVGGDITL KALIEASMTY SDNTANNKII KEIGGIKKVK QRLKELGDKV
 TNPVRYEIEL NYYS**PKSKKD TSTPAAFGKT** LNKLIANGKL SKENKK**FLLD**
LMLNNKSGDT LIKDGVPKDY KVADK**SGQAI TYASRNDVAF VYPKGQSEPI**
 VLVIFTNKDN KSDKPNDKLI SETAK**SVMKE F**

4.7.5.2. A 9800 törzs membránfrakciójában azonosított β -laktamáz aktivitással rendelkező fehérjék

A törzs membránfrakciójában egy-egy nitrocefinaz aktivitással rendelkező fehérjét azonosítottunk savas (pH 4) és bázikus (pH 9-10) pH-nál (21. ábra).



21. ábra: A 9800 törzs membránkötött β -laktamáz aktivitású fehérjének detektálása. A bal oldali gélben regeneráltuk a fehérjéket és detektáltuk a nitrocefinaz aktivitásukat. A jobb oldali CBB R-250-nel festett gélen piros körök jelzik az azonosításra elkülönített fehérjéket. A gélek levágott sarkában a + szimbólum a pH 3 véget jelzi.

Mind a két fehérje a BlaZ penicillináz volt. Az alábbi szekvenciában félkövér vörös betűtípussal jelöltem a mindkét mintában detektált részeket, félkövér kék betűtípussal a csak az 1. mintában detektáltakat, és normál kék betűtípussal a csak a 2. mintában detektált részt:

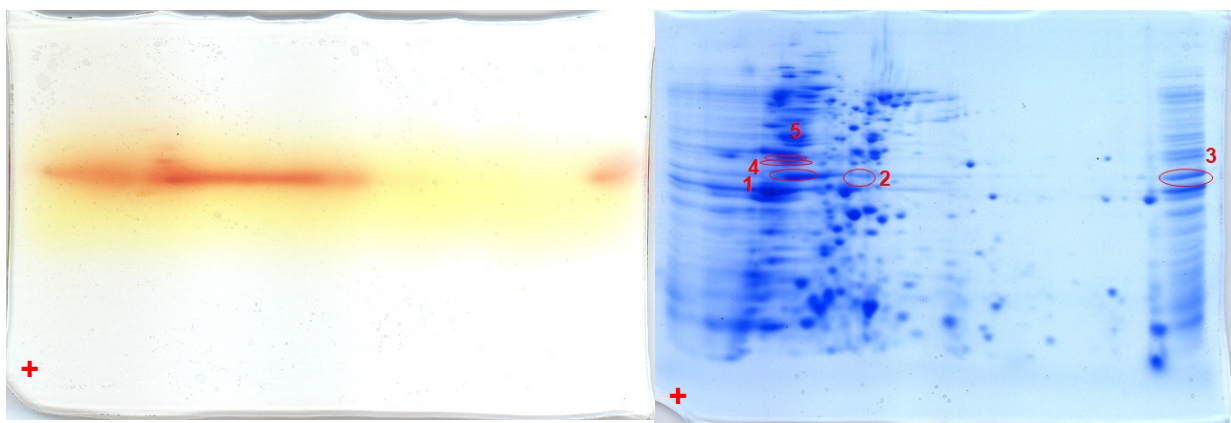
MKKLIFLIVI ALVLSACNSN SSHAK**ELNDL** **EKKYNAHIGV** **YALDTKSGKE**
VKFNSDKR**FA** **YASTSKAINS** **AILLEQVPYN** **KLNKKVHINK** **DDIVAYSPIL**
EKYVGKDITL **KALIEASMTY** **SDNTANNKII** **KEIGGIKKVK** **QRLKELGDKV**
TNPVRYEIEL **NYYSKSKKD** **TSTPAAF****GKT** **LNKLIANGKL** **SKENKKFLLD**
LMLNNSGDT **LIKDGVPKDY** **KVADKSGQAI** **TYASRNDVAF** **VYPKGQSEPI**
VLVIFTNKDN **KSDKPNDKLI** **SETAKSVMKE** **F**

4.7.6. Az a36 törzs azonosított β -laktamáz aktivitással rendelkező fehérjéi

4.7.6.1. Az a36 törzs fermentlevegében azonosított β -laktamáz aktivitással rendelkező fehérjék

Mivel az összes klinikai izolátumunkból csak a BlaZ penicillinázt sikerült kimutatni, mint az egyetlen β -laktamáz aktivitással rendelkező fehérjét, ezért elkértük Dr. Massidától azt a két törzset, melyek β -laktamáz profilja alapján elindítottuk kutatásunkat (Massidda, *et al.*, 1992).

Az a36 törzs extracelluláris fehérjéi között három jelentősebb és két kevésbé intenzív nitrocefín-bontó aktivitással rendelkezőt találtunk (22. ábra). A fehérjék a savas régióban helyezkedtek el (1., 4., 5.: pH 4, 2.: pH 5), mindösszesen egy fehérjét találtunk a bázikus régióban (3.: pI 9-10).



22. ábra: Az a36 törzs extracelluláris β -laktamáz aktivitású fehérjéinek detektálása. A bal oldali gélben regeneráltuk a fehérjéket és detektáltuk a nitrocefín-bontó aktivitásukat. A jobb oldali CBB G-250-nel festett gélen piros körök jelzik az azonosításra elküldött fehérjéket. A gélek levágott sarkában a + szimbólum a pH 3 véget jelzi.

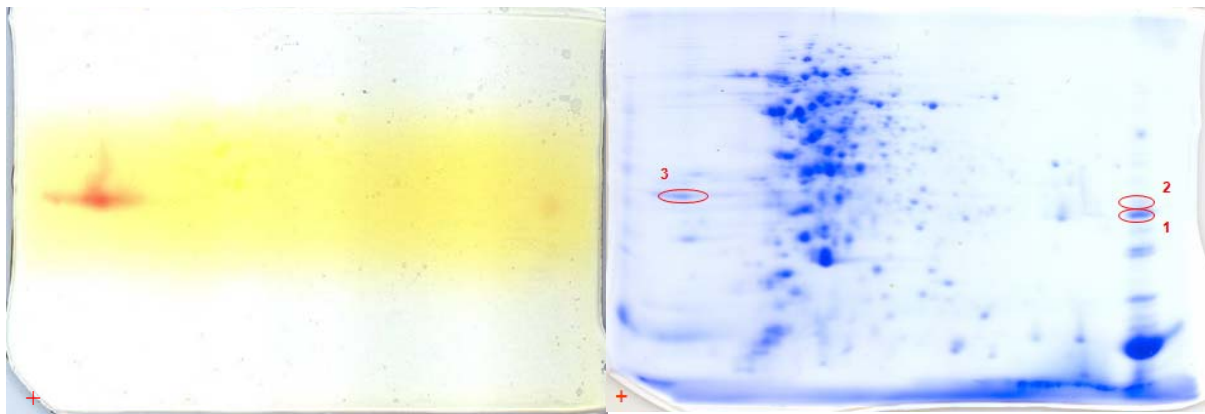
Az azonosított fehérjék közül háromról derült ki, hogy valóban β -laktamáz. Az 1. mintánál 37 detektált csúcsból 17 (47%-os szekvencia-lefedettség mellett), a 2-nál 14 detektált csúcsból 7 (29,5%-os szekvencia-lefedettség mellett), a 3-nál pedig 20-ból 17 csúcs (45%-os szekvencia-lefedettség mellett) bizonyította a BlaZ β -laktamáz jelenlétét.

A 4. mintában foszfatidil-inozitol-foszfodiészterázt (EC 4.6.1.13) azonosítottunk (9 csúcs 28 detektáltból, 28,9%-os szekvencia-lefedettség), melynek nitrocefín bontó aktivitása nem ismert. A sejtciklusban a szerepe, hogy a 1-foszfatidil-D-mio-inozitolt D-mio-inositol-1,2-ciklikus foszfáttá és diacilglicerollá hasítja. Ennél a fehérjénél a PSD megerősítette a m/z: 941.43 $^{135}\text{TfEEIFR}^{141}$ peptid jelenlétét.

Az 5. fehérjefoltból leukocidint (LukS komponens, gi|13549150, 35 detektált csúcsból 20 illeszkedik, 59%-os szekvencia-lefedettség mellett), és α -hemolizint (8 illeszkedő csúcs 15 detektáltból, 26%-os szekvencia-lefedettség) mutattunk ki. A PSD megerősítette a leukocidinből származó, m/z: 1265,59, $^{76}\text{WPFQYNIGLK}^{85}$ szekvenciájú peptid jelenlétét.

4.7.6.2. Az a36 törzs membránfrakciójában azonosított β -laktamáz aktivitással rendelkező fehérjék

A törzs membránfrakciójában is elvégeztük a β -laktamáz aktivitású fehérjék detektálását és azonosítását. Összesen három aktív foltot tudtam detektálni, ezek közül a két bázikus pI-jű (1., 2.: pH 9-10-nél) nem mutatott jelentősebb aktivitást (23. ábra).



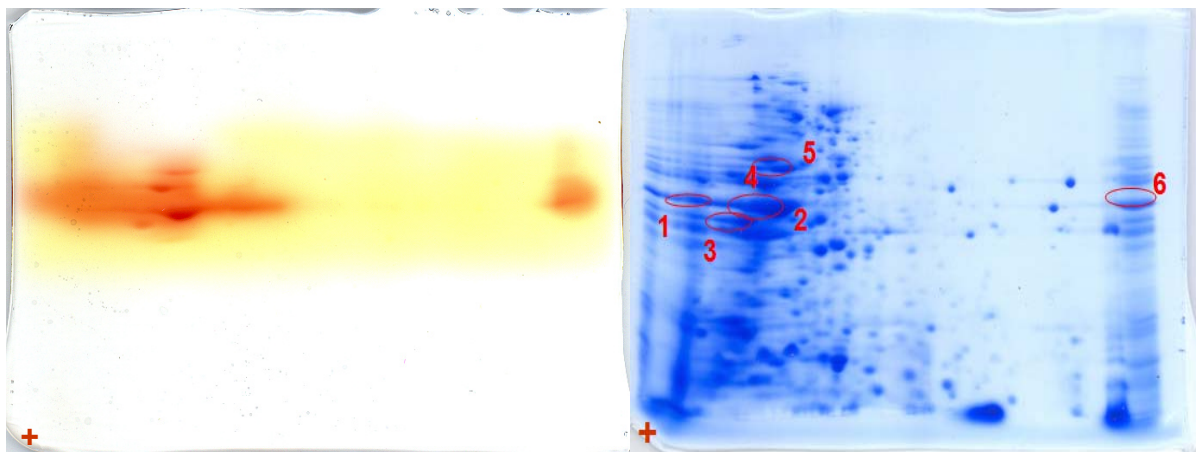
23. ábra: Az a36 törzs membrán β -laktamáz aktivitású fehérjéinek detektálása. A bal oldali gélben regeneráltuk a fehérjéket és detektáltuk a nitrocefín-bontó aktivitásukat. A jobb oldali CBB G-250-nel festett gélen piros körök jelzik az azonosításra elküldött fehérjéket. A gélek levágott sarkában a + szimbólum a pH 3 véget jelzi.

Az első mintából csak lizozimot sikerült kimutatni. A második minta 50S riboszomális fehérje volt. A 3. minta esetén 51 csúcsból 18 illeszkedett BlaZ β -laktamáz enzimre 65 %-os lefedettség mellett.

4.7.7. Az a53 törzs azonosított β -laktamáz aktivitással rendelkező fehérjei

4.7.7.1. Az a53 törzs fermentlevében azonosított β -laktamáz aktivitással rendelkező fehérjék

Az a53 törzs extracelluláris frakciójában hat β -laktamáz aktivitással bíró fehérjét is detektáltam, bár igazán jelentős aktivitást csak egy, a 2. mutatott. A fehérjék főként a savas régióban helyezkedtek el ebben az esetben is (pI 3, 4-5), egy fehérje pedig a bázikus (pI 9-10) tartományban (24. ábra).



24. ábra: Az a53 törzs extracelluláris β -laktamáz aktivitású fehérjeinek detektálása. A bal oldali gélben regeneráltuk a fehérjéket és detektáltuk a nitrocefin-bontó aktivitásukat. A jobb oldali CBB G-250-nel festett gélen piros körök jelzik az azonosításra elkülöltött fehérjéket. A gélek levágott sarkában a + szimbólum a pH 3 véget jelzi.

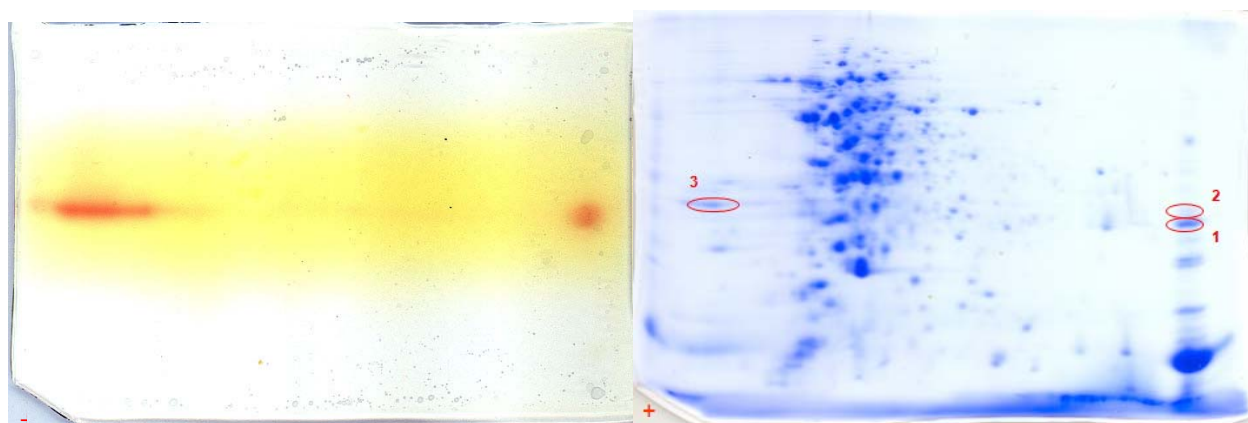
A tömegspektrometriás analízis során kiderült, hogy az 1. (25 illeszkedő csúcs 32 detektáltból, 68%-os szekvencia-lefedettség), a 2. (24 illeszkedő csúcs 35 detektáltból, 60%-os szekvencia-lefedettség,) és 6. (22 illeszkedő csúcs 37 detektáltból, 49%-os szekvencia-lefedettség) minta ebben az esetben is a BlaZ penicillináz. A 2. mintában a PSD megerősítette az m/z : 2085.05, $^{150}\text{VTNPVRYEIELNYYSPK}^{166}$ szekvencia jelenlétét. A 4. mintában a gi|13549150, leukocidin LukS komponenst mutatta ki az analízis, 17 csúcs illeszkedik a detektált 28-ból erre a fehérjére, a szekvencia-lefedettség 47%, és az m/z : 1548,59 fragment

PSD-vel a $^{221}\text{GSSDTSEFEITYGR}^{234}$ szekvenciának felel meg. Ebben a mintában még α -hemolizint is kimutattunk (gi|2914569, Chain A), a maradék 11 csúcsból 9 illeszkedett erre a fehérjére, 30%-os szekvencia-lefedettség mellett. Az 5. mintában a gi|5822083 Chain A, Leukocidin F (Hlgb) volt jelen, 14 illeszkedő csúcsot találtunk 16 detektáltból, 39%-os szekvencia-lefedettség mellett, a PSD megerősítette az m/z: 1646,72, $^{219}\text{SNFNPEFLSVLSHR}^{232}$ peptid jelenlétét. A 3. foltban 31 detektált csúcsból 19 illett a gi|21283483 SplB szerin proteázra (40%-os szekvencia-lefedettség), PSD-vel megerősítettük az m/z: 1798,83, $^{43}\text{VKDTNIFPYTGVVAFK}^{58}$ peptid jelenlétét. A fehérjének nem ismert a lehetséges szerepe a β -laktámok bontásában, viszont az 14287/1 törzs esetében is kimutattuk a jelenlétét.

4.7.7.2. Az a53 törzs membránfrakciójában azonosított β -laktamáz aktivitással rendelkező fehérjék

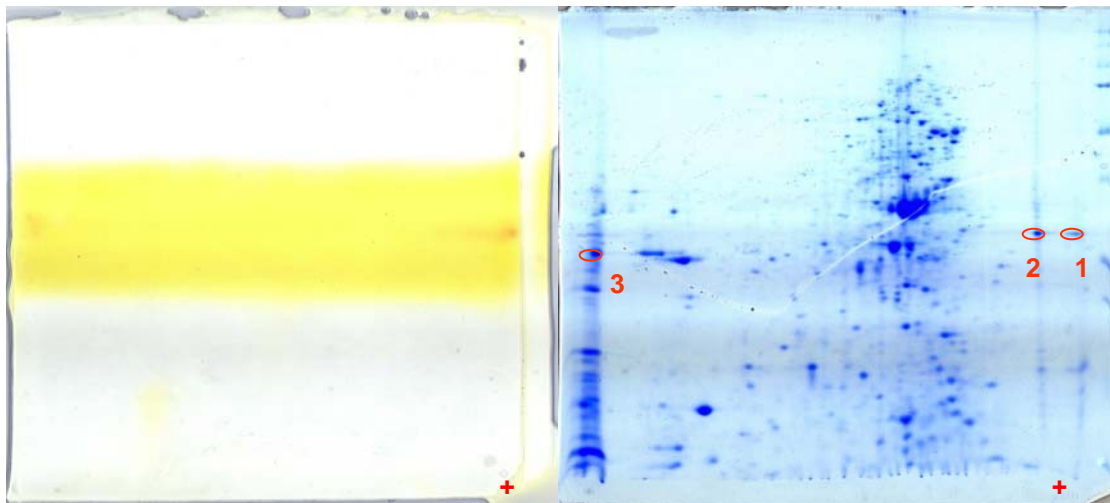
A törzs membránfrakcióját először ugyanolyan módszerekkel izoláltuk, mint az összes többi törzs esetében. A törzs nagyfokú lizozim-rezisztenciája miatt több tenyészetből sikerült csak kis mennyiségű membránt izolálni, 2 mg/ml lizozim koncentráció alkalmazásával. Először ebben az esetben is 7 cm-es IEF gélsíkot alkalmaztunk a fehérjék izoelektromos pont szerinti elválasztására. Három aktív foltot tudtunk detektálni, egyet pH 3-4, és kettőt pH 9-10 tartományban (25. ábra).

Az elemzés során csak a 3. mintából sikerült valóban β -laktamázt kimutatnunk, mely szintén a BlaZ volt, a másik két mintában csak lizozimot találtunk.



25. ábra: Az a53 törzs membrán β -laktamáz aktivitású fehérjéinek detektálása. A bal oldali gélben regeneráltuk a fehérjéket és detektáltuk a nitrocefin-bontó aktivitásukat. A jobb oldali CBB G-250-nel festett gélen piros körök jelzik az azonosításra elküldött fehérjéket. A gélek levágott sarkában a + szimbólum a pH 3 véget jelzi.

Mivel az olasz kutatócsoport úgy gondolta, hogy jelentős oxacillináz aktivitása miatt ebből a törzsből mindenképpen ki lehet mutatni az oxacillinázt, ezért megismételtük a kísérletet, ezúttal mellőzve a membrán izolálásakor használt lizozimot és X-press-szel feltárva a sejteket, illetve 17 cm-es pH 3-10 IEF gélcsíkon végezve az izoelektromos pont szerinti elválasztást. A gélen szintén három aktív foltot tudtunk detektálni, de ezúttal kettőt a savas (1.: pH 3; 2.: pH 4) és egy nem túl aktív foltot a bázikus (3.: pH 9-10) régióban (26. ábra).



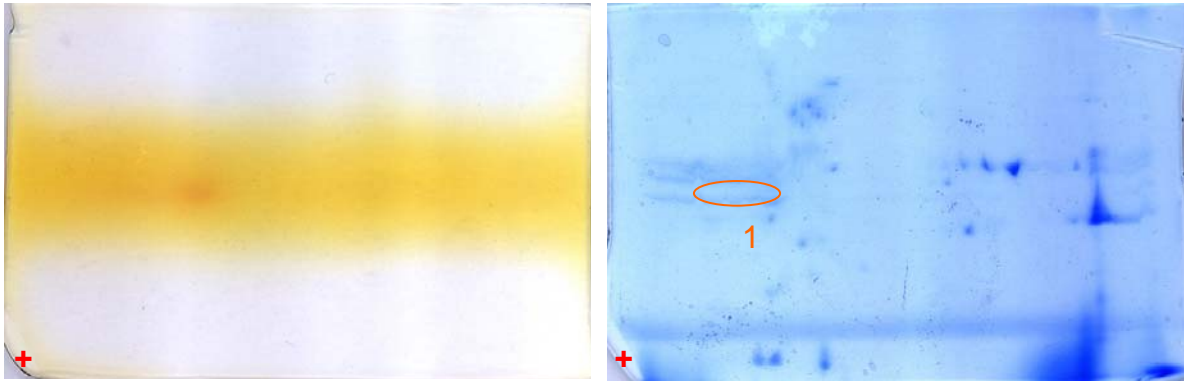
26. ábra: Az a53 törzs membrán β -laktamáz aktivitású fehérjéinek detektálása. A bal oldali gélben regeneráltuk a fehérjét és detektáltuk a nitrocefin-bontó aktivitásukat. A jobb oldali CBB G-250-nel festett gélen piros körök jelzik az azonosításra elküldött fehérjéket. A gélek levágott sarkában a + szimbólum a pH 3 véget jelzi.

Az azonosítás során az első két minta BlaZ β -laktamáznak bizonyult (13 illeszkedő csúcs 26 detektáltból, 36%-os szekvencia-lefedettség, illetve 30 illeszkedő csúcs 40 detektáltból, 70%-os szekvencia-lefedettség), a 3. foltból csak az L1 50S riboszomális fehérjét sikerült kimutatni (gi|15923528, 16%-os szekvencia-lefedettség).

4.7.8. Az 19599/3A törzs azonosított β -laktamáz aktivitással rendelkező fehérjéi

4.7.8.1. Az 19599/3A törzs fermentlevegében azonosított β -laktamáz aktivitással rendelkező fehérjék

A törzs fermentlevegében egy β -laktamázt sikerült detektálni savas tartományban (pI 4), amint az a 27. ábrán látható.



27. ábra: A 17599/3A törzs extracelluláris β -laktamáz aktivitású fehérjéinek detektálása. A bal oldali gélben regeneráltuk a fehérjéket és detektáltuk a nitrocefín-bontó aktivitásukat. A jobb oldali CBB G-250-nel festett gélen piros kör jelzi az azonosításra elküldött fehérjét. A gélek levágott sarkában a + szimbólum a pH 3 véget jelzi.

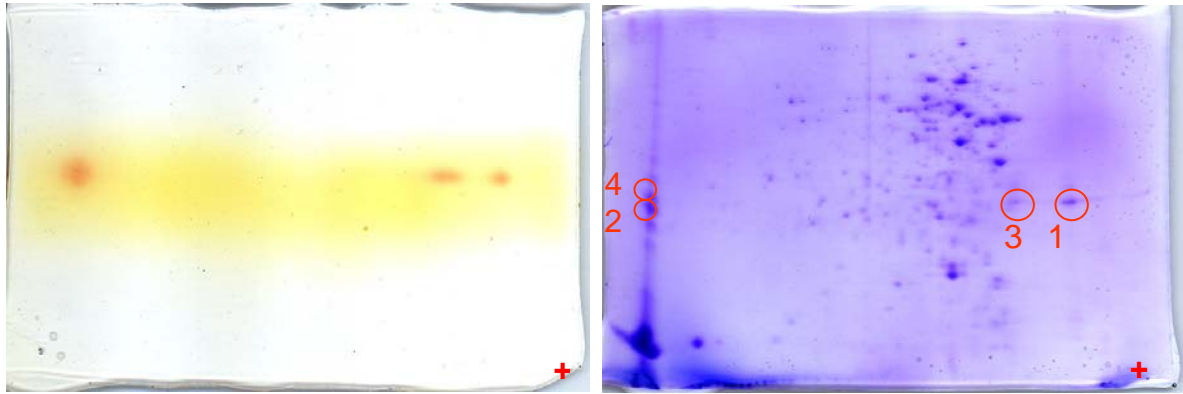
Ez a fehérje is a BlaZ β -laktamáznak bizonyult:

MKKLIFLIVI ALVLSACNSN SSHAKELNDL EKKYNAHIGV YALDTKSGKE
 VKFNSDKRFA YASTSKAINS AILLEQVPYN KLNKKVHINK DDIVAYSPIL
 EKYVGKDITL KALIEASMTY SDNTANNKII KEIGGIKKVK QRLKELGDKV
 TNPVRYEIEL NYYSKSKKD TSTPAAFVK LNKLIANGKL SKENKKFLLD
 LMLNKSQDT LIKDGVPKDY KVADKSGQAI TYASRNDVAF VYPKGQSEPI
 VLVIFTNKDN KSDKPNDKLI SETAKSVMKE F

A tömegspektrométerrel azonosított peptid fragmenteket félkövér piros betűtípussal jelöltem.

4.7.8.2. Az 19599/3A törzs membránfrakciójában azonosított β -laktamáz aktivitással rendelkező fehérjék

A törzs membránfrakciójában négy β -laktamáz aktivitással rendelkező fehérjét detektáltunk, kettőt savas (1.: pH 4; 2.: pH 5), kettőt bázikus (2., 4.: pH 9-10) tartományban (28. ábra).



28. ábra: A 17599/3A törzs membránkötött β -laktamáz aktivitású fehérjéinek detektálása. A bal oldali gélben regeneráltuk a fehérjét és detektáltuk a nitrocefín-bontó aktivitásukat. A jobb oldali CBB R-250-nel festett gélen piros körök jelzik az azonosításra elküldött fehérjéket. A gélek levágott sarkában a + szimbólum a pH 3 véget jelzi.

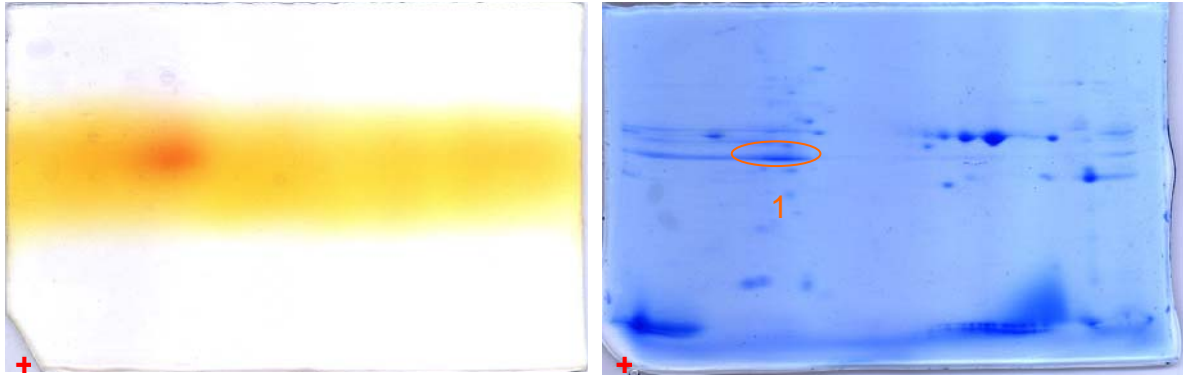
Mind a négy enzimet a BlaZ penicillinázként azonosítottuk. Az alábbi szekvenciában piros félkövér betűtípussal jelöltem az 1., 3. és 4. mintában detektált fragmenteket, normál vörössel a csak a 4. mintában, félkövér kékkel az 1. és 4. mintában, normál kékkel a csak az 1. és dőlttel a 2. mintában is megtalálható részeket:

MKKLIFLIVI ALVLSACNSN SSHAKELNDL **EKKYNAHIGV YALDTKSGKE**
 VKFNSDKRFA **YASTSKAINS AILLEQVPYN KLNKKVHINK DDIVAYSPIL**
EKYVGKDITL KALIEASMTY SDNTANNKII KEIGGIKKVK QRLKELGDKV
TNPVRYEIEL NYSPKSKKD TSTPAAFGKT LNKLIANGKL SKENKK**FLLD**
LMLNNKSGDT LIKDGVPKDY KVADKSGQAI TYASRNDVAF VYPKGQSEPI
VLVIFTNKDN KSDKPNDKLI SETAKSVMKE F

4.7.9. Az 19599/3B törzs azonosított β -laktamáz aktivitással rendelkező fehérjei

4.7.9.1. Az 19599/3B törzs fermentlevében azonosított β -laktamáz aktivitással rendelkező fehérjék

E törzs fermentlevében is csak egy β -laktamázt sikerült detektálni a savas (pH 4) régióban (29. ábra).



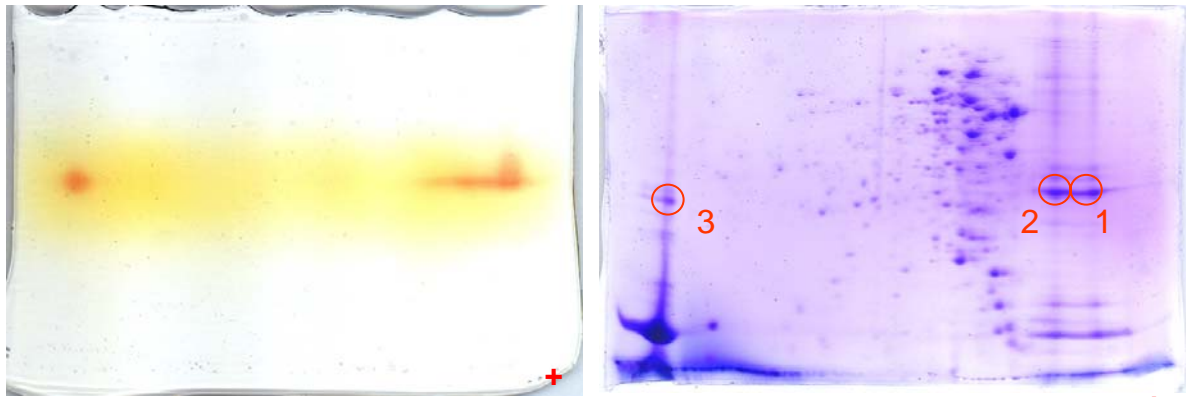
29. ábra: A 17599/3B törzs extracelluláris β -laktamáz aktivitású fehérjéinek detektálása. A bal oldali gélben regeneráltuk a fehérjéket és detektáltuk a nitrocefín-bontó aktivitásukat. A jobb oldali CBB G-250-nel festett gélen piros kör jelzi az azonosításra elküldött fehérjét. A gélek levágott sarkában a + szimbólum a pH 3 véget jelzi.

Az azonosított enzim szintén a *blaZ* által kódolt penicillináz. A detektált peptideket kiemeltem félkövér vastag betűvel a szekvenciában:

MKKLIFLIVI ALVLSACNSN SSHAK**ELNDL EKKYNAHIGV YALDTKSGKE**
 VKFNSDKR**FA YASTSKAINS AILLEQVPYN KLNKKVHINK DDIVAYSPIL**
EKYVGKDITL KALIEASMTY SDNTANNKII KEIGGIKKVK QRLKELGDKV
TNPVRYEIEL NYYS PKSKKD TSTPAAFGKT LNKLIANGKL SKENK**KFLLD**
LMLNNKSGDT LIKDGVPKDY KVADKSGQAI TYASRNDVAF VYPKGQSEPI
VLVIFTNKDN KSDKPNDKLI SETAKSVMKE F

4.7.9.2. Az 19599/3B törzs membránfrakciójában azonosított β -laktamáz aktivitással rendelkező fehérjék

A 17599/3B törzs esetében három β -laktamázt detektáltunk a gélen, kettő savas (1.: pH 4; 2.: pH 5), egy bázikus (3.: pH 9-10) pH-nál jelent meg (30. ábra).



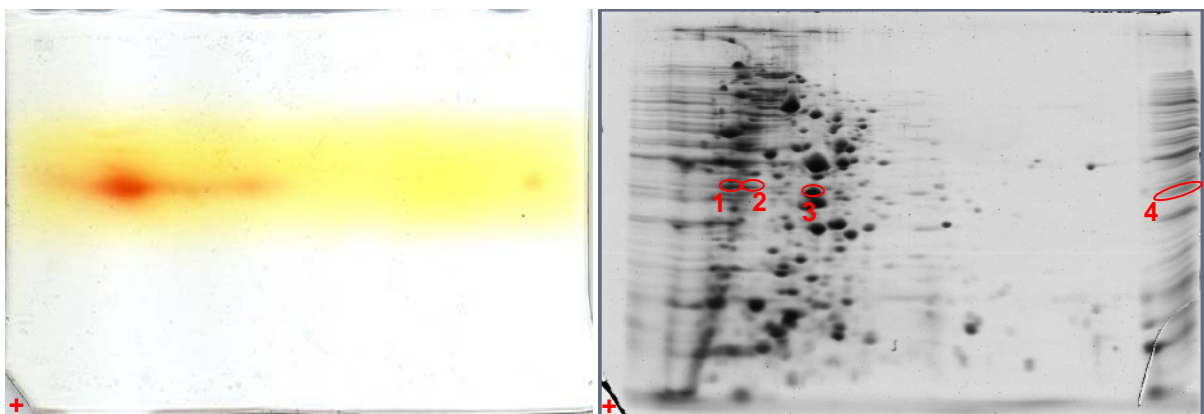
30. ábra: A 17599/3B törzs membránkötött β -laktamáz aktivitású fehérjéinek detektálása. A bal oldali gélben regeneráltuk a fehérjéket és detektáltuk a nitrocefín-bontó aktivitásukat. A jobb oldali CBB G-250-nel festett gélen piros körök jelzik az azonosításra elküldött fehérjéket. A gélek levágott sarkában a + szimbólum a pH 3 véget jelzi.

Mind a három fehérje a BlaZ penicillináz volt.

4.7.10. A 7789/47 törzs azonosított β -laktamáz aktivitással rendelkező fehérjei

4.7.10.1. A 7789/47 törzs fermentlevében azonosított β -laktamáz aktivitással rendelkező fehérjék

A nitrocefínnel előhívott gélen két aktív foltot tudtunk detektálni, de a párhuzamos gélen nem volt egyértelmű, hogy melyik folt lehet az aktivitás forrása, így összesen négy fehérjét analizáltunk (31. ábra).



31. ábra: A 7789/47 törzs extracelluláris β -laktamáz aktivitású fehérjéinek detektálása. A bal oldali gélben regeneráltuk a fehérjéket és detektáltuk a nitrocefín-bontó aktivitásukat. A jobb oldali CBB G-250-nel festett gélen piros körök jelzik az azonosításra elküldött fehérjéket. A gélek levágott sarkában a + szimbólum a pH 3 véget jelzi.

Végül is a 2. jelű minta bizonyult az aktivitás forrásának, ebből a pöttyből sikerült kimutatni a BlaZ penicillinázt. Az LC-MS-sel azonosított peptidek az alábbi táblázatban láthatók:

12. Táblázat: A 2. mintában LC-MS-sel azonosított fragmentek.

Mr(obs): observed molecular weight = tapasztalt molekulatömeg; **Mr(expt):** expected molecular weight = várt molekulatömeg; **Mr(calc):** calculated molecular weight = számolt molekulatömeg; **ΔDa:** a várt és a számolt molekulatömeg különbsége; **Ion's score:** ionra számított pontérték

Mr(obs)	Mr(expt)	Mr(calc)	ΔDa	szekvencia	ion's score
721.5600	1441.1054	1440.7249	0.3806	³⁴ YNANIGVYALDTK ⁴⁶	89
437.8300	873.6454	873.4232	0.2222	⁵⁹ FAYASTSK ⁶⁶	29
844.1200	1686.2254	1685.9352	0.2903	⁶⁷ AINSAILLEQVPYNK ⁸¹ Methyl (DE)	73
563.2500	1686.7282	1685.9352	0.7930	⁶⁷ AINSAILLEQVPYNK ⁸¹ Methyl (DE)	23
656.9400	1967.7982	1967.0728	0.7254	⁸⁶ VHINKDDIVAYSPILEK ¹⁰² Methyl (DE)	43
518.9500	1035.8854	1035.5964	0.2890	¹⁰³ YVGKDITLK ¹¹¹	32
343.2900	684.5654	684.3919	0.1736	¹⁵⁰ VTNPVR ¹⁵⁵	21
343.3000	684.5854	684.3919	0.1936	¹⁵⁰ VTNPVR ¹⁵⁵	27
561.9300	1121.8454	1121.5717	0.2738	¹⁶⁹ KDTSTPAAFGK ¹⁷⁹	82
497.9200	993.8254	993.4767	0.3487	¹⁶⁹ KDTSTPAAFGK ¹⁷⁹	35
308.3900	614.7654	614.3751	0.3903	¹⁸⁴ LIANGK ¹⁸⁹	25
380.8900	759.7654	759.4127	0.3528	²⁰⁷ NGDTLIK ²¹³	40
380.9100	759.8054	759.4127	0.3928	²⁰⁷ NGDTLIK ²¹³	33
527.4400	1052.8654	1052.5251	0.3404	²²⁶ SGQAITYASR ²³⁵	89
526.8900	1051.7654	1051.5338	0.2316	²³⁶ NDVAFVYPK ²⁴⁴	43
527.0400	1052.0654	1051.5338	0.5316	²³⁶ NDVAFVYPK ²⁴⁴	60
773.1500	1544.2854	1543.8610	0.4245	²⁴⁵ GQSEPIVLVIFTNK ²⁵⁸	87
780.0900	1558.1654	1557.8766	0.2888	²⁴⁵ GQSEPIVLVIFTNK ²⁵⁸ Methyl (DE)	54
381.3400	760.6654	760.4330	0.2324	²⁶⁹ LISSETAK ²⁷⁵	44

Az adatbázisban az azonosított fragmentek két BlaZ variánsra is illeszkedtek, egy-egy fragment pedig, melyeket félkövér betűtípussal emeltem ki a táblázatban, csak egy-egy variánsra volt jellemző (szekvencia-lefedettség: összesen 42%). Az egyik azonosított BlaZ variáns a gi|33416277 NCBI GI azonosítási számú úgynevezett referencia szekvencia (22%-os szekvencia-lefedettség), a másik ennek egy kb. 7%-ban eltérő variánsa, a gi|3603441 azonosítási számú, b-típusú β-laktamáznak nevezett fehérje (23%-os szekvencia-lefedettség).

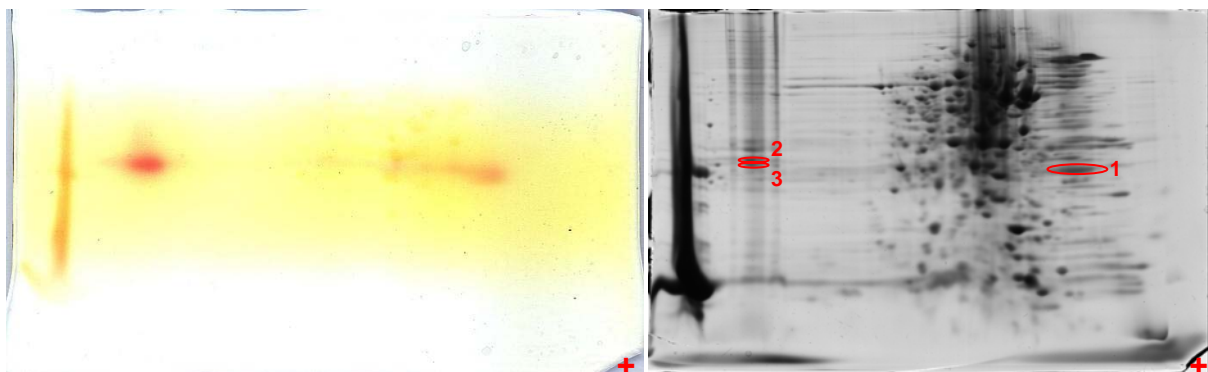
A vastagított ²⁴⁵GQSEPIVLVIFTNK²⁵⁸ a gi|33416277 azonosítási számú BlaZ fehérjére jellemző, a gi|3603441 számúban nincs jelen, bár ennek az is lehet oka, hogy esetleg a rekord

nem a teljes szekvenciát tartalmazza. A $^{34}\text{YNA}\underline{\text{N}}\text{IGVYALDTK}^{46}$ peptid a gi|3603441 számú variánsból származik, mert a referencia szekvenciában az aláhúzott N (aszparagin) helyén H (hisztidin) van.

Az 1. minta keverék volt, egy gi|15925406 azonosítási számú foszfoglicerát mutázt azonosítottunk benne (44 detektált csúcsból 22 illeszkedett, 53%-át lefedve a szekvenciának), a 44 detektált csúcs másik fele (23 csúcs) illeszkedett a gi|21283860 számú MW2131 hipotetikus fehérjére (46%-os szekvencia-lefedettség). A 3. mintából triózfoszfát-izomerázt (gi|15923764) lehetett kimutatni (49 detektált csúcsból 25 illeszkedett, 72% szekvencia-lefedettség, PSD-vel megerősítettük az m/z: 1703,82, $^{163}\text{SVVIAYEPIWAIGTGK}^{178}$ peptid jelenlétét); a 4. mintában 30%-os szekvencia-lefedettséggel ugyanez a fehérje, és 46%-os szekvencia-lefedettséggel a gi|21283450 azonosítási számú transzaldoláz is fellelhető volt.

4.7.10.2. A 7789/47 törzs membránfrakciójában azonosított β -laktamáz aktivitással rendelkező fehérjék

A törzs membránfrakciójában három β -laktamáz aktivitással rendelkező fehérjét sikerült detektálni a bázikus pH tartományban (1.: pH 9; 2.: pH 10), amint a 32. ábrán látható.



32. ábra: A 7789/47 törzs membránkötött β -laktamáz aktivitású fehérjeinek detektálása. A bal oldali gélben regeneráltuk a fehérjéket és detektáltuk a nitrocefín-bontó aktivitásukat. A jobb oldali CBB G-250-nel festett gélen piros körök jelzik az azonosításra elküldött fehérjéket. A gélek levágott sarkában a + szimbólum a pH 3 véget jelzi.

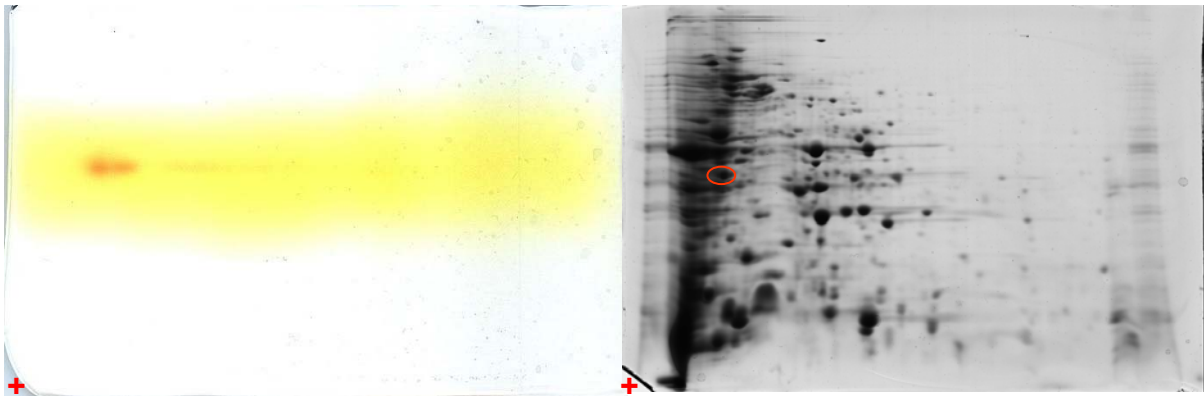
Az 1. fehérjét nem sikerült azonosítani (még LC-MS-sel is csak lizozimot lehetett kimutatni a mintából). A kettes számút „type b” β -laktamázként határoztuk meg (gi|3603441, 29 detektált csúcsból 20 illeszkedett 60%-os szekvencia-lefedettség mellett), a harmadik pedig egy gi|49484630 azonosítási számú extracelluláris oldott anyag-kötő lipoproteinnek bizonyult (26-

ból 15 illeszkedő csúcs, 50%-os lefedettség, PSD-vel megerősítve: m/z : 1714.9000, $^{112}\text{FSKPYTFSSAVLVIR}^{126}$).

4.7.11. A 7789/98 törzs azonosított β -laktamáz aktivitással rendelkező fehérjei

4.7.11.1. A 7789/98 törzs fermentlevében azonosított β -laktamáz aktivitással rendelkező fehérjék

A törzs elektroforetogramján csak egy β -laktamáz aktivitással rendelkező foltot azonosítottunk a savas (pH 4) régióban (33. ábra).



33. ábra: A 7789/98 törzs extracelluláris β -laktamáz aktivitású fehérjeinek detektálása. A bal oldali gélben regeneráltuk a fehérjéket és detektáltuk a nitrocefin-bontó aktivitásukat. A jobb oldali CBB G-250-nel festett gélen piros körök jelzik az azonosításra elküldött fehérjéket. A gélek levágott sarkában a + szimbólum a pH 3 véget jelzi.

A fehérje szintén a BlaZ penicillináznak bizonyult. MALDI-TOF detektorral 19 detektált peptidből 9 illeszkedett a BlaZ fehérjére, ez 34,2%-os szekvencia-lefedettséget jelent. LC-MS/MS-sel a 13. táblázatban felsorolt peptideket azonosítottuk.

A spektrum vizsgálatokor, egy újabb lekeresés alkalmával 16 detektált fragmentumból 13-at illesztett a program a BlaZ fehérjére. Ezek között volt négy olyan csúcs, mely nem illeszkedett az előzőekben azonosított gi|33416277 azonosítási számú referencia BlaZ szekvenciára. Ezeket a 14. táblázatban tüntettem fel. A 34. ábrán látható a mintában jelenlévő β -laktamáz és a többi mintában detektált gi|33416277 β -laktamáz tipikus MALDI-TOF MS tömeg spektruma (az 14287/1 / E3 mintából). Az ábrán csillaggal jelöltem meg azokat a fragmentumokat, melyek csak az adott azonosított β -laktamázra jellemzőek, és semmiképpen sem lehetnek jelen a másik fehérjében.

13. Táblázat: A mintában LC-MS/MS-sel azonosított fragmentek.

M+H: tömeg és töltés; **m/z:** tömeg/töltés; **ΔDa:** az adatbázisban azonosított és a mért (számolt) tömeg közötti különbség; **Score:** ionra számított pontérték

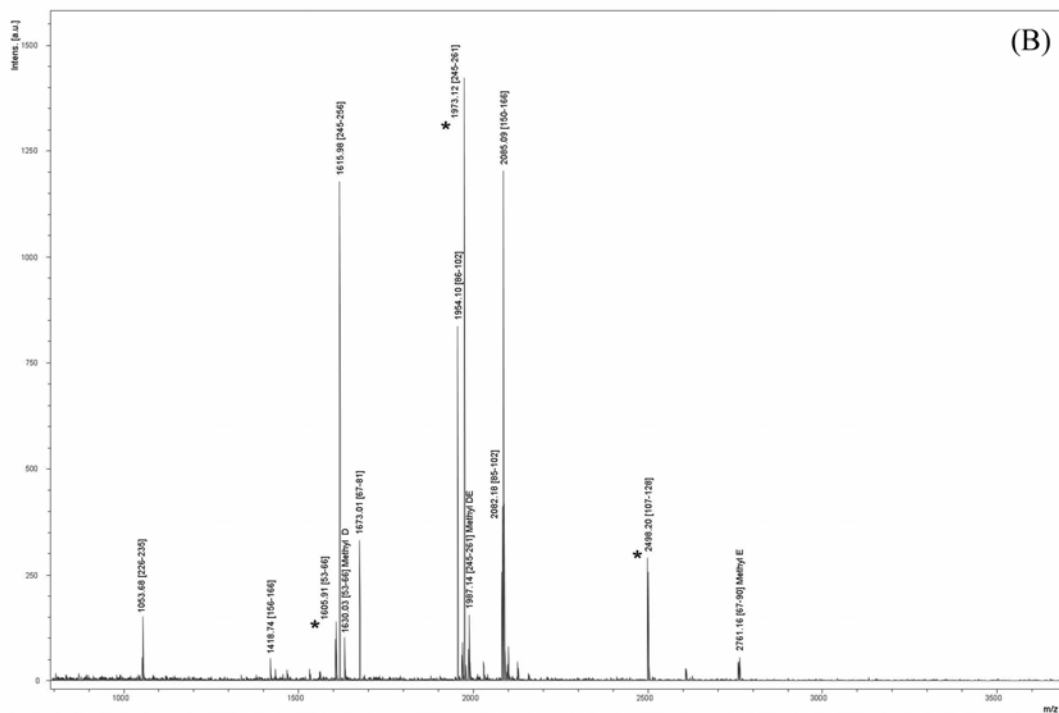
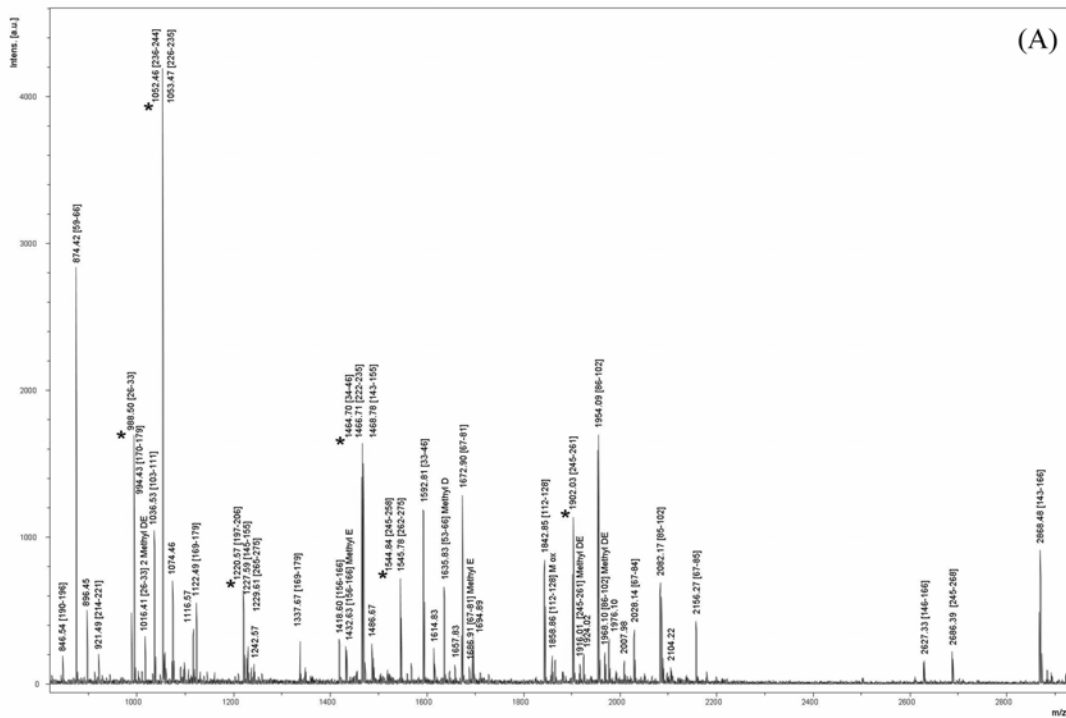
M+H	m/z	ΔDa	peptid	score
1053.2527	527.1300	-0.14	²²⁶ SGQAITYASR ²³⁵	25.9
1052.5327	526.7700	-0.0042	²³⁶ NDVAFVYPK ²⁴⁴	27.0
1954.2254	652.0800	0.054	⁸⁶ VHINKDDIVAYSPILEK ¹⁰²	29.5
1672.8127	836.9100	-0.057	⁶⁷ AINSAILLEQVPYNK ⁸¹	26.6
1418.5527	709.7800	-0.066	¹⁵⁷ YEIELNYYSPK ¹⁶⁷	22.8
994.4127	497.7100	-0.036	¹⁷⁰ DTSTPAAFVK ¹⁷⁹	16.7
874.1727	437.5900	-0.13	⁵⁹ FAYASTSK ⁶⁶	18.0

14. Táblázat: A mintában azonosított fragmentek.

Mr(obs): a spektrumon detektált csúcsok molekulatömege; **Mr(expt):** a gi|33416277 azonosítási számú fehérjére jellemző csúcs molekulatömege

Mr(obs)	szekvencia (gi 67973147)	Mr(expt)	szekvencia (gi 33416277)
1605.91	⁵³ FNADKRFAYASTSK ⁶⁶	1621.77	⁵³ FNSDKRFAYASTSK ⁶⁶
1973.12	²⁴⁵ NQSEPIILVIFTNKDNK ²⁶¹	1902.18	²⁴⁵ GQSEPIVLVIFTNKDNK ²⁶¹
1987,14	²⁴⁵ NQSEPIILVIFTNKDNK ²⁶¹ MethylDE	1916.22	²⁴⁵ GQSEPIVLVIFTNKDNK ²⁶¹ MethylDE
2498.20	¹⁰⁷ DITLKEIEASMKYSDNT ANNK ¹²⁸	2413.68	¹⁰⁷ DITLKALIEASMTYSDNT ANNK ¹²⁸

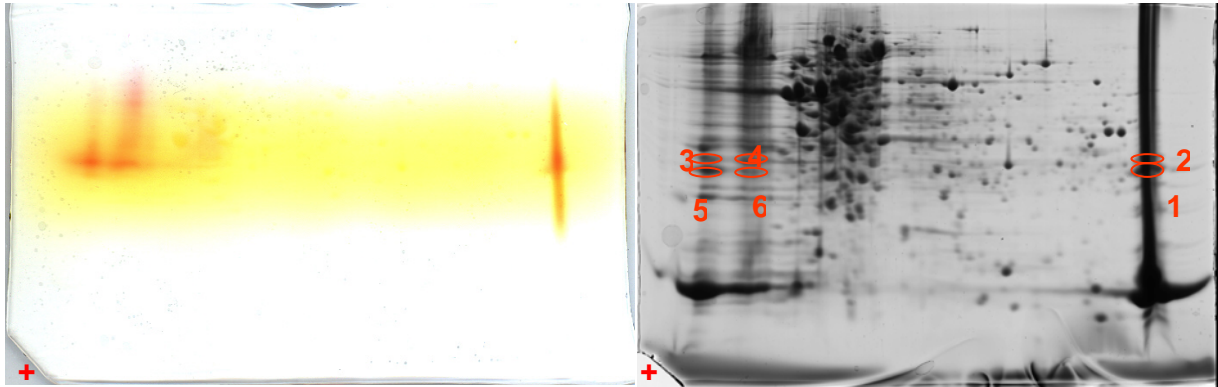
Ami érdekes, hogy az előzőekben detektált ²³⁶NDVAFVYPK²⁴⁴ (1052.19 Da) szekvencia (13. táblázat) a gi|67973147 azonosítási számú variánsban ²³⁶NDVAFIYPK²⁴⁴ (1066.22 Da), vagyis a törzs vagy mindkét β-laktamázzal rendelkezik, vagy egy olyan szekvencia-variánssal, mely még nincs az adatbázisban.



34. ábra: BlaZ szekvenciavariánsok spektrumának összehasonlítása. (A): A gi|33416277 β -laktamáz tipikus MALDI-TOF MS tömeg spektruma (14287/1 / E3 minta). 38 csúcs illaszkedett 43 detektáltból. A megfelelő peptidek a szekvencia 79%-át fedték le. (B): A 7789/98 / E1 minta MALDI-TOF MS spektruma. 13 a detektált 16 csúcsból a gi|67973147 β -laktamáz szekvenciájára illeszkedett. A szekvencia-lefedettség 44% volt. A csillagok az azonosított BlaZ szekvencia-variánsra jellemző peptideket jelölik (amelyek nem jelenhetnek meg a másik variánsban).

4.7.11.2. A 7789/98 törzs membránfrakciójában azonosított β -laktamáz aktivitással rendelkező fehérjék

A regenerált fehérjéket tartalmazó gélen három aktivitást mutató foltot tudunk detektálni (35. ábra). Mivel a párhuzamos gélen nem volt egyértelmű, hogy melyik fehérjéről van szó, így hat foltot küldtem el analízisre (1., 2.: pH 9-10; 3., 5.: pH 3; 4., 6.: pH 4 körül).



35. ábra A 7789/98 törzs membránkötött β -laktamáz aktivitású fehérjéinek detektálása. A bal oldali gélben regeneráltuk a fehérjéket és detektáltuk a nitrocefín-bontó aktivitásukat. A jobb oldali CBB G-250-nel festett gélen piros körök jelzik az azonosításra elküldött fehérjéket. A gélek levágott sarkában a + szimbólum a pH 3 véget jelzi.

Minden foltban lizozimot és riboszómális fehérjéket is találtunk (az 1., 2., 5., 6. foltban még LC-MS-sel sem találtunk más fehérjére utaló peptidfragmentet), de a 3-as és 4-es foltban sikerült kimutatni ezek mellett az adatbázisban „b típusú”-ként feltüntetett β -laktamázt is (gi|3603441). A 3. mintában azonosított fehérje szekvenciájában piros félkövér betűtípussal kiemelve láthatóak az azonosított peptidek (ezeknek a peptideknek a paramétereit a 15. táblázatban tüntettem fel); aláhúzva azok az aminosavak vannak, melyek eltérnek a gi|33416277 azonosítási számú β -laktamáz szekvenciájától:

```
MKKLLLILIAI ALVLSACNST SSHAKELNNL EKKYNANIGV YALDTKSGKE  
VKFNADKRFA YASTSKAINS AILLEQVPYN KLNKKVHINK DDIVAYSPIL  
EKYVGGDITL KELIEASMKY SDNTANNKII NEIGGIKKIK KRLLKLGDKV  
TNPVRYEIEL NYSPKSKKD TSTPAAFGKT LNKLIANGKL SKKNKNFLLD  
LMLNNKNGDT LIKDGVPKDY KVADKSGQAI TYASRNDVAF VYPK
```

15. Táblázat: A 3. mintában LC-MS-sel azonosított fragmentek.

Mr(obs): observed molecular weight = tapasztalt molekulatömeg; **Mr(expt):** expected molecular weight = várt molekulatömeg; **Mr(calc):** calculated molecular weight = számolt molekulatömeg; **ΔDa:** a várt és a számolt molekulatömeg különbsége; **Ion's score:** ionra számított pontérték

Mr(obs)	Mr(expt)	Mr(calc)	ΔDa	szekvencia	ion's score
837.4900	1672.9654	1671.9195	1,0459	⁶⁷ AINSAILLEQVPYNK ⁸¹	47
461.2100	920.4054	919.4684	0.9370	¹¹² ELIEASMK ¹¹⁹	37
366.9200	1097.7382	1097.6193	0.1189	¹⁴⁶ LGDKVTNPVR ¹⁵⁵	34
527.5100	1053.0054	1052.5251	0.4804	²²⁶ SGQAITYASR ²³⁵	80

A 4. mintában azonosított fehérje szekvenciájában piros félkövér betűtípussal kiemeltem az azonosított peptideket (ezeknek a peptideknek a paramétereit a 16. táblázatban tüntettem fel), aláhúzva azok az aminosavak vannak, melyek eltérnek a gi|33416277 azonosítási számú β-laktamáz szekvenciájától:

MKKLILLIAI ALVLSACNST SSHAKELNNL EKKYNANIGV YALDTKSGKE
 VKFNADKFA YASTSKAINS AILLEQVPYN KLNKKVHINK DDIVAYSPIL
 EKYVGKDITL KELIEASMKY SDNTANNKII NEIGGIKKIK KRLKKLGDKV
 TNPVRYEIEL NYSPKSKKD TSTPAAFGKT LNKLIANGKL SKKNKNFLLD
 LMLNNKNGDT LIKDGVPKDY KVADKSGQAITYASRNDVAF VYPK

16. Táblázat: A 4. mintában LC-MS-sel azonosított fragmentek.

Mr(obs): observed molecular weight = tapasztalt molekulatömeg; **Mr(expt):** expected molecular weight = várt molekulatömeg; **Mr(calc):** calculated molecular weight = számolt molekulatömeg; **ΔDa:** a várt és a számolt molekulatömeg különbsége; **Ion's score:** ionra számított pontérték

Mr(obs)	Mr(expt)	Mr(calc)	ΔDa	szekvencia	ion's score
785.6500	1569.2854	1568.8198	0.4656	³³ KYNA <u>NIGV</u> YALDTK ⁴⁶	82
438.0700	874.1254	873.4232	0.7022	⁵⁹ FAYASTSK ⁶⁶	33
527.5000	1052.9854	1052.5251	0.4604	²²⁶ SGQAITYASR ²³⁵	65

A 15. és a 16. táblázatban a peptidszekvenciákban az aláhúzott aminosavak a gi|33416277 azonosítási számú referencia BlaZ β-laktamáz szekvenciájához képesti eltéréseket jelölik. Az ¹¹²ELIEASMK¹¹⁹ szekvencia a gi|33416277 azonosítási számú szekvenciában ¹¹²ALIEASMTI¹¹⁹(YSDNTANNK), vagyis itt egy új tripszin hasítóhely keletkezett; a ³³KYNANIGVYALDTK⁴⁶ pedig ³³KYNAHIGVYALDTK⁴⁶.

5. MEGBESZÉLÉS

Napjainkban egyre nagyobb hangsúlyt kapnak azok a kutatások, melyek az újonnan megjelenő rezisztens törzsek okozta fertőzések kezelésére új targeteket és új antibiotikumokat keresnek, illetve fejlesztenek ki. Ami látható, hogy az új antibiotikumok bevezetését követően nagyon hamar, egy-két éven belül megjelennek az első rezisztens törzsek. Úgy tűnik, ez ellen nem sokat tehetünk, legfeljebb azt, hogy az új antibiotikumokat minél körültekintőbben, csak igazán indokolt esetekben alkalmazzuk. Ami szerencsés körülménynek minősülhet, hogy a törzsekben megjelenő rezisztencia extra alkalmazkodást, új fehérje kifejeztetését, új semlegesítő vagy éppen metabolikus útvonal kialakítását, stb. igényel a sejttől, mely, ha sokszor csak kis mértékben is, de csökkenti a sejt életképességét (Hiramatsu, 2009). Ez alatt azt értem, hogy ha az antibiotikum nincs jelen, a rezisztens törzsek hátrányba kerülnek nem rezisztens fajtársaikkal szemben, és kiszelektálódnak vagy elveszítik a rezisztencia kialakításáért felelős gént, esetleg olyan szigorú szabályozást fejlesztenek ki, mely csak lassú reagálást tesz lehetővé az antibiotikum jelenlétében is (Howden, *et al.*, 2010). Az előbbi esetre példa a *Staphylococcus aureus* vancomycin rezisztenciája. *Staphylococcus*-ban a rezisztenciát az *Enterococcus*-okból horizontális géntranszferrel megszerzett *vanA* operon alakítja ki (Perichon & Courvalin, 2009, Palmer, *et al.*, 2010). Magukban az *Enterococcus*-okban más gének is szerepet játszanak a rezisztencia kialakításában (Courvalin, 2006), de ilyen génekkel rendelkező *Staphylococcus*-okat még nem írtak le, valószínűleg az életképesség csökkenése miatt (Hiramatsu, 2009, Howden, *et al.*, 2010). A második esetre példa a *mecA* gén expressziójának szabályozása, mely néha annyira szigorú, hogy a *mecA* génnel rendelkező törzsek között is találunk érzékeny illetve borderline methicillin rezisztenseket is (Chen, *et al.*, 2009). Szintén szerencsés körülménynek kell tekintenünk azt is, hogy habár vannak multirezisztens törzsek, azért a rezisztencia soha nem az összes antibiotikum ellen alakul ki, illetve az új antibiotikumok ellen rezisztenciát kialakító törzsek sokszor érzékenyek a régi antibiotikumok közül jó néhányra (Perichon & Courvalin, 2009). Ezért az új területek úttörő feltárása során nem szabad elfeledkeznünk a már megművelt területek ápolásáról sem, érdemes a már bevált antibiotikumok hatásmechanizmusát, az ellenük fellépő rezisztenciát is újra és újra alapos vizsgálatnak alávetni.

Ilyen jól bevált antibiotikumok a β -laktám vegyületek, hiszen több mint 60 éves múltra tekint vissza az alkalmazásuk. Szemben a fehérjeszintézisre vagy DNS/RNS szintézisre ható antibiotikumokkal csak a baktériumokon fejtik ki hatásukat, lévén a mitokondriumok és az

eukarióta állati sejtek sejtfa nélküliek. Leggyakrabban a penicillináz-rezisztens β -laktám antibiotikumokat alkalmazzák, vagy a nem penicillináz-rezisztens β -laktámokat β -laktamáz gátlókkal kombinációban, melyek még mindig jó hatásfokkal eliminálják a *Staphylococcus aureus* törzsek többségét. Ha az elsőként bevezetett penicillináz-rezisztens methicillint már nem is használják betegek kezelésére, de a vele rokon szerkezetű nafcillin, oxacillin (parenterálisan), flucloxacillin, dicloxacillin (szájon át) az elsődleges választás komolyabb penicillin- (és ampicillin-, amoxicillin-) rezisztens MSSA fertőzések esetén (Rayner & Munckhof, 2005, Gold & Pillai, 2009). A Gram-negatív fajok számos törzse rendelkezik oxacillináz /karbapenamáz (OXA) enzimmel, mely hidrolizálni képes ezeket az antibiotikumokat (Pfeifer, *et al.*, 2010). Varaldo, Massidda, Mingoia munkacsoportja borderline methicillin-rezisztens *Staphylococcus aureus* törzsekben szintén kimutatott egy enzimet, mely szubinhibitorikus koncentrációjú methicillin jelenlétében való tenyésztéskor jelent meg a törzsek membránfrakciójában (Massidda, *et al.*, 1992, Massidda, *et al.*, 1994, Massidda, *et al.*, 1996, Montanari, *et al.*, 1996). Mi ezt az oxacillinázt terveztük azonosítani.

Először borderline methicillin-rezisztens törzseket gyűjtöttünk. Korábbi kísérletek során Dr. Gál Zsuzsanna munkacsoportja (DE OEC Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet) öt BORSA törzset azonosított (VU94, 822, 9800, 9989, 14287/1), ezekkel dolgoztunk tovább (Gál, *et al.*, 2001). Kaptunk törzseket Dr. Rozgonyi Ferenctől (Semmelweis Egyetem, Orvosi Mikrobiológiai Intézet, Budapest) és Dr. Kaszanyitzky Évától (Országos Állategészségügyi Intézet, Budapest), melyek közül oxacillin MIC érték alapján választottuk ki a borderline rezisztenseket. Azokat a törzseket tekintettük borderline rezisztensnek, melyek oxacillin MIC értéke 1-2 $\mu\text{g/ml}$ volt, és ez a MIC klavulánsav illetve szulbaktám hatására 0,5 $\mu\text{g/ml}$ -re vagy az alá csökkent. Négy törzset választottunk ki, melyeket szarvasmarha tőgygyulladásból izoláltak (19599/3A, 19599/3B, 7789/47, 7789/98). Ezeken a törzseken már izolálásuk után végezték a *mecA* kimutatását, mind *mecA* negatívnak bizonyultak (Kaszanyitzky, *et al.*, 2004). A klinikai izolátumokon PBP2a kimutatást végeztünk latex agglutinációs teszttel (Oxoid), az eredményt PCR-rel is megerősítettük (Dr. Ghidán Ágoston, SOTE Orvosi Mikrobiológiai Intézet). A 822-es törzs hordozta a *mecA*-t és a PBP2a ki is fejeződött. Alacsony oxacillin-rezisztenciáját több tényező is magyarázhatja, így például elképzelhető a PBP2a, vagy valamely, a 2.4.2. fejezetben felsorolt, a methicillin-rezisztencia kialakulásában járulékosan résztvevő faktor mutációja. Mivel a törzs oxacillin MIC értéke annak ellenére volt alacsony, hogy a PBP2a átírása megtörtént, és MIC értékek meghatározáskor maximálisan figyelembe vettük a *Staphylococcus aureus* esetében használatos módosításokat, melyek éppen azt

a célt szolgálják, hogy a rezisztens törzsek ne tűnjenek érzékenyek, ezért valószínűleg a PBP2a nem működhet megfelelően ebben a törzsben.

Dr. Massidda és munkatársai megállapították, hogy legalábbis az általuk izolált törzsek esetében az oxacillináz termelésén túl a törzsek fágtípusa is megegyezett, minden törzs az V. fágtípusba tartozott (Massidda, *et al.*, 1996, Montanari, *et al.*, 1996). Úgy gondolják, hogy ez olyan karaktert kölcsönöz a törzseknek, mely hozzájárul a borderline rezisztencia kialakulásához, az oxacillináz aktivitás megjelenéséhez, mert hiába vittek át borderline methicillin-rezisztens törzsből izolált plazmidot érzékeny törzsbe illetve *E. coli*-ba, az oxacillináz aktivitás nem jelent meg (Massidda, *et al.*, 1994, Montanari, *et al.*, 1996). Ezért elvégeztük a törzseink fágtipizálását is. A humán izolátumok a 822-es törzset kivéve mind tipizálódtak az V. fágcsoporthoz tartozó fágokkal, a VU94 még a vegyes típusba tartozókkal is. A bovin izolátumok közül az 19599/3A és 19599/3B szintén tipizálódott az V. fágcsoporthoz tartozó fágjaival, de bovin fágokkal nem volt tipizálható, ezért azt valószínűsítjük, hogy ez a két törzs reverz zoonózissal emberről került át szarvasmarhára. A 7789/98 törzs a II., III., és bovin fágok mellett tipizálódott az V. csoportba tartozó fágokkal, de a 7789/47 nem.

A törzsek oxacillináz aktivitását először spektrofotometriás módszerrel próbáltuk meghatározni. A meghatározást a legígéretesebb két humán törzsön és a bovin izolátumokon végeztük el. Sem teljes sejten, sem a fermentlében nem sikerült oxacillin bontást kimutatni, így biológiai titrálással végeztük el az oxacillináz aktivitás meghatározását a törzsek fermentlevén és membránfrakcióján. A frakciók oxacillináz aktivitása 10^{-4} – 10^{-3} μmol oxacillin /mg teljes fehérje /perc tartományban volt, minden vizsgált törzs indukció nélkül is termelt oxacillint bontani képes enzimet. Methicillin indukció hatására a termelt enzim aktivitása (mennyisége) nőtt, de egyedül a VU94 törzs esetén jelentett ez számottevő növekedést. A leggyengébben az V. fágcsoporthoz tartozó fágokkal nem tipizálódó 7789/47 törzs bontotta az oxacillint.

Az először vizsgált törzsek fermentlevében és membránfrakciójában található fehérjéket molekulatömeg szerint elválasztottuk SDS-poliakrilamid gélen, a fehérjéket regeneráltuk és nitrocefinnel azonosítottuk elhelyezkedésüket. A fermentlében egy, a membránfrakciókban két β -laktamáz aktivitású fehérjét találtunk, a mindkét mintatípusban jelenlévő β -laktamáz molekulatömege 30 kDa körül volt, a másik fehérjéé 14 kDa körül. A 30 kDa-os sávban mi egy fehérjét mutattunk ki, nagyobb gélen néha megjelent két sáv egymás alatt, de nem volt reprodukálható a jelenség.

A mintákat 2-D géleken elemezve kiderült, hogy a kisebb molekulatömegű fehérje a membrán izolálásakor használt lizozim, mely valóban spektrofotometriásan is mérhető mér-

tékben hidrolizálta a nitrocefint és az első generációs cefalosporin cefaloridint. Más antibiotikumokra spektrofotometriásan nem tudunk bontó aktivitást kimutatni.

A lizozim a baktériumok sejtfalának gerincét alkotó glikánlánc N-acetil-muraminsav komponensét ismeri fel, és a N-acetil-muraminsav és a N-acetil-glukózamin közötti glikozid kötéseket hasítja. Korábbi kísérletek során kimutatták (Felsenfeld & Handschumacher, 1967), hogy a penicillin szerkezete, funkciós csoportjainak elhelyezkedése nagyon hasonló a N-acetil-muraminsav szerkezetéhez. Valószínűleg ezért képes a lizozim a penicillinhez kötődni, viszont azt, mint mi is kimutattuk, bontani nem tudja, sőt a penicillinek magas koncentrációja gátolja az enzim működését. Mivel a cefaloridin és a nitrocefín struktúrája némileg eltér a penicillin-típusú vegyületek szerkezetétől, ez lehet a magyarázata annak, hogy a lizozim a molekulához való kapcsolódást követően azt lassan ugyan, de hidrolizálja.

A 30 kDa körüli molekulatömegű, β -laktamáz aktivitással rendelkező fehérjék analízise során leggyakrabban a BlaZ penicillináz enzimet azonosítottuk. Azonosítottunk továbbá más nitrocefín-bontó aktivitást mutató fehérjéket is: α -hemolizint az a53, a36, 9800, 9989, és 14287/1 törzsben; β -hemolizint a 822-es és a 14287/1 törzsben; truncated (csonkolt) β -hemolizint az 14287/1, γ -hemolizint a 9989 törzsben, és más citotoxint és virulencia faktorokat (leukocidint az a53 és a36, SplB serin proteázt az a53 és 14287/1 törzsben). Ezek nagy részéről elmondhatjuk, hogy valószínűleg aspecifikusan, nem eredendő funkciójukból következően bontották a nitrocefint, illetve az is előfordulhatott, hogy nagy mennyiségben való jelenlétük az adott foltban maszkírozta a β -laktamázt (bár ez az LC-MS/MS-sel azonosított fehérjék esetében nem valószínű). Ugyanakkor megállapítást nyert, hogy néhány antibiotikum képes volt serkenteni (Kernodle, *et al.*, 1995), és néhány β -laktamáz inhibitor képes volt gátolni (Tawfik, *et al.*, 1996) a hemolizinek termelődését, vagyis legalábbis a hemolizinek termelése úgy tűnik, kapcsolatban áll β -laktám vegyületek jelenlétével. Ez logikus, hiszen ha megnézzük az 1. és 2. táblázatot, illetve a 2.4.2. fejezetet, látható, hogy a virulencia faktorok termelését olyan szabályozórendszerek regulálják, melyek áttételesen a β -laktám-rezisztenciát befolyásoló faktorok regulációjában is részt vesznek.

A 17. táblázatban összefoglaltam az azonosított β -laktamázok jellemzőit. A táblázatban közölt adatoknál az extracelluláris fehérjéknél MALDI-TOF esetén a szignifikáns csúcsok legalább 42%-a, LC-MS/MS esetén legalább 5 peptid fragment illeszkedett a talált β -laktamázra (kivéve a 822 / M4 mintát). A membránfrakciók analízisének a szignifikáns peptidok legalább 50%-a illeszkedett a fehérje adatbázisban található peptidjeivel MALDI-TOF, és legalább 3 peptid fragment, melyek score-ja 25-nél nagyobb volt LC-MS/MS analízis esetén.

Amint látható, Dr. Massidda és munkatársainak eredményeivel ellentétben (Massidda, *et al.*, 1992) a β -laktamáz aktivitás forrásának minden törzsünk esetében a BlaZ penicillináz bizonyult. Az esetek nagyobbik részében (a biztosan emberről származó, vagy emberről szarvasmarhára átkerült törzsek esetében) a gi|33416277 azonosítási számú referencia szekvenciaként azonosítottuk a mintáinkat (miután a spektrumokat és peptidfragmenteket átnézve ezekben az esetekben nem találtunk olyan részleteket, melyek valamely szekvencia variánsra utaltak volna). A 7789/47 törzsben a gi|3603441 azonosítási számú b-típusúnak nevezett BlaZ variáns volt azonosítható, a 7789/98 törzsben ennek egy hosszabb és kissé különböző variánsa (gi|67973147) az extracelluláris mintákban a gi|33416277 azonosítási számú referencia szekvenciával együtt, a membránfrakciókban a nélkül.

17. Táblázat: Az azonosított β -laktamázok jellemzői.

¹E1, E2, M1, M2, stb. jelöli a különböző aktív foltokat ugyanazon a gélen, az E az extracelluláris, az M a membránkötött fehérjéket jelöli

²Illeszkedés: MALDI-TOF-fal végzett analízis esetén: az azonosított fehérjére illeszkedő csúcsok/detektált csúcsok, LC-MS-sel végzett analízis esetén: az azonosított fehérjére illeszkedő elkülöníthető peptidek száma

³Sequence covered – szekvencia lefedettség, %-ban megadva

⁴Mascot score érték

minta ¹	BlaZ variáns NCBI-GI azonosító	match ²	seq. cov. % ³	MW	pI		PSD vagy Mascot Score vagy MS/MS Search Score
					gél- len	várt	
VU94 / E1	33416277	23/43	55	31349,5	4	9,55	¹²⁵ SGQAITYASR ¹³⁴
VU94 / E2	33416277	25/46	69	31349,5	5	9,55	⁵⁵ NDVAFVYPK ⁶³
VU94 / E3	33416277	26/57	67	31349,5	9	9,55	⁶¹ FAYASTSK ⁶⁸
a53 / E1	33416277	25/32	64	31349,5	3,5	9,55	
a53 / E2	33416277	24/35	60	31349,5	4,5	9,55	¹⁵⁰ VTNPVRYEIE LNYYSK ¹⁶⁶
a53/ E6	33416277	22/37	49	31349,5	9	9,55	
a36 / E1	33416277	17/37	47	31349,5	4,5	9,55	52 ⁴
a36 / E2	33416277	7/14	30	31349,5	5	9,55	
a36 / E3	33416277	17/20	45	31349,5	9	9,55	119 ⁴
822 / E1	33416277	18/27	64	31349,5	4	9,55	⁵⁵ NDVAFVYPK ⁶³
822 / E2	33416277	21/35	46	31349,5	5	9,55	¹²⁵ SGQAITYASR ¹³⁴
822 / E3	33416277	18/25	59	31349,5	9	9,55	⁶¹ FAYASTSK ⁶⁸
9800 / E3	33416277	7	23	31349,5	5	9,55	90
14287/1 / E1	33416277	23/38	58	31349,5	9	9,55	114 ⁴
14287/1 / E4	33416277	11/26	50	31349,5	8	9,55	²³⁶ NDVAFVYPK ²⁴⁴
14287/1 / E7	33416277	38/43	79	31349,5	5	9,55	201 ⁴
14287/1 / E8	33416277	17/23	57	31349,5	4	9,55	102 ⁴

minta ¹	BlaZ vari- áns NCBI-GI azonosító	match ²	seq. cov. % ³	MW	pI		PSD vagy Mascot Score vagy MS/MS Search Score
					gél- len	várt	
17599/3A / E1	33416277	9	31	31349,5	4	9,55	323
17599/3B / E1	33416277	21	64	31349,5	5	9,55	322
7789/47 / E2	3603441	5	23	27197	4,5	9,74	387
7789/47 / E2	33416277	5	22	31349,5	4,5	9,55	381
7789/98 / E1	33416277	9/19	34,2	31349,5	4,5	9,55	166,5
7789/98 / E1	67973147	13/16	44	29205	4	9,72	162,9
VU94 / M1	33416277	26	71	31349,5	9	9,55	385,4
VU94 / M2	33416277	6	24	31349,5	9	9,55	89,36
VU94 / M3	33416277	23	70	31349,5	5	9,55	331,54
VU94 / M4	33416277	29	74	31349,5	4	9,55	465,03
a53 / M1	33416277	13/26	36	31349,5	4	9,55	113 ⁴
a53 / M2	33416277	30/40	70	31349,5	4	9,55	213 ⁴
a36 / M3	33416277	18/51	65	31349,5	4	9,55	⁶⁹ FAYASTSK ⁷⁶
822 / M1	33416277	5	13	31349,5	4,5	9,55	61,47
822 / M2	33416277	6	23	31349,5	5	9,55	88,06
822 / M4	33416277	1	3	31349,5	9	9,55	17,61
9800 / M1	33416277	33	82	31349,5	4,5	9,55	479,83
9800 / M2	33416277	22	71	31349,5	9	9,55	326,37
9989 / M1	33416277	22	70	31349,5	4,5	9,55	337,3
14287/1 / M3	33416277	10/12	40	31349,5	4	9,55	71 ⁴
14287/1 / M4	33416277	15/41	51	31349,5	4	9,55	100 ⁴
17599/3A / M1	33416277	32	79	31349,5	4	9,55	462,3
17599/3A / M2	33416277	11	39	31349,5	9	9,55	160,42
17599/3A / M3	33416277	21	64	31349,5	5	9,55	308,9
17599/3A / M4	33416277	26	76	31349,5	9	9,55	404,04
17599/3B / M1	33416277	36	79	31349,5	4	9,55	560,16
17599/3B / M2	33416277	38	79	31349,5	5	9,55	562,1
17599/3B / M3	33416277	12	45	31349,5	9	9,55	181,87
7789/47 / M2	67973147	28/45	70	29205	8,5	9,72	130 ⁴
7789/98 / M3	3603441	4	17	27197	3,5	9,74	194 ⁴
7789/98 / M4	3603441	3	13	27197	4	9,74	181 ⁴

A b-típusúnak nevezett variáns 7%-ban tér el a referencia szekvenciától. Az eltérő fragmentek közül detektáltuk az 1440 Da molekulatömegű ³⁴YNANIGVYALDTK⁴⁶ triptikus fragmentnek megfelelő peptidet, 89-es inon score-ral. A referencia BlaZ fehérjében H (hisztidin) van az aláhúzott N (aszparagin) helyén. A 7789/47 törzs esetében találtunk egy 1543 Da-os peptidet is, mely a ²⁴⁵GQSEPIVLVIFTNK²⁵⁸ fragmentnek felel meg (ion score 87), és amely megtalálható a gi|33416277 számú BlaZ β-laktamázban. Ez a peptid a gi|3603441 számú β-laktamázban nincs jelen, bár lehet, hogy csak az adatbázisban fellelhető szekvencia nem teljes. A gi|67973147 számú variánsban N (aszparagin) van az aláhúzott G (glicin), és I (izoleucin) az aláhúzott V (valin) helyén. Ez azt jelenti, hogy vagy mind a két

szekvenciavariáns jelen van a törzsben, vagy egy olyan szekvenciavariáns, mely még nem szerepel az adatbázisban. A 7789/98 törzsben egy 1973 Da-os csúcsot detektáltunk ($^{245}\text{GQSEPIVLVIFTNKDNK}^{261}$) az 1902 Da-os helyett ($^{245}\text{NQSEPIILVIFTNKDNK}^{261}$), és más karakterisztikus különbségeket is találtunk, amit a spektrogramokon (34. ábra) csillaggal jelöltem.

A 7789/47 és a 7789/98 törzs membránfrakciója is a referencia szekvenciától kissé különböző variánsokat tartalmazott, az előbbi esetében a gi|67973147, utóbbi esetében a gi|3603441 azonosítási számú szekvenciát azonosítottuk. A 7789/98 törzsnél 1097 Da molekulatömegű peptidet detektáltunk, mely a $^{146}\text{LGDKVTNPVR}^{155}$ triptikus fragmentumnak felel meg (ion score 34). Ez a fragment csak akkor detektálható, ha a 145. aminosav K (lizin, gi|3603441, gi|67973147) és nem E (glutamin sav, gi|33416277). Egy 1568 Da-os peptidet is detektáltunk, mely a $^{33}\text{KYNANIGVYALDTK}^{46}$ peptidnek felel meg (ion score 82), mely a gi|3603441 és a gi|67973147 azonosítási számú BlaZ variánsban van jelen (a gi|33416277 számú szekvencia-variánsban H helyettesíti az aláhúzott N-t). Ez egy új BlaZ szekvencia-variáns jelenlétét valószínűsíti a törzsben. A 7789/47 törzs tömegspektrogramján ugyanolyan különbségeket találtunk, mint a 7789/98 törzs extracelluláris enzimének spektrogramján, vagyis valószínűleg mindkét törzs ugyanazt a szekvencia-variánst tartalmazhatja.

A különböző *Staphylococcus aureus* törzsek adatbázisokban fellelhető β -laktamáz szekvenciái nagyon hasonlóak, de kisebb szekvencia-variációkat találhatunk közöttük. Ezek a variációk érinthetik a fehérje méretét és valószínűsíthetően az aktivitását is (Zawadzke, *et al.*, 1995, Voladri, *et al.*, 1996), ez magyarázhatja, hogy a 7789/98 és 7789/47 (különösen ez utóbbi) nem bizonyult hatékony oxacillin-hidrolizáló törzsnek.

Ami nem várt eredmény, hogy az a36 és a53 törzsekben is csak egyféle β -laktamázt, a BlaZ-t tudtuk kimutatni. Elképzelhető, hogy a második enzim elveszett a törzsből, vagy valamilyen fehérje elfedte, bár ehhez olyan kis mennyiségben kellett jelen lennie, ami ellentétes a feltételezett fontos szerepével a borderline fenotípus létrehozásában. Az első feltételezésnek pedig az mond ellent, hogy plazmidvesztésnél (mivel a törzsek egy plazmiddal rendelkeztek (Massidda, *et al.*, 1994)) a *blaZ*-nek is el kellett volna vesznie. Inkább elképzelhetőnek tartom, hogy eredetileg a két fehérjesáv ugyanazt a fehérjét tartalmazta, csak eltérő molekulatömeggel. Ha megnézzük a 2-D gélek képeit, számos helyen látható hasonló jelenség, pl. a VU94 törzs esetében a 13. ábrán. Bármilyen is az igazság, az olasz kutatócsoport is csak a BlaZ-t tudta transzformálni *Escherichia coli*-ba (Massidda, *et al.*, 1994).

Azt, hogy ugyanannak a fehérjének esetlegesen eltérő molekulatömegű formáit detektáltuk okozhatja a β -laktamáz proteolitikus hatások miatti méretcsökkenése vagy poszttranszlációs

módosítása. A poszttranszlációs módosítások lehetősége nemcsak a molekulatömegbeli, hanem a pI-beli különbségekre is magyarázatot adhat. A BlaZ 23 szerint, 13 treonint és 13 tirozint tartalmaz, melyek foszforilálódhatnak. Ha a fele ezeknek az aminosavnak foszforilált, az eltolhatja a pI-t 9,55-ről 4-re vagy 5-re, és a foszfátcsoportok (MW 95) a fehérje molekulatömegét is megemelhetik (ProMoST = Protein Modification Screening Tool, University of Wisconsin, Madison, Medical College of Wisconsin, Proteomics Center segítségével nyert *in silico* eredmény). A fehérjében jelenlévő 23 aszparagin és 4 glutamin spontán átalakulhat aszparaginsavvá illetve glutaminsavvá, mely szintén befolyásolhatja a pI-t (Zomber, *et al.*, 2005), habár lényegesen kisebb mértékben. Elképzelhető, hogy a módosítás csak az V. fág típusba tartozó törzsekben történik meg (vagy marad el, hiszen a methicillin indukció hatására termelődött enzim volt a kisebb molekulatömegű), ez magyarázhatja, hogy az egyedülként nem ebbe a fág csoportba tartozó 7789/47 törzs esetén miért mértünk alacsonyabb oxacillin-hidrolizáló aktivitást (11. táblázat).

Összefoglalva az új eredményeink a következők:

- 1) Megállapítottuk, hogy az általunk gyűjtött BORSA törzsekre is jellemző, hogy tipizálódnak az V. fág csoportba tartozó fágokkal, és hogy képesek hidrolizálni az oxacillint. Valóban a nem tipizálódó törzsnél mértük a legalacsonyabb oxacillin hidrolízis értéket, de a szintén nem tipizálódó *mecA* hordozó 822-es törzs a legaktívabbnak bizonyult, vagyis a fághordozás az ilyen törzseknél nem előfeltétele az oxacillin-hidrolizáló képességnek (de a *mecA*-val nem rendelkező törzseknél igen).
- 2) Kimutattuk, hogy a membrán izolálásakor használt lizozim rendelkezik antibiotikum-bontó aktivitással. Nitrocefín és cefaloridin esetén spektrofotometriásan is mérhető volt ez az aktivitás.
- 3) Megállapítottuk, hogy a törzsek oxacillin-bontásáért a BlaZ penicillináz a felelős. Minden humán eredetű és a két, reverz zoonózissal szarvasmarhára átkerült törzs esetében a gi|33416277 azonosítási számú BlaZ referencia szekvenciát azonosítottuk.
- 4) A két bovin izolátum BlaZ enzimeit kb. 7%-ban eltértek a humán eredetű törzsek enzimeitől. A törzsek vagy két BlaZ-t tartalmaztak, vagy, ami valószínűbb, egy új szekvenciavariánst.
- 5) Ugyanazt az enzimet markánsan eltérő pI értékeken is detektáltuk a különböző törzseknél (pI 3-5 illetve pI 9-10), ezért valamilyen poszttranszlációs módosítás lehet felelős, *in silico* elemzéssel a foszforiláció a legvalószínűbb. Ez lehet felelős az ~1kDa molekulatömeg-eltérésekért is.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A *Staphylococcus aureus* az egyik legjelentősebb patogén baktérium, ezért a törzsek antibiotikum-rezisztenciájának vizsgálata nagy fontossággal bír. Massidda és munkatársai leírtak egy olyan enzimet borderline methicillin-rezisztens *S. aureus*-ban (BORSA), mely képes volt bontani az oxacillint. Ez a 31 kDa-os enzim methicillin indukció hatására jelent meg a membránfrakcióban, és nem lehetett át-vinni *Escherichia coli*-ba a BlaZ penicillináz génjét hordozó plazmid transzformálásával. A célunk az volt, hogy ezt az oxacillinázt azonosítsuk.

Különböző forrásból származó *S. aureus*-ok közül oxacillin MIC értékek alapján kiválasztottuk a BORSA törzseket, összesen 7 humán és 4 bovin izolátumot. A 4 bovin és 6 humán izolátum *mecA* negatív volt, de a 822-es törzs hordozta a *mecA*-t, esetében a PBP2a nem működhetett megfelelően.

Irodalmi adatok szerint a BORSA törzsek mind az V. fágtypusba tartoznak, és csak az ilyen fágokkal tipizálható MSSA (methicillin-érzékeny *S. aureus*) törzsek váltak borderline rezisztenssé, és mutattak oxacillin-bontó képességet a *blaZ*-t hordozó plazmid transzformálása után. Törzseink esetében az összes humán és három bovin izolátum tipizálódott az V. fágcsoporthoz tartozó fágjaival, kivéve a nem tipizálható 822-es törzset. Ezek közül a bovin izolátumok közül kettő nem volt tipizálható a bovin fágokkal, valószínűleg emberről kerültek át szarvasmarhára.

Biológiai titrálassal megállapítottuk a törzsek oxacillin-bontó aktivitását, ami $10^{-3} - 10^{-4}$ $\mu\text{mol}/\text{mg}$ teljes fehérje/perc közé esett, leggyengébben az V. fágcsoporthoz tartozó fágokkal nem tipizálódó bovine törzs teljesített. Minden törzs indukció nélkül is termelt enzimet, melynek mennyisége növelhető volt methicillin jelenlétében való tenyésztéssel.

Az extracelluláris és a membránkötött fehérjék 1-D majd 2-D SDS-poliakrilamid gél elektroforézise során a gélben β -laktamáz aktivitást detektáltunk. A 30 kDa-os és a 14 kDa-os molekulatömeg-tartományban mutattunk ki enzimaktivitást, és a fehérjéket tömegspektrometriai analízisnek vetettük alá. A 14 kDa-os tartományban detektált fehérje a sejtek feltáráására használt lizozim volt. Spektrofotométerrel meg is tudtuk határozni nitrocefín és cefaloridin bontó aktivitását. A 30 kDa-os tartományban általában több fehérje volt jelen a 2-D géleken, savas (pI 4-5) illetve bázikus (pI 9-10) pH tartományban, melyeket BlaZ-ként azonosítottunk. A két szarvasmarhára adaptálódott törzs esetében szintén a BlaZ volt a β -laktamáz aktivitás fő forrása, de a referencia szekvenciától egy kb. 7%-ban eltérő variáns. Mivel a fragmentek között olyanokat is találtunk, melyek a referencia szekvenciára illeszkedtek, és az adatbázisban fellelhető variánsra nem, ezért feltételezzük, hogy a törzsek β -laktamázának szekvenciája még nem szerepel az NCBI adatbázisban.

Mivel a Dr. Massidda által rendelkezésünkre bocsátott két BORSA törzsben is csak a BlaZ-t tudtuk azonosítani, ezért a végkövetkeztetésünk az, hogy ezek a törzsek nem egy új oxacillináz enzimmel rendelkeznek, hanem a BlaZ penicillináz rendelkezik megnövekedett oxacillináz aktivitással. Feltételezzük, hogy ezt valamilyen posztranszlációs módosítás (vagy éppen egy módosítás elmaradása – eltávolítása) okozhatja, mely magyarázhatja az eltérő pI és kissé eltérő molekulatömeg értékeket is.

SUMMARY

Staphylococcus aureus is one of the most important pathogenic bacterium, so the investigations of the antibiotic-resistance of the strains have crucial importance. Massidda and co-workers described an enzyme in borderline methicillin-resistant *S. aureus* (BORSA), which was also able to hydrolyse oxacillin. This 31-kDa enzyme was found in the membrane fraction after methicillin induction and it could not be transformed to *Escherichia coli* using the plasmid carrying the gene of BlaZ penicillinase. The aim of our study was to identify this enzyme.

We have selected BORSA strains (altogether 7 human and 4 bovine isolates) from different sources according to their oxacillin MIC values. All 4 bovine and 6 of the human isolates were *mecA* negative but strain 822 carried *mecA*. In this latter case the encoded enzyme must have been defective.

According to the published data all of the BORSA strains belong to phage type V. and only MSSA (methicillin-sensitive *S. aureus*) strains typable with group V. phages became borderline resistant and showed oxacillin-hydrolysing ability after the transformation of a *blaZ* bearing plasmid. We have found that all the human isolates except 822 were typable with group V. phages. Three of the bovine isolates were also typable with group V. phages, but interestingly two of these strains were not typable with the bovine phages, so they might had been transferred from human to cow.

The exact oxacillinase activity of the strains was also determined. Oxacillin was hydrolysed at a $10^{-3} - 10^{-4}$ $\mu\text{mol}/\text{mg}$ total protein/minute activity. The slowest hydrolyser was the bovine strain, which was not typable with group V. phages. All the strains produced β -lactamase constitutively and the rate of enzyme production could be increased by culturing the strains in the presence of methicillin.

Extracellular and membrane-bound proteins were separated by 1-D and then by 2-D SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and the in situ β -lactamase activity was detected. We have detected β -lactamases at the 30 kDa and 14 kDa molecular weight range and the proteins were analysed by mass spectrometry. The protein detected at 14-kDa was identified as lysozyme, which was used in our experiment to hydrolyse bacterial cell wall. Its nitrocephin and cephaloridin hydrolysing ability could be determined by spectrophotometric method. 30-kDa proteins with β -lactamase activity were detected both in acidic (pI 4 – 5) and basic (pI 9 – 10) pH ranges. These proteins were identical to the BlaZ. In the case of the two bovine specific strains BlaZ was the main source of the β -lactamase activity, too, however, the identified enzyme was a variant of BlaZ, differing approximately in 7% of its amino acids compared to that of the reference sequence. Since some such fragments were found, which could be fitted to the reference sequence, but not to the identified variant, it was concluded that the sequences of the β -lactamases present in the two bovine specific strains have not been deposited to the NCBI database yet.

Since in the two BORSA strains, kindly provided by Dr. Massidda we detected only BlaZ enzyme, our final conclusion is that these strains do not harbour a new oxacillinase enzyme, but their penicillinases showed elevated oxacillinase activity. The elevated oxacillinase activity could be the consequence of some posttranslational modifications (or the lack of it), which could explain the differences in the pIs and in the molecular weights of the identified β -lactamase enzymes.

7. IRODALOMJEGYZÉK

7.1. Hivatkozások

- Aarestrup FM, Larsen HD, Eriksen NHR, Elsberg CS & Jensen NE (1999) Frequency of alpha- and beta-haemolysin in *Staphylococcus aureus* of bovine and human origin - A comparison between pheno- and genotype and variation in phenotypic expression. *APMIS* **107**: 425-430.
- Barg N, Chambers H & Kernodle D (1991) Borderline susceptibility to antistaphylococcal penicillins is not conferred exclusively by the hyperproduction of β -lactamase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **35**: 1975-1979.
- Barreteau H, Kovac A, Boniface A, Sova M, Gobec S & Blanot D (2008) Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiology Reviews* **32**: 168-207.
- Beise F, Labischinski H & Giesbrecht P (1988) Selective inhibition of penicillin-binding proteins and its effects on growth and architecture of *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiology Letters* **55**: 195-201.
- Bera A, Herbert S, Jakob A, Vollmer W & Gotz F (2005) Why are pathogenic staphylococci so lysozyme resistant? The peptidoglycan O-acetyltransferase OatA is the major determinant for lysozyme resistance of *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology* **55**: 778-787.
- Bera A, Biswas R, Herbert S, Kulauzovic E, Weidenmaier C, Peschel A & Gotz F (2007) Influence of wall teichoic acid on lysozyme resistance in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology* **189**: 280-283.
- Berger-Bächli B & Tschierske M (1998) Role of Fem factors in methicillin resistance. *Drug Resistance Updates* **1**: 325-335.
- Berger-Bächli B, Senn M-M, Ender M, *et al.* (2009) Resistance to β -lactam antibiotics. *Staphylococci in human disease*, (Kent B. Crossley GA, Kimberly Jefferson, Vance G. Fowler Jr., eds.), pp. 170-192. Wiley-Blackwell, Chichester.
- Bignardi GE, Woodford N, Chapman A, Johnson AP & Speller DCE (1996) Detection of the *mecA* gene and phenotypic detection of resistance in *Staphylococcus aureus* isolates with borderline or low-level methicillin resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **37**: 53-63.

- Birko Z, Swiatek M, Szajli E, *et al.* (2009) Lack of A-factor production induces the expression of nutrient scavenging and stress-related proteins in *Streptomyces griseus*. *Mol Cell Proteomics* **8**: 2396-2403.
- Blair JE & Williams RE (1961) Phage typing of Staphylococci. *Bulletin of the World Health Organization* **24**: 771-784.
- Blake KL, O'Neill AJ, Mengin-Lecreux D, *et al.* (2009) The nature of *Staphylococcus aureus* MurA and MurZ and approaches for detection of peptidoglycan biosynthesis inhibitors. *Molecular Microbiology* **72**: 335-343.
- Boneca IG, Huang ZH, Gage DA & Tomasz A (2000) Characterization of *Staphylococcus aureus* cell wall glycan strands, evidence for a new β -N-acetylglucosaminidase activity. *Journal of Biological Chemistry* **275**: 9910-9918.
- Bouhss A, Trunkfield AE, Bugg TDH & Mengin-Lecreux D (2008) The biosynthesis of peptidoglycan lipid-linked intermediates. *FEMS Microbiology Reviews* **32**: 208-233.
- Brakstad OG & Maeland JA (1997) Mechanisms of methicillin resistance in staphylococci. *APMIS* **105**: 264-276.
- Bronner S, Monteil H & Prevost G (2004) Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*: complexity and applications. *FEMS Microbiology Reviews* **28**: 183-200.
- Brown DFJ (2001) Detection of methicillin/oxacillin resistance in staphylococci. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **48**: 65-70.
- Bush K & Sykes RB (1983) β -lactamase inhibitors in perspective. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **11**: 97-107.
- Bush K & Sykes RB (1986) Methodology for the study of β -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **30**: 6-10.
- Candiano G, Bruschi M, Musante L, *et al.* (2004) Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis* **25**: 1327-1333.
- Chen FJ, Hiramatsu K, Huang IW, Wang CH & Lauderdale TLY (2009) Panton-Valentine leukocidin (PVL)-positive methicillin-susceptible and resistant *Staphylococcus aureus* in Taiwan: identification of oxacillin-susceptible *mecA*-positive methicillin-resistant *S. aureus*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **65**: 351-357.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (2011) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement, CLSI document M100-S21. Wayne, PA.

- Courvalin P (2006) Vancomycin resistance in gram-positive cocci. *Clinical Infectious Diseases* **42**: S25-S34.
- Cunningham R, Cockayne A & Humphreys H (1996) Clinical and molecular aspects of the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* bone and joint infections. *Journal of Medical Microbiology* **44**: 157-164.
- de Lencastre H, Oliveira D & Tomasz A (2007) Antibiotic resistant *Staphylococcus aureus*: a paradigm of adaptive power. *Current Opinion in Microbiology* **10**: 428-435.
- Dengler V, Meier PS, Heusser R, Berger-Bächi B & McCallum N (2011) Induction kinetics of the *Staphylococcus aureus* cell wall stress stimulon in response to different cell wall active antibiotics. *BMC Microbiology* **11**: 16.
- Deurenberg RH & Stobberingh EE (2008) The evolution of *Staphylococcus aureus*. *Infection Genetics and Evolution* **8**: 747-763.
- Dramsi S, Magnet S, Davison S & Arthur M (2008) Covalent attachment of proteins to peptidoglycan. *FEMS Microbiology Reviews* **32**: 307-320.
- Felsenfeld H & Handschumacher RE (1967) The interaction between lysozyme and penicillin. *Molecular Pharmacology* **3**: 153-160.
- Foster T (1996) Chapter 12, *Staphylococcus*. *Medical Microbiology*, (Baron S, ed.), University of Texas Medical Branch at Galveston, Galveston.
- Fuda CCS, Fisher JF & Mobashery S (2005) β -Lactam resistance in *Staphylococcus aureus*: the adaptive resistance of a plastic genome. *Cellular and Molecular Life Science* **62**: 2617-2633.
- Gál Z, Kovács P, Hernádi F, Barabás G, Kiss L, Iglói A & Szabó I (2001) Investigation of oxacillin-hydrolyzing β -lactamase in borderline methicillin-resistant clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Chemotherapy* **47**: 233-238.
- Georgopapadakou NH & Sykes. RB (1983) Bacterial enzymes interacting with β -lactam antibiotics. *Antibiotics containing the β -lactam structure II. Handbook of experimental pharmacology.*, Vol. 67/II (Demain AL & Solomon NA, eds.), pp. 1-77. Springer-Verlag, Berlin.
- Giesbrecht P, Kersten T, Maidhof H & Wecke J (1998) Staphylococcal cell wall: Morphogenesis and fatal variations in the presence of penicillin. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **62**: 1371-1414.
- Gold HS & Pillai SK (2009) Antistaphylococcal agents. *Infectious Disease Clinics of North America* **23**: 99-131.

- Goldman RC, Baizman ER, Longley CB & Branstrom AA (2000) Chlorobiphenyl-desleucyl-vancomycin inhibits the transglycosylation process required for peptidoglycan synthesis in bacteria in the absence of dipeptide binding. *FEMS Microbiology Letters* **183**: 209-214.
- Götz F (2004) Staphylococci in colonization and disease: prospective targets for drugs and vaccines. *Current Opinion in Microbiology* **7**: 477-487.
- Hartman BJ & Tomasz A (1986) Expression of methicillin resistance in heterogeneous strains of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **29**: 85-92.
- Hedin G & Lofdahl S (1993) Detecting methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* - disc diffusion, broth breakpoint or polymerase chain reaction. *APMIS* **101**: 311-318.
- Hesketh A, Hill C, Mokhtar J, Novotna G, Tran N, Bibb M & Hong HJ (2011) Genome-wide dynamics of a bacterial response to antibiotics that target the cell envelope. *BMC Genomics* **12**: 226.
- Hiramatsu K (2009) Resistance to glycopeptides. *Staphylococci in human disease*, (Kent B. Crossley GA, Kimberly Jefferson, Vance G. Fowler Jr., eds.), pp. 193-209. Wiley-Blackwell, Chichester.
- Howden BP, Davies JK, Johnson PDR, Stinear TP & Grayson ML (2010) Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications. *Clinical Microbiology Reviews* **23**: 99-139.
- Ito T, Okuma K, Ma XX, Yuzawa H & Hiramatsu K (2003) Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. *Drug Resistance Updates* **6**: 41-52.
- Jaffe RI, Lane JD, Albury SV & Niemeyer DM (2000) Rapid extraction from and direct identification in clinical samples of methicillin-resistant staphylococci using the PCR. *Journal of Clinical Microbiology* **38**: 3407-3412.
- Jones G & Dyson P (2006) Evolution of transmembrane protein kinases implicated in coordinating remodeling of Gram-positive peptidoglycan: inside versus outside. *Journal of Bacteriology* **188**: 7470-7476.
- Kaszanyitzky EJ, Tarpai A, Janosi S, Papp M, Skare J & Semjen G (2002) Development of an antibiotic resistance monitoring system in Hungary. *Acta Veterinaria Hungarica* **50**: 189-197.

- Kaszanyitzky ÉJ, Egyed Z, Jánosi S, *et al.* (2004) Staphylococci isolated from animals and food with phenotypically reduced susceptibility to β -lactamase-resistant β -lactam antibiotics. *Acta Veterinaria Hungarica* **52**: 7-17.
- Kern J, Ryan C, Faull K & Schneewind O (2010) *Bacillus anthracis* surface-layer proteins assemble by binding to the secondary cell wall polysaccharide in a manner that requires *csaB* and *tagO*. *Journal of Molecular Biology* **401**: 757-775.
- Kernodle DS, McGraw PA, Stratton CW & Kaiser AB (1990) Use of extracts versus whole-cell bacterial suspensions in the identification of *Staphylococcus aureus* β -lactamase variants. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **34**: 420-425.
- Kernodle DS, McGraw PA, Barg NL, Menzies BE, Voladri RKR & Harshman S (1995) Growth of *Staphylococcus aureus* with nafcillin in vitro induces alpha-toxin production and increases the lethal activity of sterile broth filtrates in a murine model. *The Journal of Infectious Diseases* **172**: 410-419.
- Kim TK & Chipley JR (1974) Effect of salts on penicillinase release by *Staphylococcus aureus*. *Microbios* **10A SUPPL**: 55-63.
- Kobayashi SD & Deleo FR (2009) An update on community-associated MRSA virulence. *Current Opinion in Pharmacology* **9**: 545-551.
- Komatsuzawa H, Ohta K, Labischinski H, Sugai M & Suginaka H (1999) Characterization of *fmtA*, a gene that modulates the expression of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43**: 2121-2125.
- Kumar JK (2008) Lysostaphin: an antistaphylococcal agent. *Applied Microbiology and Biotechnology* **80**: 555-561.
- Kurlenda J, Grinholc M, Jasek K & Wegrzyn G (2007) Rapid typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: A 7-year experience in a Polish hospital. *Medical Science Monitor* **13**: MT13-MT18.
- Kuroda M, Ohta T, Uchiyama I, *et al.* (2001) Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* **357**: 1225-1240.
- Labischinski H, H. Maidhof, M. Franz, D. Krüger, T. Sidow, P. Giesbrecht (1988) Biochemical and biophysical investigations into the cause of penicillin-induced lytic death of staphylococci: checking predictions of the murosome model. *Antibiotic inhibition of bacterial surface assembly and function.*, (P. Actor LD-M, M. L. Higgins, M. R. J. Salton, G. D. Shockman, eds.), pp. 181-257. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lambie DG & Johnson RH (1985) Drugs and folate metabolism. *Drugs* **30**: 145-155.
- Liu CI, Liu GY, Song YC, *et al.* (2008) A cholesterol biosynthesis inhibitor blocks *Staphylococcus aureus* virulence. *Science* **319**: 1391-1394.
- Liu PY, Huang YF, Tang CW, *et al.* (2010) *Staphylococcus lugdunensis* infective endocarditis: a literature review and analysis of risk factors. *Journal of Microbiology Immunology and Infection* **43**: 478-484.
- Livermore DM (1987) Covalent trapping and latamoxef resistance in β -lactamase-derepressed *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **20**: 7-13.
- Livermore DM (1991) Mechanisms of resistance to β -lactam antibiotics. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* **78**: 7-16.
- Lovering AL, de Castro LH, Lim D & Strynadka NCJ (2007) Structural insight into the transglycosylation step of bacterial cell-wall biosynthesis. *Science* **315**: 1402-1405.
- Lowy FD (2003) Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Investigation* **111**: 1265-1273.
- Margolis PS, Hackbarth CJ, Young DC, *et al.* (2000) Peptide deformylase in *Staphylococcus aureus*: Resistance to inhibition is mediated by mutations in the formyltransferase gene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **44**: 1825-1831.
- Massidda O, Rossolini GM & Satta G (1991) The *Aeromonas hydrophila cphA* gene: molecular heterogeneity among class B metallo- β -lactamases. *Journal of Bacteriology* **173**: 4611-4617.
- Massidda O, Montanari MP & Varaldo PE (1992) Evidence for a methicillin-hydrolysing β -lactamase in *Staphylococcus aureus* strains with borderline susceptibility to this drug. *FEMS Microbiology Letters* **92**: 223-227.
- Massidda O, Montanari MP, Mingoia M & Varaldo PE (1994) Cloning and expression of the penicillinase from a borderline methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strain in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters* **119**: 263-269.
- Massidda O, Montanari MP, Mingoia M & Varaldo PE (1996) Borderline methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains have more in common than reduced susceptibility to penicillinase-resistant penicillins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **40**: 2769-2774.

- McKinney TK, Sharma VK, Craig WA & Archer GL (2001) Transcription of the gene mediating methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* (*mecA*) is corepressed but not coinduced by cognate *mecA* and β -lactamase regulators. *Journal of Bacteriology* **183**: 6862-6868.
- Montanari MP, Massidda O, Mingoia M & Varaldo PE (1996) Borderline susceptibility to methicillin in *Staphylococcus aureus*: a new mechanism of resistance? *Microbial Drug Resistance-Mechanisms Epidemiology and Disease* **2**: 257-260.
- Montecalvo MA (2003) Ramoplanin: a novel antimicrobial agent with the potential to prevent vancomycin-resistant enterococcal infection in high-risk patients. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **51**: 31-35.
- Muthaiyan A, Silverman JA, Jayaswal RK & Wilkinson BJ (2008) Transcriptional profiling reveals that daptomycin induces the *Staphylococcus aureus* cell wall stress stimulon and genes responsive to membrane depolarization. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **52**: 980-990.
- Nailor MD & Sobel JD (2009) Antibiotics for Gram-positive bacterial infections: vancomycin, teicoplanin, quinupristin/dalfopristin, oxazolidinones, daptomycin, dalbavancin, and telavancin. *Infectious Disease Clinics of North America* **23**: 965-982.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards N (2000) Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, Approved standard (M7-A5). Wayne, PA.
- Nikbakht M, Nahaei MR, Akhi MT, Asgharzadeh M & Nikvash S (2008) Molecular fingerprinting of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients and staff of two Iranian hospitals. *Journal of Hospital Infection* **69**: 46-55.
- Noda M, Kawahara Y, Ichikawa A, *et al.* (2004) Self-protection mechanism in D-cycloserine-producing *Streptomyces lavendulae* - Gene cloning, characterization, and kinetics of its alanine racemase and D-alanyl-D-alanine ligase, which are target enzymes of D-cycloserine. *Journal of Biological Chemistry* **279**: 46143-46152.
- Ohlsen K & Donat S (2010) The impact of serine/threonine phosphorylation in *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Medical Microbiology* **300**: 137-141.
- Otsuka J, Kondoh Y, Amemiya T, *et al.* (2008) Development and validation of microarray-based assay for epidemiological study of MRSA. *Molecular and Cellular Probes* **22**: 1-13.
- Palmer KL, Kos VN & Gilmore MS (2010) Horizontal gene transfer and the genomics of enterococcal antibiotic resistance. *Current Opinion in Microbiology* **13**: 632-639.

- Pereira MP & Kelley SO (2011) Maximizing the therapeutic window of an antimicrobial drug by imparting mitochondrial sequestration in human cells. *Journal of the American Chemical Society* **133**: 3260-3263.
- Pereira SFF, Henriques AO, Pinho MG, de Lencastre H & Tomasz A (2009) Evidence for a dual role of PBP1 in the cell division and cell separation of *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology* **72**: 895-904.
- Perichon B & Courvalin P (2009) VanA-type vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **53**: 4580-4587.
- Pfeifer Y, Cullik A & Witte W (2010) Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. *International Journal of Medical Microbiology* **300**: 371-379.
- Pinho MG, de Lencastre H & Tomasz A (2001) An acquired and a native penicillin-binding protein cooperate in building the cell wall of drug-resistant staphylococci. *PNAS* **98**: 10886-10891.
- Plata K, Rosato AE & Wegrzyn G (2009) *Staphylococcus aureus* as an infectious agent: overview of biochemistry and molecular genetics of its pathogenicity. *Acta Biochimica Polonica* **56**: 597-612.
- Poole K (2007) Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. *Annals of Medicine* **39**: 162-176.
- Proctor RA (2008) Role of folate antagonists in the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Clinical Infectious Diseases* **46**: 584-593.
- Rayner C & Munckhof WJ (2005) Antibiotics currently used in the treatment of infections caused by *Staphylococcus aureus*. *Internal Medicine Journal* **35**: S3-S16.
- Resende CA & Figueiredo AMS (1997) Discrimination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from borderline-resistant and susceptible isolates by different methods. *Journal of Medical Microbiology* **46**: 145-149.
- Reynolds PE & Brown DFJ (1985) Penicillin-binding proteins of β -lactam-resistant strains of *Staphylococcus aureus* - effect of growth conditions. *FEBS Letters* **192**: 28-32.
- Sass P, Jansen A, Szekat C, Sass V, Sahl HG & Bierbaum G (2008) The lantibiotic mersacidin is a strong inducer of the cell wall stress response of *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiology* **8**: 186.
- Schlievert PM, Strandberg KL, Lin YC, Peterson ML & Leung DYM (2010) Secreted virulence factor comparison between methicillin-resistant and methicillin-sensitive

- Staphylococcus aureus*, and its relevance to atopic dermatitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **125**: 39-49.
- Schulthess B, Meier S, Homerova D, *et al.* (2009) Functional characterization of the sigma(B)-dependent *yabJ-spoVG* operon in *Staphylococcus aureus*: role in methicillin and glycopeptide resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **53**: 1832-1839.
- Singh VK, Carlos MR & Singh K (2010) Physiological significance of the peptidoglycan hydrolase, LytM, in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiology Letters* **311**: 167-175.
- Somner EA & Reynolds PE (1990) Inhibition of peptidoglycan biosynthesis by ramoplanin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **34**: 413-419.
- Stranden AM, Ehlert K, Labischinski H & Berger-Bächi B (1997) Cell wall monoglycine cross-bridges and methicillin hypersusceptibility in a *femAB* null mutant of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology* **179**: 9-16.
- Tally FP & DeBruin MF (2000) Development of daptomycin for Gram-positive infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **46**: 523-526.
- Tawfik AF, Al-Zamil FA, Ramadan MA & Shibl AM (1996) Effect of β -lactamase inhibitors on normal immune capabilities and their interactions with staphylococcal pathogenicity. *Journal of Chemotherapy* **8**: 102-106.
- Tenover FC (2006) Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *American Journal of Infection Control* **34**: S3-S10.
- Thumanu K, Cha J, Fisher JF, Perrins R, Mobashery S & Wharton C (2006) Discrete steps in sensing of β -lactam antibiotics by the BlaR1 protein of the methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacterium. *PNAS* **103**: 10630-10635.
- Tipper DJ (1985) Mode of action of β -lactam antibiotics. *Pharmacology & Therapeutics* **27**: 1-35.
- Voladri RKR, Tummuru MKR & Kernodle DS (1996) Structure-function relationships among wild-type variants of *Staphylococcus aureus* β -Lactamase: importance of amino acids 128 and 216. *Journal of Bacteriology* **178**: 7248-7253.
- Vollmer W (2008) Structural variation in the glycan strands of bacterial peptidoglycan. *FEMS Microbiology Reviews* **32**: 287-306.
- Vollmer W, Blanot D & de Pedro MA (2008) Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiology Reviews* **32**: 149-167.
- Vollmer W, Joris B, Charlier P & Foster S (2008) Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. *FEMS Microbiology Reviews* **32**: 259-286.

- Vu H & Nikaido H (1985) Role of β -lactam hydrolysis in the mechanism of resistance of a β -lactamase-constitutive *Enterobacter cloacae* strain to expanded-spectrum β -lactams. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **27**: 393-398.
- Wada A & Watanabe H (1998) Penicillin-binding protein 1 of *Staphylococcus aureus* is essential for growth. *Journal of Bacteriology* **180**: 2759-2765.
- Wang QM, Peery RB, Johnson RB, Alborn WE, Yeh WK & Skatrud PL (2001) Identification and characterization of a monofunctional glycosyltransferase from *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology* **183**: 4779-4785.
- Wyke AW, Ward JB, Hayes MV & Curtis NAC (1981) A role in vivo for penicillin-binding protein 4 of *Staphylococcus aureus*. *European Journal of Biochemistry* **119**: 389-393.
- Xia GQ, Kohler T & Peschel A (2010) The wall teichoic acid and lipoteichoic acid polymers of *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Medical Microbiology* **300**: 148-154.
- Yamada S, Sugai M, Komatsuzawa H, Nakashima S, Oshida T, Matsumoto A & Suginaka H (1996) An autolysin ring associated with cell separation of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology* **178**: 1565-1571.
- Yeats C, Finn RD & Bateman A (2002) The PASTA domain: a β -lactam-binding domain. *Trends in Biochemical Sciences* **27**: 438-440.
- Zapun A, Contreras-Martel C & Vernet T (2008) Penicillin-binding proteins and β -lactam resistance. *FEMS Microbiology Reviews* **32**: 361-385.
- Zawadzke LE, Smith TJ & Herzberg O (1995) An engineered *Staphylococcus aureus* PC1 β -lactamase that hydrolyses third-generation cephalosporins. *Protein Engineering, Design and Selection* **8**: 1275-1285.
- Zomber G, Reuveny S, Garti N, Shafferman A & Elhanany E (2005) Effects of spontaneous deamidation on the cytotoxic activity of the *Bacillus anthracis* protective antigen. *Journal of Biological Chemistry* **280**: 39897-39906.
- Zygmunt DJ, Stratton CW & Kernodle DS (1992) Characterization of 4 β -lactamases produced by *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **36**: 440-445.

7.2. A dolgozat alapjául szolgáló saját közlemények



DEBRECENI EGYETEM EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
KENÉZY ÉLETTUDOMÁNYI KÖNYVTÁRA

Iktatószám: DEENKÉTK /9/2012.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

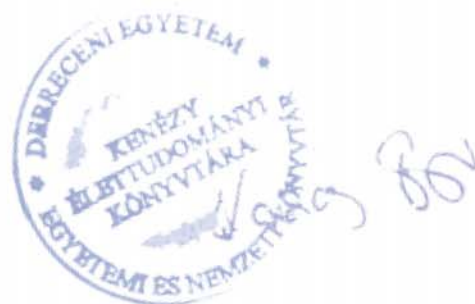
Jelölt: Keserű Judit

Neptun kód: GSJ6QX

Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológiai Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Keserű, J., Szabó, I., Gál, Z., Massidda, O., Mingoia, M., Kaszanyitzky, J.É., Jánosi, S., Hulvely, J., Csorba, A., Buzás, K., Hunyadi-Gulyás, É., Medzihradzky, K.F., Biró, S.:** Identification of beta-lactamases in human and bovine isolates of *Staphylococcus aureus* strains having borderline resistance to penicillinase-resistant penicillins (PRPs) with proteomic methods.
Vet. Microbiol. 147 (1-2), 96-102, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.06.006>
IF:3.256 (2010)
2. **Keserű, J., Gál, Z., Barabás, G., Benkő, I., Szabó, I.:** Investigation of beta-Lactamases in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* for further explanation of borderline methicillin resistance.
Chemotherapy. 51 (6), 300-304, 2005.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1159/000088951>
IF:1.413



7.3. Egyéb saját közlemények



DEBRECENI EGYETEM EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
KENÉZY ÉLETTUDOMÁNYI KÖNYVTÁRA

További Közlemények

3. Birkó, Z., Swiatek, M., Szájli, E., Medzihradzky, K.F., Vijgenboom, E., Penyige, A., **Keserű, J.**, Wezel van, G.P., Biró, S.: Lack of A-factor production induces the expression of nutrient scavenging and stress-related proteins in *Streptomyces griseus*.
Mol. Cell Proteomics. 8 (10), 2396-2403, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1074/mcp.M900194-MCP200>
IF:8.791

4. Penyige, A., **Keserű, J.**, Fazakas, F., Schmelczler, I., Szirák, K., Barabás, G., Biró, S.: Analysis and identification of ADP-ribosylated proteins of *streptomyces coelicolor* M145.
J. Microbiol. 47 (5), 549-556, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12275-009-0032-y>
IF:1.463

5. Kaszanyitzky, J.É., Egyed, Z., Jánosi, S., **Keserű, J.**, Gál, Z., Szabó, I., Veres, Z., Somogyi, P.: Staphylococci isolated from animals and food with phenotypically reduced susceptibility to beta-lactamase-resistant beta-lactam antibiotics.
Acta Vet. Hung. 52 (1), 7-17, 2004.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/AVet.52.2004.1.2>
IF:0.566

Összesített impakt faktor: 15.489

Összesített impakt faktor: (értekezés alapjául szolgáló közlemények esetén): 4.669

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2012.01.17



8. TÁRGYSZAVAK

Tárgyszavak: *Staphylococcus aureus*, borderline methicillin rezisztencia, penicillináz-rezisztens penicillinek, oxacillin, methicillin, BlaZ, proteomika, 2-D gél elektroforézis, tömegspektrometria

Keywords: *Staphylococcus aureus*, borderline methicillin resistance, penicillinase-resistant penicillins, oxacillin, methicillin, BlaZ, proteomics, 2-D gel electrophoresis, mass spectrometry

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm első témavezetőmnek, Dr. Szabó István nyugalmazott tudományos főmunkatársnak, hogy egyetemi hallgatóként csatlakozhattam kutatócsoportjához és megismerhettem ezt a kutatási területet. Köszönöm támogatását és hasznos útmutatásait.

Köszönöm jelenlegi témavezetőmnek, Dr. Biró Sándornak a lehetőséget, hogy irányítása alatt befejezhettem Ph. D. munkámat. Neki is köszönöm, hogy tanácsaival segített és támogatott munkám során.

Köszönettel tartozom Dr. Gál Zsuzsanna tudományos munkatársnak hasznos tanácsaiért, és mert lehetővé tette számomra, hogy kísérleteket végezhsek a Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézetben (illetve a korábbi Gyógyszertani Intézetben) is.

Köszönöm Prof. Dr. Barabás György professor emeritus támogatását, hogy a vezetése alatt álló kutatócsoporthoz csatlakozhattam.

Külön köszönöm Dr. Kiss Ákosné, Szegváriné Erdős Andrea és Juhász Imréné asszisztensnők, és a két intézet valamennyi munkatársának segítségét munkám kivitelezésében.

Végül szeretném megköszönni családomnak, hogy munkám során mellettem álltak és végig támogattak.

Investigation of β -Lactamases in Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus* for Further Explanation of Borderline Methicillin Resistance

Judit Szilvia Keserű^a Zsuzsanna Gál^b György Barabás^a Ilona Benkő^b
István Szabó^a

Departments of ^aHuman Genetics and ^bPharmacology and Pharmacotherapy, University of Debrecen, Debrecen, Hungary

Key Words

Borderline methicillin resistance · β -Lactamase ·
Methicillinase · Membrane-bound ·
Staphylococcus aureus

Abstract

Background: Borderline methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* is due to β -lactamase overproduction and/or specific methicillinases. **Methods:** β -Lactamase activity in culture supernatants and in cytoplasmic membrane fractions was estimated by bioassay and by SDS-PAGE combined with nitrocefin assay. **Results:** During the investigation of borderline methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (BORSA) strains VU94 and 822 two β -lactamases were detected in the membranes, with molecular weights of 13 and 30 kDa. The latter could be found in the culture supernatants, too. In the presence of globomycin, this enzyme disappeared from the membrane, and the oxacillin-hydrolyzing activity of the membrane decreased to the level of susceptible strains. Both β -lactamases were detected in the methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain studied, but the susceptible strains possessed only the first enzyme. **Conclusions:** The 30-kDa β -lactamase proved to be a methicillinase, and it can be one of the main causes of the borderline phenotype of BORSA strains. The other enzyme is one of the smallest β -lactamases published to date.

Copyright © 2005 S. Karger AG, Basel

Introduction

Staphylococcus aureus strains are mostly associated with nosocomial and sometimes with community-acquired infections [1]. They are of great importance because of their wide spectrum of resistance to β -lactam antibiotics. The first penicillinase-stable β -lactam antibiotic, methicillin, was introduced against the penicillin-resistant *S. aureus* strains, but methicillin-resistant strains appeared a few years later [2, 3]. Those strains had an intrinsic resistance, because they produced a new penicillin-binding protein (PBP) with reduced affinity to β -lactam antibiotics [4–7]. This PBP is called PBP2a, and it is encoded by the *mecA* gene. Additionally, Petinaki et al. [8] showed that PBP4 may be involved in the resistance of low-level methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) strains.

Quite different mechanisms were reported for the borderline resistance of *S. aureus* to methicillin and other penicillinase-resistant penicillins. These strains were reported to produce large amounts of β -lactamases and to become susceptible to penicillinase-resistant penicillins in the presence of β -lactamase inhibitors [9, 10]. β -Lactamase hyperproducers belong almost exclusively to the phage group 94/96 and possess a common 17.2-kb β -lactamase plasmid that encodes a type A staphylococcal penicillinase [6, 11]. The borderline phenotype, however, cannot be attributed solely to the hyperproduction of the classic penicillinase since the transformants with β -lactamase

KARGER

Fax +41 61 306 12 34
E-Mail karger@karger.ch
www.karger.com

© 2005 S. Karger AG, Basel
0009-3157/05/0516-0300\$22.00/0

Accessible online at:
www.karger.com/che

Judit Szilvia Keserű
Department of Human Genetics, Medical and Health Science Center
University of Debrecen, PO Box 1
HU-4012 Debrecen (Hungary)
Tel./Fax +36 52 416 531, E-Mail kevia@freemail.hu

plasmid from a borderline overproducing strain remained susceptible to methicillin and oxacillin [12]. Moreover, in some strains a second, methicillin-hydrolyzing membrane-bound β -lactamase (methicillinase) is present [10–13], which can hydrolyze methicillin and oxacillin efficiently. This enzymatic activity is not caused by the penicillinase, since following cloning of the *blaZ* gene from a borderline strain into a multicopy vector and its transfer to an *Escherichia coli* host strain the strain was not able to hydrolyze penicillinase-resistant penicillins [12].

S. aureus retain a substantial proportion of their β -lactamases as hydrophobic membrane-bound forms [10, 13]. The membrane fractions of the studied strains were proven to hydrolyze methicillin, and this activity disappeared when culturing the strains in the presence of the cyclic peptide antibiotic globomycin [13], which inhibits the processing of the precursors of some membrane proteins [14–16].

The aim of this paper is to further characterize the methicillin-hydrolyzing enzymes of two BORSA strains (VU94 and 822) selected by Gál et al. [13].

Materials and Methods

Bacterial Strains and Growth Conditions

S. aureus VU94 (borderline resistant, type A β -lactamase producer) was provided by Dr. D.S. Kernodle (Vanderbilt University, Nashville, Tenn., USA). *S. aureus* 822 (borderline resistant, type A β -lactamase producer), 1931/2 (methicillin resistant, β -lactamase producer) and 10278 (methicillin susceptible) are clinical isolates and ATCC 25923 (methicillin susceptible) is a reference strain from the collection of the Department of Microbiology, Medical and Health Science Center, University of Debrecen. Borderline strains were chosen on the basis of minimum inhibitory concentrations determined by the macrodilution method in the Department of Pharmacology, Medical and Health Science Center, University of Debrecen [13], and on the basis of their oxacillin-hydrolyzing activity [13].

Bacteria were grown in a 1% CY (casein-yeast) broth prepared as described by Novick and Brodsky [17] and supplemented with 0.5 μ g/ml methicillin as inducer of β -lactamase production, or without it as a control culture.

Antimicrobial Agents

Methicillin sodium salt was purchased from Bristol Laboratories, Paris, France, and oxacillin sodium salt from Sigma, St. Louis, Mo., USA. The chromogenic cephalosporin nitrocefin was purchased from Oxoid, London, UK. Globomycin was a generous gift from Dr. Masatoshi Inukai (Sankyo Company, Tokyo, Japan).

Detection of PBP2a

The latex agglutination test (Oxoid) was used to determine the PBP2a production of the strains according to the manufacturer's instructions.

Isolation of Bacterial Membranes

Bacterial membrane fractions were prepared according to Barabás et al. [18].

Detection of β -Lactamases with SDS-PAGE

Membrane and culture supernatant fractions (100 μ g of total protein) were subjected to SDS-PAGE according to Laemmli's method [19]. The resolving gels contained 13% of acrylamide. The gels were run at 35 mA of constant current. After electrophoresis, the gels were soaked in a renaturing buffer for 6–8 h at 37°C [20]. Enzymatic activity was detected directly by nitrocefin, placing the gel on an agar plate containing 100 μ g/ml nitrocefin [21], or during a later period of our research, filter paper strips soaked in 1 mg/ml nitrocefin solution were placed on the appropriate areas of the gels to get sharper bands. After the detection and marking of the β -lactamase bands, the gels were stained with Coomassie brilliant blue R-250.

Rainbow-colored protein molecular weight markers of the low-molecular-weight range (Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK) were used to estimate the molecular weight of the β -lactamases and to estimate their position in the gel before the detection of nitrocefin-hydrolyzing activity.

Measurement of Oxacillin-Hydrolyzing Activity (Bioassay)

50 μ l of culture supernatants or membrane fractions were mixed with 50 μ l of 80 μ g/ml oxacillin. After 30 min of incubation, the decreased oxacillin concentration was measured by agar diffusion method using *Bacillus subtilis* ATCC 6633 as a test strain. The control contained 50 μ l 0.05 M phosphate buffer and the same oxacillin solution as in the case of the samples. The oxacillin-hydrolyzing activity was evaluated after incubation at 37°C for 24 h by measuring the inhibition zones.

Statistical Analysis

Statistical analysis of the data was performed with a statistical software program (GraphPad package) using Student's unpaired t test. Differences were regarded statistically significant at $p < 0.05$.

Results

We had intended to further characterize methicillinase-producing BORSA strains VU94 and 822 described previously by Gál et al. [13] and to compare their β -lactamase production with other non-borderline strains (*S. aureus* 1931/2, MRSA, *S. aureus* 10278 and ATCC 25923, methicillin-susceptible). BORSA strains were selected from several clinical isolates on the basis of the decreased minimum inhibitory concentrations in the presence of β -lactamase inhibitors [13].

Performing the PBP2a latex agglutination test, strain 822 possessed PBP2a, so it seems to be a pre-MRSA with a borderline phenotype.

The membrane proteins were separated by SDS-PAGE and detected by nitrocefin after renaturation of the enzyme. In the renatured electrophoretograms of mem-

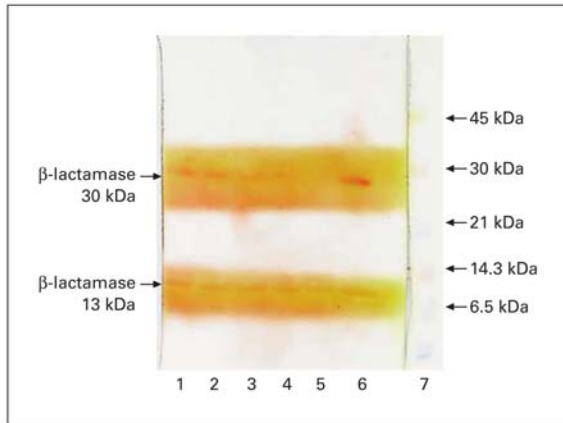


Fig. 1. Detection of the β -lactamase activities in the membranes of two BORSA strains, of a methicillin-susceptible *S. aureus* strain and of an MRSA strain by SDS-PAGE, followed by gel renaturation. Filter paper strips soaked in 1 mg/ml nitrocefin solution were placed on the appropriate areas of the gel. Induced samples were isolated from strains growing in the presence of 0.5 μ g/ml methicillin. Lane 1 = VU94 induced; lane 2 = VU94 not induced; lane 3 = 822 induced; lane 4 = 822 not induced; lane 5 = ATCC 25923 not induced; lane 6 = 1931/2 induced; lane 7 = molecular weight standards.

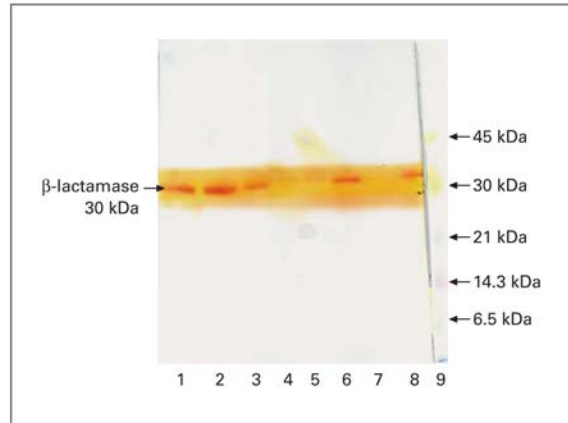


Fig. 3. Detection of the β -lactamase activities in the culture supernatants of two BORSA strains, of two methicillin-susceptible *S. aureus* strains and of an MRSA strain by SDS-PAGE, followed by gel renaturation. Filter paper strips soaked in 1 mg/ml nitrocefin solution were placed on the appropriate area of the gel. Induced samples were isolated from strains growing in the presence of 0.5 μ g/ml methicillin. Lane 1 = VU94 not induced; lane 2 = VU94 induced; lane 3 = 822 not induced; lane 4 = 10278 not induced; lane 5 = 1931/2 not induced; lane 6 = 1931/2 induced; lane 7 = ATCC 25923 not induced; lane 8 = 822 induced; lane 9 = molecular weight standards.

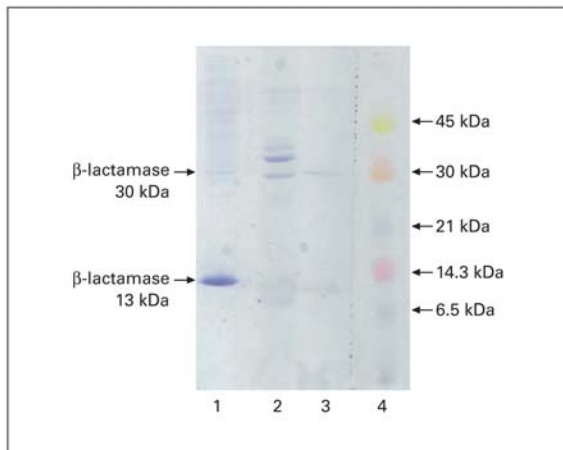


Fig. 2. Detection of the β -lactamases in the culture supernatant and membrane fractions of two BORSA strains by SDS-PAGE, followed by gel renaturation. Nitrocefin was used as a substrate. After the appearance of the β -lactamase bands, the gel was stained with Coomassie brilliant blue R250. Strains were grown in the presence of 0.5 μ g/ml methicillin. Lane 1 = 822 membrane; lane 2 = VU94 supernatant; lane 3 = 822 supernatant; lane 4 = molecular weight standards.

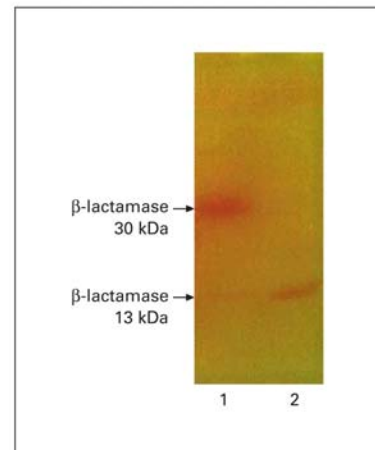


Fig. 4. Detection of the effect of globomycin on the membrane-bound β -lactamases of the BORSA strain 822 by SDS-PAGE, followed by gel renaturation. The gel was placed on an agar plate containing 100 μ g/ml nitrocefin. Lane 1 = Strain 822 was grown in the presence of 0.5 μ g/ml methicillin; lane 2 = strain 822 was grown in the presence of 0.5 μ g/ml methicillin and 50 μ g/ml globomycin.

Table 1. Effect of β -lactamase induction by 0.5 $\mu\text{g/ml}$ methicillin on the oxacillin-hydrolyzing activities of BORSA strains using a bioassay (means \pm SD)

Samples	Oxacillin, $\mu\text{mol}/10 \mu\text{g}$ total protein/min		Induction ratio
	not induced	induced	
VU94 supernatant	0.045 \pm 0.0071	0.176 \pm 0.0015	3.91
822 supernatant	0.098 \pm 0.0036	0.182 \pm 0.0106	1.86
VU94 membrane	0.136 \pm 0.0031	0.644 \pm 0.0368	4.74
822 membrane	0.501 \pm 0.1380	0.888 \pm 0.1450	1.77

Table 2. Effect of 50 $\mu\text{g/ml}$ globomycin on the oxacillin-hydrolyzing activities of the membrane-bound and extracellular β -lactamases of BORSA strains using a bioassay (means \pm SD)

Samples	Oxacillin, $\mu\text{mol}/10 \mu\text{g}$ total protein/min	
	induced	in the presence of globomycin induced
VU94 supernatant	0.176 \pm 0.0015	0.312 \pm 0.0052
822 supernatant	0.182 \pm 0.0106	0.424 \pm 0.0032
VU94 membrane	0.644 \pm 0.0368	0.105 \pm 0.0041
822 membrane	0.888 \pm 0.1450	0.005 \pm 0.0006

brane fractions developed with nitrocefin, two β -lactamase bands appeared, one with a molecular weight of 30 kDa and another with a molecular weight of 13 kDa (fig. 1, 2). Both of these enzymes were present in the membrane fractions of MRSA and BORSA strains. In the susceptible strains, only the β -lactamase of lower molecular weight was present (fig. 1).

We also examined the cell-free ultrafiltered culture supernatants. Susceptible strains did not produce any extracellular β -lactamase, but MRSA and BORSA strains secreted a β -lactamase, and its molecular weight corresponded to the molecular weight of the larger membrane-bound enzyme (fig. 2, 3).

Comparing the activity of membrane-bound and extracellular β -lactamases, we performed a bioassay with 50 μl of membrane fractions or cell-free ultrafiltered culture supernatants of BORSA strains. Oxacillin was added to these fractions, and after 30 min of incubation the amount of intact antibiotic was measured by agar diffusion method. Both membrane fractions and supernatants showed low oxacillin hydrolyzing activity, and this could be increased by the addition of 0.5 $\mu\text{g/ml}$ methicillin to the growing culture. This increase was a moderate one in the case of strain 822 ($p > 0.05$). A significant increase

was only noted in the culture supernatant ($p < 0.01$) and in the membrane fraction ($p < 0.05$) of strain VU94 (table 1).

Previous experiments [13] showed that in the case of bacteria grown in the presence of 50 $\mu\text{g/ml}$ globomycin, the enzyme responsible for the splitting of oxacillin could not be attached to the membrane. Globomycin at 50 $\mu\text{g/ml}$ did not affect the growth of *S. aureus*, but there was a decrease in membrane methicillinase accumulation while the total amount of β -lactamase in the culture was unaffected [13]. Performing SDS-PAGE and renaturing the separated proteins in the gel, the 30-kDa β -lactamase did not appear (fig. 4). The bioassay showed a decrease in the oxacillin-hydrolyzing activity of the membrane fractions (table 2). Globomycin inhibits the processing of membrane proteins with a glyceride-thioether modification on their NH_2 terminus, which is responsible for membrane anchorage [14–16]. Because of the disappearance of the larger β -lactamase from the membrane we concluded that the larger membrane protein is bound via a glyceride-thioether modification to the membrane, and because of the decrease in oxacillin-hydrolyzing activity of the membrane fractions this β -lactamase is responsible for splitting the majority of methicillin and oxacillin.

Discussion

Previous findings of Massidda et al. [11] and Gál et al. [13] suggest that BORSA strains possess a membrane-bound methicillinase. The former found an inducible enzyme with a molecular weight of 31 kDa in two clinical isolates, and the latter found constitutive enzymes in four other clinical isolates.

In the membrane fractions of the BORSA strains examined, we found two enzymes with molecular weights of 30 and 13 kDa, respectively. The one with a molecular weight of 30 kDa seems to be responsible for the hydrolysis of oxacillin, because this enzyme cannot be found in the membrane fractions of the examined methicillin-susceptible strains. Otherwise, when BORSA strains were grown in the presence of 50 $\mu\text{g/ml}$ globomycin, this larger protein did not occur in the renatured electrophoretograms, and in the bioassay a decrease in the oxacillin-hydrolyzing activity of the membrane fraction could be observed. The remaining low activity was caused by the 13-kDa β -lactamase.

Former experiments [13] suggested that oxacillinase activity could not be detected in culture supernatants using a spectrophotometric method. In our experiments,

when we used 40 µg/ml oxacillin in the bioassay, we could detect enzymatic activity. This more sensitive method seems to be adequate for studying the moderate methicillinase activity in BORSA strains.

In the supernatants of BORSA strains, an extracellular enzyme with a molecular weight of 30 kDa was present, which corresponded to the membrane enzyme, and according to its capability of splitting oxacillin, this enzyme was supposed to be the secreted form of the methicillinase. This result was supported by the examination of the susceptible strains, which did not produce extracellular β-lactamase, and the larger β-lactamase did not occur on the electrophoretograms of their membrane fractions and culture supernatants.

The methicillinase was produced constitutively in strains VU94 and 822, but its production could be increased by the addition of 0.5 µg/ml methicillin to the cultures.

When the bacteria were grown in the presence of 50 µg/ml globomycin, only the 13-kDa enzyme was present in the membrane fractions, and oxacillin-hydrolyzing activities of the membrane fractions were reduced to 6–

16% of their original level ($p < 0.01$ in each case), indicating a very low enzyme activity. According to this result, this enzyme did not play a major role in the development of a borderline methicillin-resistant phenotype.

In our opinion, the smaller β-lactamase is independent of the 30-kDa protein, because it is the only β-lactamase which appears in the susceptible strains. Furthermore, the types of the attachment to the membrane are different, because the globomycin inhibited only membrane binding of the larger β-lactamase. Therefore, we suppose that this extremely small enzyme cannot be a degradation product of the larger β-lactamase, and, to our knowledge, a similarly small β-lactamase has not been published previously.

Acknowledgment

We are grateful to Dr. Masatoshi Inukai (Sankyo Company, Tokyo, Japan) for providing globomycin. This work was supported by grant ETT T-08-313/2003.

References

- ▶ 1 Felmingham D: Comparative antimicrobial susceptibility of respiratory tract pathogens. *Chemotherapy* 2004;50(suppl 1):3–10.
- ▶ 2 Livermore DM: Antibiotic resistance in staphylococci. *Int J Antimicrob Agents* 2000;16:S3–S10.
- ▶ 3 Berger-Bächi B, Rohrer S: Factors influencing methicillin resistance in staphylococci. *Arch Microbiol* 2002;178:165–171.
- ▶ 4 Livermore DM: Mechanisms of resistance to β-lactam antibiotics. *Scand J Infect Dis Suppl* 1991;78:7–16.
- ▶ 5 Stapleton PD, Taylor PW: Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: Mechanism and modulation. *Sci Prog* 2001;85:57–72.
- ▶ 6 Chambers HF: Methicillin resistance in staphylococci: Molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin Microbiol Rev* 1997;10:781–791.
- ▶ 7 Hiramatsu K, Cui L, Kuroda M, Ito T: The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol* 2001;9:486–493.
- ▶ 8 Petinaki E, Arvaniti A, Bartzavali C, Dimitracopoulos G, Spiliopoulou I: Presence of *mec* genes and overproduction of beta-lactamase in the expression of low-level methicillin resistance among staphylococci. *Chemotherapy* 2002;48:174–181.
- ▶ 9 McDougal L, Thornsberry C: The role of β-lactamase in staphylococcal resistance to penicillinase-resistant penicillins and cephalosporins. *J Clin Microbiol* 1985;23:832–839.
- ▶ 10 Massidda O, Montanari MP, Varaldo PE: Evidence for a methicillin-hydrolyzing β-lactamase in *Staphylococcus aureus* strains with borderline susceptibility to this drug. *FEMS Microbiol Lett* 1992;92:223–228.
- ▶ 11 Massidda O, Montanari MP, Mingoia M, Varaldo PE: Borderline methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains have more in common than reduced susceptibility to penicillinase-resistant penicillins. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40:2769–2774.
- ▶ 12 Massidda O, Montanari MP, Mingoia M, Varaldo PE: Cloning and expression of the penicillinase from a borderline methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strain in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 1994;119:263–270.
- ▶ 13 Gál Zs, Kovács P, Hernádi F, Barabás Gy, Kiss L, Iglói A, Szabó I: Investigation of oxacillin-hydrolyzing beta-lactamase in borderline methicillin-resistant clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Chemotherapy* 2001;47:233–238.
- ▶ 14 Nielsen JBK, Caulfield PM, Lampen JO: Lipoprotein nature of *Bacillus licheniformis* membrane penicillinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981;78:3511–3515.
- ▶ 15 Nielsen JBK, Lampen JO: Membrane-bound penicillinases in gram-positive bacteria. *J Biol Chem* 1982;257:4490–4495.
- ▶ 16 Inukai M, Takeuchi M, Shimizu K, Arai M: Mechanism of action of globomycin. *J Antibiot (Tokyo)* 1978;31:1203–1205.
- ▶ 17 Novick RP, Brodsky R: Studies on plasmid replication. I. Plasmid incompatibility and establishment in *Staphylococcus aureus*. *J Mol Biol* 1972;68:285–302.
- ▶ 18 Barabás J, Barabás Gy, Szabó I, Veerhuis M, Harder W: Penicillin-binding proteins of protoplast and sporoplast membranes of *Streptomyces griseus* strains. *Arch Microbiol* 1988;150:105–108.
- ▶ 19 Laemmli UR: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680–685.
- ▶ 20 Massidda O, Rossolini GM, Satta G: The *Aeromonas hydrophila ceph A* gene: Molecular heterogeneity among class B metallo-β-lactamases. *J Bacteriol* 1991;15:4611–4617.
- ▶ 21 O'Callaghan CH, Morris A, Kirby S, Shingler AH: Novel method for detection of β-lactamase by using a chromogenic cephalosporin substrate. *Antimicrob Agents Chemother* 1972;1:283–288.



Research article

Identification of β -lactamases in human and bovine isolates of *Staphylococcus aureus* strains having borderline resistance to penicillinase-resistant penicillins (PRPs) with proteomic methods

Judit Szilvia Keserű^{a,*}, István Szabó^a, Zsuzsanna Gál^b, Orietta Massidda^c, Marina Mingoia^d, Éva Kaszanyitzky^e, Szilárd Jánosi^e, Julianna Hulvely^{a,1}, Attila Csorba^{f,2}, Krisztina Buzás^{f,3}, Éva Hunyadi-Gulyás^f, Katalin F. Medzihradsky^{f,g}, Sándor Biró^a

^a Department of Human Genetics, University of Debrecen, Debrecen, Hungary

^b Department of Pharmacology and Pharmacotherapy, University of Debrecen, Debrecen, Hungary

^c Department of Biomedical Science and Technology, Section of Medical Microbiology, University of Cagliari, Cagliari, Italy

^d Institute of Microbiology and Biomedical Sciences, Polytechnic University of Marche Medical School, Ancona, Italy

^e Central Veterinary Institute, Budapest, Hungary

^f Proteomics Research Group, Biological Research Center of the Hungarian Academy of Sciences, Szeged, Hungary

^g Department of Pharmaceutical Chemistry, University of California, San Francisco, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 February 2010

Received in revised form 8 June 2010

Accepted 9 June 2010

Keywords:

Staphylococcus aureus

Borderline methicillin-resistance

Membrane-bound β -lactamase

Penicillinase

PRPs-hydrolyzing enzyme

Proteomics

ABSTRACT

Methicillin and oxacillin-hydrolyzing enzymes of 6 borderline methicillin-resistant and 1 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from human clinical samples and 4 borderline methicillin-resistant *S. aureus* strains isolated from bovine mastitis were investigated. As previous studies suggested the involvement of an additional enzyme besides the penicillinase BlaZ in the determination of borderline resistance, we analyzed the expressed extracellular and membrane-bound β -lactamases with 2-D gel electrophoresis and mass spectrometry. Our analysis showed that the penicillin-hydrolyzing BlaZ alone was responsible for the hydrolysis of both methicillin and oxacillin. All supernatant and membrane fractions contained the same enzyme with slight sequence variations. The size and pI of the proteins were also variable, probably due to spontaneous hydrolysis and/or posttranslational modifications. Interestingly, we found also cytotoxins and other virulence factors in some nitrocefin-hydrolyzing dots, suggesting that those proteins might have a role in the reduction of local antibiotic concentration.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

* Corresponding author at: Department of Human Genetics, Medical and Health Science Center, Faculty of Medicine, University of Debrecen, Nagyerdei krt. 98, Debrecen H-4032, Hungary. Tel.: +36 52 416 531; fax: +36 52 416 531.

E-mail address: kevia@freemail.hu (J.S. Keserű).

¹ Current address: Astrid Research Inc., Debrecen, Hungary.

² Current address: Department of Biotechnology, Gedeon Richter Ltd., Budapest, Hungary.

³ Current address: Microbiological Research Group, National Center for Epidemiology, Budapest, Hungary.

1. Introduction

Methicillin and the other penicillinase-resistant penicillins (PRPs) are narrow spectrum semisynthetic penicillins that share the property of being stable to the staphylococcal β -lactamase. Shortly after methicillin was introduced into clinical practice, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains emerged and spread rapidly since then (de Lencastre et al., 2007). In contrast to penicillin-resistance that is due to the production of β -lactamase, a penicillinase encoded by the *blaZ* gene, methicillin-resistance is due to the production of a

penicillin-binding protein with reduced affinity to β -lactams, encoded by the *mecA* gene.

A distinct mechanism seems to account for the low-level or borderline resistance of *S. aureus* to methicillin and the other PRPs. Typical borderline methicillin-resistant *S. aureus* strains have an oxacillin MIC between 2 and 4 $\mu\text{g/ml}$, produce large amounts of β -lactamase and become susceptible to PRPs in the presence of β -lactamase inhibitors (Massidda et al., 1996). In addition, different from truly MRSA, that may show similar MICs to oxacillin, they do not carry the *mecA* gene. These β -lactamase hyperproducer strains harbour plasmids that encode a type A staphylococcal penicillinase, BlaZ (Chambers, 1997). The borderline phenotype was initially attributed solely to the hyperproduction of the BlaZ (McDougal and Thornberry, 1986). Subsequent studies revealed that some borderline strains produce a second β -lactamase, a membrane-bound methicillinase, able to hydrolyze PRPs (Gál et al., 2001; Kaszanyitzky et al., 2004; Keserü et al., 2005; Massidda et al., 1992). This enzymatic activity did not appear to be due to BlaZ (Massidda et al., 1994, 1996, 2006).

In this paper our aim was to identify the PRP-hydrolyzing enzyme by proteomic analysis of the extracellular and membrane-bound β -lactamases of previously characterized borderline *S. aureus* strains isolated from clinical samples derived from different species.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains and growth conditions

10 borderline methicillin-resistant and 1 MRSA isolates (Table 1) were included in the study. The bovine isolates were selected from a previously described collection (Kaszanyitzky et al., 2004), accordingly to the guidelines specified by the CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, former National Committee for Clinical Laboratory Standards [NCCLS]) (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2000). The human isolates were selected according to the same criteria as bovine isolates as

described (Gál et al., 2001; Kaszanyitzky et al., 2004; Keserü et al., 2005; Massidda et al., 1992). The discrimination between borderline methicillin-resistant strains that were truly MRSA was done testing *mecA* (Table 1) as previously described (Gál et al., 2001; Keserü et al., 2005; Massidda et al., 1996).

Bacteria were grown in a 1% CY (casein–yeast) broth prepared as described (Novick and Brodsky, 1972) and supplemented with 0.5 $\mu\text{g/ml}$ methicillin to induce β -lactamase production.

2.2. Preparation of bacterial supernatants

Cells were harvested by centrifugation at $4000 \times g$ for 30 min at 4 °C. 50 ml aliquots of supernatants were filtered via a Millipore sterile filter (0.45 μm) then concentrated with ultrafiltration (PM-10 membrane, Amicon) and with Centricon YM-3 Centrifugal Filter Units (Millipore).

2.3. Isolation of bacterial membranes

Harvested cells were washed twice with a 50 mM sodium-phosphate-buffer (pH 7.0), resuspended in the same buffer containing 1 mg/ml lysozyme (Sigma), then were incubated at 37 °C for 1.5 h. The intact cells were pelleted by centrifugation at $1100 \times g$ for 10 min at 4 °C and the protoplasts were collected by centrifuging the supernatant at $27,000 \times g$ for 20 min at 4 °C. The protoplasts were resuspended in distilled water for 5 min then 0.5 mg/ml MgCl_2 and 0.09 mg/ml DNase were added. The burst protoplasts were incubated at 37 °C for 1 h then centrifuged at $3000 \times g$ for 10 min at 4 °C. Cellular membrane fractions were collected by centrifugation of the supernatant at $27,000 \times g$ for 20 min at 4 °C, then washed three times with distilled water and stored at –20 °C.

When the yield of that protocol was not satisfactory cells were sonicated by Branson Sonifier 250 (micro tip limit output control = 3; 50% duty cycle; on ice) then centrifuged at $3000 \times g$ for 10 min at 4 °C to remove heavy cell degradation products. Cellular membrane fractions

Table 1
Methicillin-resistant and borderline methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates of human and animal origin.

Designation	Source	<i>mecA</i>	β -Lactamase production	Origin
VU94	Human	–	Type A, extracellular and membrane-bound	Provided by Dr. D.S. Kernodle (Vanderbilt University, Nashville, TN, USA)
a53	Human	–	Type A, extracellular and membrane-bound	Clinical isolate from the collection of the Institute of Microbiology, University of Ancona Medical School, Italy
a36	Human	–	Type A, extracellular and membrane-bound	Clinical isolate from the collection of the Institute of Microbiology, University of Ancona Medical School, Italy
822 (MRSA)	Human	+	Type A, extracellular and membrane-bound	Clinical isolate from the collection of the Department of Microbiology, University of Debrecen, Hungary
9800	Human	–	Type A, extracellular and membrane-bound	Clinical isolate from the collection of the Department of Microbiology, University of Debrecen, Hungary
9989	Human	–	Type A, extracellular (weak) and membrane-bound	Clinical isolate from the collection of the Department of Microbiology, University of Debrecen, Hungary
14287	Human	–	Type A, extracellular and membrane-bound	Clinical isolate from the collection of the Department of Microbiology, University of Debrecen, Hungary
17599/3A	Bovine	–	Type A, extracellular and membrane-bound	Isolate from Central Veterinary Institute, Hungary
17599/3B	Bovine	–	Type A, extracellular and membrane-bound	Isolate from Central Veterinary Institute, Hungary
7789/47	Bovine	–	Type A extracellular and membrane-bound	Isolate from Central Veterinary Institute, Hungary
7789/98	Bovine	–	Type A, extracellular and membrane-bound	Isolate from Central Veterinary Institute, Hungary

were collected also by centrifugation of the supernatant at $27,000 \times g$ for 20 min at 4 °C.

Because of the high lysozyme-resistance of strain a53 French press was used to disrupt the cells and whole cell lysate was used instead of membrane fraction.

2.4. 2-D gel electrophoresis of extracellular proteins

100–100 µg of concentrated proteins were precipitated and desalted using the ReadyPrep™ 2-D Cleanup Kit (Bio-Rad Laboratories), then redissolved in 125–125 µl of rehydration buffer (IEF buffer, sample buffer) containing 8 M urea, 2% CHAPS (3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate), 0.2% 3/10 IPG (immobilized pH gradient) buffer (Bio-Rad Laboratories), 50 mM DTT (dithiothreitol) and 0.002% Bromophenol Blue. For first-dimension isoelectric focusing (IEF) 7 cm pH 3–10 IPG strips (Bio-Rad Laboratories) were rehydrated overnight in IEF buffer containing the sample at room temperature in a rehydration/equilibration tray. IEF was performed using Bio-Rad Protean IEF Cell. Proteins on the IPG strips were focused at 20 °C at 4000 V to a total of 10,000 Vh initiated by a slow voltage gradient from 0 to 250 V in 20 min, then from 250 to 4000 V in 2 h. Following the IEF, IPG strips were processed for the second-dimension separation by a 10 min equilibration in 6 M urea, 2% SDS (sodium dodecyl sulfate, or sodium lauryl sulfate), 50 mM Tris–HCl (pH 8.8), 30% glycerol, 1% DTT followed by a second 10 min bath in a similar solution in which DTT was replaced by 2.5% iodoacetamide. Second-dimension separation was performed essentially as described (Laemmli, 1970). Strips were applied to a Mini-Protean 2-D Cell (Bio-Rad Laboratories, Paris) with a 5% stacking gel, 13% separating gel and electrophoresis was performed at constant voltage of 200 V.

2.5. 2-D gel electrophoresis of membrane proteins

100–100 µg sample was desalted with ReadyPrep™ 2-D Cleanup Kit (Bio-Rad Laboratories, Paris) and was dissolved in maximum 50 µl rehydration buffer containing 7 M urea, 2 M thiourea, 2% CHAPS, 0.2% 3/10 IPG buffer, 50 mM DTT and 0.002% Bromophenol Blue.

Isoelectric focusing was performed using Bio-Rad Protean IEF Cell. 7 cm long pH 3–10 IPG strips were incubated for 16 h at room temperature with 135–135 µl sample buffer without sample. Samples were applied before IEF via cups at the anodic site. IPG strips were focused at 20 °C and the following voltage gradient was applied: from 0 to 250 V in 30 min, from 250 to 4000 V in 2 h and 4000 V to 10,000 Vh.

In case of the whole cell lysate of strain a53 350–350 µg protein was applied to 17 cm long pH 3–10 strips in 100 µl. The strips were rehydrated in 330–330 µl of sample buffer. Samples were applied before IEF via cups at the anodic site. IPG strips were focused at 20 °C and the following voltage gradient was applied: from 0 to 250 V in 30 min, from 250 to 10,000 V in 2 h and 10,000 V to 40,000 Vh.

After isoelectric focusing the strips were handled as in the case of extracellular proteins.

2.6. Detection of β -lactamases on SDS-PA gels

Membrane and culture supernatant fractions (100 µg of total protein) were subjected to IEF and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) in duplicates. One of the gels was soaked in a renaturing buffer for 6–8 h at 37 °C (Massidda et al., 1992). Enzymatic activity was detected directly by placing: filter paper strips soaked in 1 mg/ml nitrocefin (O'Callaghan et al., 1972) solution on the appropriate areas of the gels corresponding to areas where we detected activities on 1-D SDS-PAGE previously (Kaszanyitzky et al., 2004; Keserü et al., 2005; Massidda et al., 1994). After the detection and marking of the β -lactamase dots or bands the gels were stained with Coomassie Brilliant Blue G-250 (Blue Silver) (Candiano et al., 2004).

The parallel gels were stained with Coomassie Brilliant Blue G-250 and appropriate spots were cut out from the gels.

2.7. Mass spectrometric analysis

MALDI-TOF analysis was performed as described by Birkó et al. (2009). Peak picking was done manually, using X-Mass/X-ToF (ver.: 5.1.1) software from Bruker Daltonics. Peak lists were subjected to database search either using ProteinProspector MS-Fit on-line search engine or Mascot.

LC-MS/MS analyses were carried out on an Agilent XCT Plus ion trap mass spectrometer on-line coupled with an Agilent 1100 nano-HPLC system. An aliquot of the samples were injected to a Zorbax 300SB-C18 5 µm 5 mm \times 0.3 mm trap column and washed onto the nano-column (Zorbax 300SB-C18 3.5 µm 150 mm \times 0.75 mm) using a short gradient elution of 5–45% solvent B in 20 min (flow rate: 300 nl/min, solvent A: 0.1% formic acid in water, solvent B: 0.1% formic acid in acetonitrile). Mass spectrometric analyses were carried out using information dependent mode acquiring the MS/MS spectra of the three most intense multiply charged precursor cations.

To identify the proteins present, mass spectrometry data were searched against the unrestricted NCBI protein database [NCBI nr 20070926 (5519594 sequences)] using the Mascot search engine. The parameters used for the database search identical to those described by Birkó et al. (2009). Protein lists were revised manually taking into consideration only the significant peptide hits ($p < 0.05$), minimum two significant peptides/protein.

3. Results

3.1. Analysis of the extracellular β -lactamases

For the analysis of extracellular enzymes we used the conventional rehydration buffer and technique of sample preparation and of IEF. One pair of representative gel pictures (Fig. 1) shows the result obtained with the supernatant fraction of strain VU94. β -lactamase activity appeared in wide areas of the gels (Fig. 1A). In most cases we found enzymes at pI 4, 5 and 9. All active dots were analyzed (1–10 dots/gel), and the unambiguously identified proteins are listed in Table 2. At least 42% of the

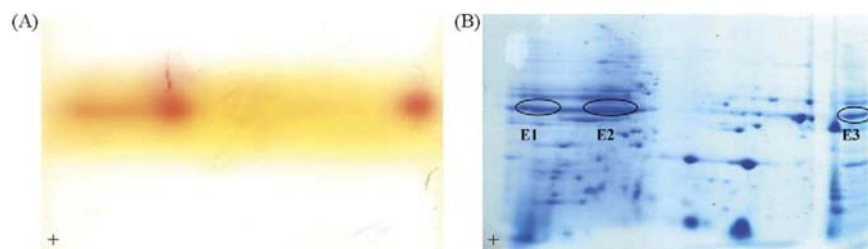


Fig. 1. 2-D gel electrophoresis pattern of the supernatant fraction proteins of borderline methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain VU94. (A) The gel was regenerated, and the nitrocefin-hydrolyzing activities detected. (B) Blue Silver stained 2-D gel. The encircled areas are equivalent to the nitrocefin-hydrolyzing areas in (A). The + sign shows the acidic (pH 3) end.

significant peaks match with the database peptides of the appropriate protein in case of MALDI-TOF, and at least 5 peptide fragments in case of LC-MS/MS analysis.

In all cases BlaZ (gi|33416277) was identified as the extracellular β -lactamase (Table 2). In strain 7789/47 a BlaZ variant (gi|3603441, erroneously called "type-b" β -lactamase), and in strain 7789/98 its longer variant (gi|67973147) was found together with BlaZ (gi|33416277) or alone. The "type-b" variants differed slightly (7%) from BlaZ because of the presence of a peptide with molecular weight of 1440 Da corresponding to ³⁴YNANIGVYALDTK⁴⁶ tryptic fragment with an ion score of 89. In gi|33416277 BlaZ H is present instead of the underlined N. In case of 7789/47 we also found a peptide with molecular weight of 1543 Da corresponding to ²⁴⁵GQSEPIVLVIFTNK²⁵⁸ (ion score was 87), which is present in gi|33416277 BlaZ (in gi|3603441 it is not present, in gi|67973147 N is present instead of the underlined G, and I is present instead of the underlined

V). This probably represents a new sequence variant of BlaZ in this strain. In strain 7789/98 a peak with molecular weight of 1973 (²⁴⁵GQSEPIVLVIFTNKDNK²⁶¹) instead of 1902 (²⁴⁵NQSEPIVLVIFTNKDNK²⁶¹) was found, and also some other characteristic differences are labelled with asterisks on the spectrograms in Supplemental Fig. 1.

Besides BlaZ hemolysins (α -hemolysin in strains a53, a36, 9800, 9989, and 14287, β -hemolysin in strains 822 and 14287, truncated β -hemolysin in strain 14287, γ -hemolysin in strain 9989), some lipases (lipase 1 and 2 in strain 9800) and other cytotoxins and virulence factors (leukocidin in strains a53 and a36, serine protease SplB in strains a53 and 14287/1) were also able to hydrolyze nitrocefin (data not shown).

3.2. Analysis of the membrane-bound β -lactamases

In human samples the membrane-bound enzymes were attached to the membrane via a thioether-bond

Table 2

Nitrocefin-hydrolyzing extracellular enzymes of methicillin-resistant and borderline methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains.

Sample ^a	NCBI-GI	Protein name	Match ^b	Seq. cov. % ^c	Nominal mass M_r	pI on gel	Theoretical pI	PSD or Mascot score or MS/MS search score
VU94/E1	gi 33416277	Beta-lactamase (BlaZ)	23/43	55	31,349.5	4	9.55	¹²⁵ SGQAITYASR ¹³⁴
VU94/E2	gi 33416277	Beta-lactamase (BlaZ)	25/46	69	31,349.5	5	9.55	⁵⁵ NDVAFVYPK ⁶³
VU94/E3	gi 33416277	Beta-lactamase (BlaZ)	26/57	67	31,349.5	9	9.55	⁶¹ FAYASTSK ⁶⁸
a53/E1	gi 33416277	Beta-lactamase (BlaZ)	25/32	64	31,349.5	3.5	9.55	
a53/E2	gi 33416277	Beta-lactamase (BlaZ)	24/35	60	31,349.5	4.5	9.55	¹⁵⁰ VTNPVRYEIELNYSPK ¹⁶⁶
a53/E3	gi 33416277	Beta-lactamase (BlaZ)	22/37	49	31,349.5	9	9.55	
a36/E1	gi 33416277	Beta-lactamase (BlaZ)	17/37	47	31,349.5	4.5	9.55	52 ^d
a36/E2	gi 33416277	Beta-lactamase (BlaZ)	7/14	30	31,349.5	5	9.55	
a36/E3	gi 33416277	Beta-lactamase (BlaZ)	17/20	45	31,349.5	9	9.55	119 ^d
822/E1	gi 33416277	Beta-lactamase (BlaZ)	18/27	64	31,349.5	4	9.55	⁵⁵ NDVAFVYPK ⁶³
822/E2	gi 33416277	Beta-lactamase (BlaZ)	21/35	46	31,349.5	5	9.55	¹²⁵ SGQAITYASR ¹³⁴
822/E3	gi 33416277	Beta-lactamase (BlaZ)	18/25	59	31,349.5	9	9.55	⁶¹ FAYASTSK ⁶⁸
9800/E1	gi 33416277	Beta-lactamase (BlaZ)	7	23	31,349.5	5	9.55	90
14287/E1	gi 33416277	Beta-lactamase (BlaZ)	23/38	58	31,349.5	9	9.55	114 ^d
14287/E2	gi 33416277	Beta-lactamase (BlaZ)	11/26	50	31,349.5	8	9.55	²³⁶ NDVAFVYPK ²⁴⁴
14287/E3	gi 33416277	Beta-lactamase (BlaZ)	38/43	79	31,349.5	5	9.55	201 ^d
14287/E4	gi 33416277	Beta-lactamase (BlaZ)	17/23	57	31,349.5	4	9.55	102 ^d
17599/3A/E1	gi 33416277	Beta-lactamase (BlaZ)	9	31	31,349.5	4	9.55	323
17599/3B/E1	gi 33416277	Beta-lactamase (BlaZ)	21	64	31,349.5	5	9.55	322
7789/47/E1	gi 3603441	"Type-b" beta-lactamase (BlaZ)	5	23	27,197	4.5	9.74	387
7789/47/E1	gi 33416277	Beta-lactamase (BlaZ)	5	22	31,349.5	4.5	9.55	381
7789/98/E1	gi 67973147	Beta-lactamase (BlaZ)	13/16	44	29,205	4	9.72	

^a E1, E2, etc. correspond to the different active dots of the same gel.

^b MALDI-TOF: matched/observed masses, LC-MS: total number of distinct peptides.

^c Sequence covered.

^d Mascot score.

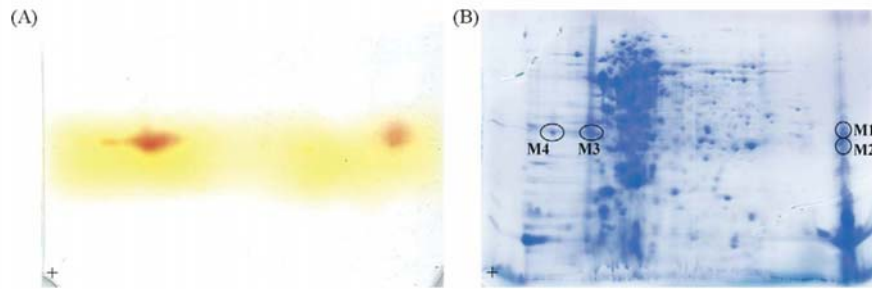


Fig. 2. 2-D gel electrophoresis pattern of the membrane fraction proteins of borderline methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain VU94. (A) The gel was regenerated, and the nitrocefin-hydrolyzing activities detected. (B) Blue Silver stained 2-D gel. The encircled areas are equivalent to the nitrocefin-hydrolyzing areas in (A). The + sign shows the acidic (pH 3) end.

(Gál et al., 2001; Keserü et al., 2005), so we used a modified rehydration buffer and cup-loading technique to dissolve and apply the membrane proteins to the strips. One representative pair of gels (Fig. 2) shows the result obtained with the membrane fraction of strain VU94.

Similarly to the supernatant fractions we found enzymes at pl 4, 5 and 9 on the gels. All the active dots were analyzed (1–4 dots/gel), and the unambiguously identified proteins are listed in Table 3. At least 50% of the significant peaks match with the database peptides of the appropriate protein in case of MALDI-TOF, and at least 3 peptide fragments giving protein score larger than 25 in case of LC-MS/MS analysis.

All of the membrane fractions contained the same BlaZ (gi|33416277). In strains 7789/47 and 7789/98 a longer and a shorter “type-b” BlaZ variant was found

(gi|67973147 and gi|3603441, respectively). In case of strain 7789/98 we detected a peptide with molecular weight of 1097 Da, which corresponded to ¹⁴⁶LGDKVTNPVR¹⁵⁵ tryptic fragment with an ion score of 34. This can be produced only, when at position 145 a Lysine (gi|3603441, gi|67973147) is present and not Glutamic acid (gi|33416277). We also found a peptide with molecular weight of 1568 Da corresponding ³³KYNA-NIGVYALDTK⁴⁶ (ion score was 82), which is present in gi|3603441 and in gi|67973147 BlaZ (in gi|33416277 H replaces the underlined N). This probably represents a new sequence variant of BlaZ in this strain. On the mass spectrogram of strain 7789/47 we found the same differences like in the case of the spectrogram of the extracellular enzyme of strain 7789/98, so probably both strains contain the same sequences variant.

Table 3
Nitrocefin-hydrolyzing membrane-bound enzymes of methicillin-resistant and borderline methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains.

Sample ^a	NCBI-GI	Protein name	Match ^b	Seq. cov. % ^c	Nominal mass <i>M_r</i>	pl on gel ^d	Theoretical pl	PSD or MS/MS search score or Mascot score
VU94/M1	gi 33416277	Beta-lactamase (BlaZ)	26	71	31,349.5	9	9.55	385.4
VU94/M2	gi 33416277	Beta-lactamase (BlaZ)	6	24	31,349.5	9	9.55	89.36
VU94/M3	gi 33416277	Beta-lactamase (BlaZ)	23	70	31,349.5	5	9.55	331.54
VU94/M4	gi 33416277	Beta-lactamase (BlaZ)	29	74	31,349.5	4	9.55	465.03
a53/M1	gi 33416277	Beta-lactamase (BlaZ)	13/26	36	31,349.5	4	9.55	113 ^e
a53/M2	gi 33416277	Beta-lactamase (BlaZ)	30/40	70	31,349.5	4	9.55	213 ^e
a36/M1	gi 33416277	Beta-lactamase (BlaZ)	18/51	65	31,349.5	4	9.55	⁶⁹ FAYASTSK ⁷⁶
822/M1	gi 33416277	Beta-lactamase (BlaZ)	5	13	31,349.5	4.5	9.55	61.47
822/M2	gi 33416277	Beta-lactamase (BlaZ)	6	23	31,349.5	5	9.55	88.06
9800/M1	gi 33416277	Beta-lactamase (BlaZ)	33	82	31,349.5	4.5	9.55	479.83
9800/M2	gi 33416277	Beta-lactamase (BlaZ)	22	71	31,349.5	9	9.55	326.37
9989/M1	gi 33416277	Beta-lactamase (BlaZ)	22	70	31,349.5	4.5	9.55	337.3
14287/M1	gi 33416277	Beta-lactamase (BlaZ)	10/12	40	31,349.5	4	9.55	71 ^e
14287/M2	gi 33416277	Beta-lactamase (BlaZ)	15/41	51	31,349.5	4	9.55	100 ^e
17599/3A/M1	gi 33416277	Beta-lactamase (BlaZ)	32	79	31,349.5	4	9.55	462.3
17599/3A/M2	gi 33416277	Beta-lactamase (BlaZ)	11	39	31,349.5	9	9.55	160.42
17599/3A/M3	gi 33416277	Beta-lactamase (BlaZ)	21	64	31,349.5	5	9.55	308.9
17599/3A/M4	gi 33416277	Beta-lactamase (BlaZ)	26	76	31,349.5	9	9.55	404.04
17599/3B/M1	gi 33416277	Beta-lactamase (BlaZ)	36	79	31,349.5	4	9.55	560.16
17599/3B/M2	gi 33416277	Beta-lactamase (BlaZ)	38	79	31,349.5	5	9.55	562.1
17599/3B/M3	gi 33416277	Beta-lactamase (BlaZ)	12	45	31,349.5	9	9.55	181.87
7789/47/M1	gi 67973147	Beta-lactamase (BlaZ)	28/45	70	29,205	8.5	9.72	130 ^e
7789/98/M1	gi 3603441	“Type-b” beta-lactamase (BlaZ)	4	17	27,197	3.5	9.74	194 ^e
7789/98/M2	gi 3603441	“Type-b” beta-lactamase (BlaZ)	3	13	27,197	4	9.74	181 ^e

^a M1, M2, etc. correspond to different active dots of the same gel.

^b MALDI-TOF: matched/observed masses, LC-MS: total number of distinct peptides.

^c Sequence covered.

^d Different proteins having the same pl in the case of the same strains mean different observed molecular weights on the gel.

^e Mascot score.

4. Discussion

Our results show that all β -lactamase activities detectable in the supernatant and the membrane fractions of the borderline methicillin-resistant *S. aureus* isolates, derived from human or bovine clinical samples, were all attributable to the BlaZ penicillinase produced by these strains. All BlaZ proteins detected are highly similar to each other, however slight sequence variations seem common and may account for the different sizes and, probably, the substrate specificity of the proteins (Voladri et al., 1996; Zawadzke et al., 1995). In strains 7789/47 and 7789/98 an additional enzyme with slight sequence variations was found.

Interestingly, in the supernatant fractions besides BlaZ that constitutes the main part of the β -lactamase activity detected, we found cytotoxins and other virulence factors in some nitrocefin-hydrolyzing dots. It was established that some β -lactam antibiotics are able to trigger (Kernodle et al., 1995) and some β -lactamase inhibitors are able to inhibit the production of hemolysins (Tawfik et al., 1996). So, hemolysin production seems to be connected to the presence of β -lactams and thus may have a role in the reduction of local antibiotic concentration.

BlaZ was the only β -lactamase activity found in the membrane fractions and in the whole cell extract of the borderline methicillin-resistant *S. aureus* strain a36 and a53, as shown in Fig. 2 (see spots M1 and M2, respectively). A likely explanation is that the two bands originally seen on SDS-PAGE renatured gels (Massidda et al., 1992, 1996) contained the same protein with different sizes rather than two distinct β -lactamases. These results do not confirm the previous hypothesis proposing that a second β -lactamase, distinct from BlaZ, was responsible for the hydrolysis of PRPs in borderline strains (Massidda et al., 1996). However, the argument was based on the experimental findings that a recombinant *E. coli* strain, constitutively expressing the *blaZ* gene from a borderline strain, was not able to hydrolyze PRPs (Massidda et al., 1996) and the *blaZ* gene showed a wild-type sequence (Massidda et al., 2006) and did not rule out different posttranslational modifications that could occur in a borderline methicillin-resistant background.

The different sizes and perhaps the substrate specificity of the same enzyme could be the consequence of the proteolysis of β -lactamases or posttranslational modification. A posttranslational modification (mainly phosphorylation) can explain the shift in the pI of the proteins. There are 23 Serine, 13 Threonine, and 13 Tyrosine residues in BlaZ, which can be phosphorylated. When 20 of them are phosphorylated it shifts the pI from 9.55 to 7 (result by ProMoST: Protein Modification Screening Tool, University of Wisconsin, Madison, Medical College of Wisconsin, Proteomics Center), so phosphorylation of all possible sites can shift the pI to 5 or 4 easily, and phosphate groups (MW: 95) also can cause an increase in the molecular weight of the protein. The 23 Asparagines and 4 Glutamines can be spontaneously hydrolyzed to Aspartic acid and Glutamic acid, respectively, which also can alter the pI (Zomber et al., 2005).

Bovine strains contained the same BlaZ β -lactamase like the human ones. Moreover, in two strains (7789/98 and 7789/47) we found an enzyme called erroneously type-b β -lactamase and its longer variant, having 7% sequence divergence compared to the gi|33416277 sequence. During the selection of the bovine strains also the phage type of them was established in the phage laboratory of the Hungarian National Public Health and Medical Officer Service, Debrecen, Hungary (unpublished data), and it showed that the 17599/3A and 17599/3B isolates could not be typed with bovine series of phages but only with the human series, suggesting that those strains may have a human origin. It is interesting that "type-b" β -lactamase or its longer variant was found only in strains with bovine origin. In these strains the shorter and longer variants of "type-b" BlaZ were found alternatively in the supernatant or membrane fractions. It is also possible that the longer variant is present in all cases, but we could not detect the C-terminal fragments. Because in the supernatant of strain 7789/47 a peptide also was identified that can be found in BlaZ (gi|33416277) we suppose that two enzymes are present in this strain, or it is more likely that a sequence variant that is not found in NCBI database is present in both strains.

5. Conclusions

In summary our results show that all β -lactamase activities detectable in the supernatant and the membrane fractions of our borderline methicillin-resistant *S. aureus* isolates, derived from human or bovine clinical samples, were similar and all attributable to the BlaZ staphylococcal penicillinase produced by these strains. In many isolates an extracellular and a membrane-bound form of β -lactamase were present. The extracellular form might have role in the reduction of local antibiotic concentration, while the membrane-bound enzyme could act at a more concentrated way. The "type-b" sequence variants were found only in the cow isolates. In two cases, it was shown that the bovine isolates have a human origin.

Conflicts of interest

The authors have declared no conflicts of interest.

Acknowledgements

This work was supported by the grant ETT 395/KO/03.

The Proteomics Research Group was supported by the Hungarian National Office for Research and Technology (RET-08/2004). A participant of this consortium is the Kromat Ltd. that provided the Agilent 1100 nano-LC XCT Plus Ion Trap mass spectrometer system.

We are grateful to Dr. Tamás Emri (Department of Microbial Biotechnology and Cell Biology, University of Debrecen) performing the cell disruption with French pressure cell press. We thank Prof. Pietro Emanuele Varaldo (Institute of Microbiology and Biomedical Sciences, Polytechnic University of Marche Medical School) for helpful discussion.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.vetmic.2010.06.006.

References

- Birkó, Z., Swiatek, M., Szajli, E., Medzihradzsky, K.F., Vijgenboom, E., Penyige, A., Keserü, J., van Wezel, G.P., Biró, S., 2009. Lack of A-factor production induces the expression of nutrient scavenging and stress-related proteins in *Streptomyces griseus*. *Mol. Cell. Proteomics* 8, 2396–2403.
- Candiano, G., Bruschi, M., Musante, L., Santucci, L., Chiggeri, G.M., Carnemolla, B., Orecchia, P., Zardi, L., Righetti, P.G., 2004. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis* 25, 1327–1333.
- Chambers, H.F., 1997. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin. Microbiol. Rev.* 10, 781–791.
- de Lencastre, H., Oliveira, D., Tomasz, A., 2007. Antibiotic resistant *Staphylococcus aureus*: a paradigm of adaptive power. *Curr. Opin. Microbiol.* 10, 428–435.
- Gál, Z., Kovács, P., Hernádi, F., Barabás, G., Kiss, L., Iglói, A., Szabó, I., 2001. Investigation of oxacillin-hydrolyzing beta-lactamase in borderline methicillin-resistant clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Chemotherapy* 47, 233–238.
- Kaszanyitzky, É.J., Egyed, Z., Janosi, S., Keserü, J., Gál, Z., Szabó, I., Veres, Z., Somogyi, P., 2004. Staphylococci isolated from animals and food with phenotypically reduced susceptibility to beta-lactamase-resistant beta-lactam antibiotics. *Acta Vet. Hung.* 52, 7–17.
- Kernodle, D.S., McGraw, P.A., Barg, N.L., Menzies, B.E., Voladri, R.K.R., Harshman, S., 1995. Growth of *Staphylococcus aureus* with nafcillin in vitro induces alpha-toxin production and increases the lethal activity of sterile broth filtrates in a murine model. *J. Infect. Dis.* 172, 410–419.
- Keserü, J.S., Gál, Z., Barabás, G., Benkő, I., Szabó, I., 2005. Investigation of beta-lactamases in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* for further explanation of borderline methicillin resistance. *Chemotherapy* 51, 300–304.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Massidda, O., Mingoia, M., Fadda, D., Whalen, M.B., Montanari, M.P., Varaldo, P.E., 2006. Analysis of the beta-lactamase plasmid of borderline methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*: focus on bla complex genes and cadmium resistance determinants cadD and cadX. *Plasmid* 55, 114–127.
- Massidda, O., Montanari, M.P., Mingoia, M., Varaldo, P.E., 1994. Cloning and expression of the penicillinase from a borderline methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strain in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 119, 263–269.
- Massidda, O., Montanari, M.P., Mingoia, M., Varaldo, P.E., 1996. Borderline methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains have more in common than reduced susceptibility to penicillinase-resistant penicillins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40, 2769–2774.
- Massidda, O., Montanari, M.P., Varaldo, P.E., 1992. Evidence for a methicillin-hydrolyzing beta-lactamase in *Staphylococcus aureus* strains with borderline susceptibility to this drug. *FEMS Microbiol. Lett.* 92, 223–227.
- McDougal, L.K., Thornsberry, C., 1986. The role of beta-lactamase in staphylococcal resistance to penicillinase-resistant penicillins and cephalosporins. *J. Clin. Microbiol.* 23, 832–839.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2000. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically, 5th ed. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA. Approved standard (M7-A5).
- Novick, R.P., Brodsky, R., 1972. Studies on plasmid replication: I. Plasmid incompatibility and establishment in *Staphylococcus aureus*. *J. Mol. Biol.* 68, 285–302.
- O'Callaghan, C.H., Morris, A., Kirby, S.M., Shingler, A.H., 1972. Novel method for detection of beta-lactamases by using a chromogenic cephalosporin substrate. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1, 283–288.
- Tawfik, A.F., Al-Zamil, F.A., Ramadan, M.A., Shibl, A.M., 1996. Effect of beta-lactamase inhibitors on normal immune capabilities and their interactions with staphylococcal pathogenicity. *J. Chemother.* 8, 102–106.
- Voladri, R.K.R., Tummuru, M.K.R., Kernodle, D.S., 1996. Structure-function relationships among wild-type variants of *Staphylococcus aureus* beta-lactamase: importance of amino acids 128 and 216. *J. Bacteriol.* 178, 7248–7253.
- Zawadzke, L.E., Smith, T.J., Herzberg, O., 1995. An engineered *Staphylococcus aureus* PC1 beta-lactamase that hydrolyses third-generation cephalosporins. *Protein Eng.* 8, 1275–1285.
- Zomber, G., Reuveny, S., Garti, N., Shafferman, A., Elhanany, E., 2005. Effects of spontaneous deamidation on the cytotoxic activity of the *Bacillus anthracis* protective antigen. *J. Biol. Chem.* 280, 39897–39906.

