

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

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

Keserű Judit Szilvia

Témavezető: Dr. Biró Sándor



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS SEJT- ÉS IMMUNBIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2012

**BORDERLINE METHICILLIN-REZISZTENS *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*
TÖRZSEK β -LAKTAMÁZAINAK ANALÍZISE**

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében
az Elméleti Orvostudományok tudományágban

Írta: Keserű Judit Szilvia okleveles biológus

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Sejt- és Immunbiológia doktori iskolája
keretében

Témavezető: Dr. Biró Sándor, az MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Szabó Gábor, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Vereb György, az MTA doktora
Dr. Dobay Orsolya, Ph.D.

A doktori szigorlat időpontja: 2012. április 11. 11 óra, Immunológiai Intézet Diskussziós
terme (ÉTK 2.209)

Az értekezés bírálói:

Dr. Szabó Judit, Ph.D.
Prof. Dr. Rozgonyi Ferenc, az MTA doktora

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Szabó Gábor, az MTA doktora
tagok: Dr. Dr. Szabó Judit, Ph.D.
Dr. Prof. Dr. Rozgonyi Ferenc, az MTA doktora
Dr. Prof. Dr. Vereb György, az MTA doktora
Dr. Dr. Dobay Orsolya, Ph.D.

Az értekezés védésének időpontja: 2012. április 11. 13 óra, az I. sz. Belgyógyászati Klinika
tanterme

1. BEVEZETÉS

1.1. A *Staphylococcus aureus* β -laktám-rezisztenciája

A Gram-pozitív *Staphylococcus aureus* az egyik legjelentősebb embereket is megbetegíteni képes fakultatív patogén baktérium. Az első antibiotikumot, a β -laktám gyűrűt tartalmazó penicillint is az általa okozott fertőzések kezelésére vezették be. Pár éven belül megjelentek az első β -laktamáz termelő penicillin-rezisztens törzsek, ezért új antibiotikumokat kellett keresni illetve előállítani. A penicillint β -laktamáz gátlókkal (klavulánsav, szulbaktám) kombinációban, illetve a penicillin félszintetikus penicillináz-rezisztens változatait (PRP-kat), a methicillint, oxacillint, nafcillint, cloxacillint alkalmazták az ilyen törzsek okozta fertőzések kezelésére. A nem β -laktamázok termelésével methicillin- illetve oxacillin-rezisztenssé vált nozokomiális és újabban egészséges közösségekben fertőző törzsek elterjedésével más típusú antibiotikumok (például glikopeptidek) alkalmazása került előtérbe, de ezek az utolsó védelmi vonalat jelentik a multirezisztens törzsek ellen.

A β -laktám antibiotikumok a sejtfalszintézis transzpeptidációs lépésére hatnak. Ez a lépés már a sejten kívül megy végbe, miután a sejtben előállított sejtfalegység (N-acetil-muraminsav – N-acetil-glükózamin diszacharid, melynek N-acetil-muraminsav egységéhez kapcsolódik egy L-alanin – D-glutaminsav – L-lizin – D-alanin – D-alanin pentapeptid, és annak L-lizinjéhez kapcsolódik a majdani keresztkötő pentaglicin rész) átjutva a membránon beépült a sejtalba (transzglykozilezés). A keresztkötéseket a penicillin-kötő fehérjék (penicillin-binding proteins, PBPs) transzpeptidáz doménje alakítja ki a pentapeptid terminális D-alaninjának lehasításával és egy másik sejtfalegység pentaglicinjének hozzákapcsolásával a maradék tetrapeptid D-alaninjához. A β -laktám gyűrű szerkezete hasonló a D-alanin-D-alanin dipeptidéhez, ezért a PBP-k ezeket az antibiotikumokat szubsztrátként felismerik és megkötik, de nem képesek elhidrolizálni.

A *Staphylococcus aureus* PRP-kkal szembeni rezisztenciája különböző okokra vezethető vissza. Okozhatja a rezisztenciát csökkent β -laktám kötőképességű PBP termelése, amilyen az MRSA (methicillin-rezisztens *Staphylococcus aureus*) törzsek rezisztenciáját okozó PBP2a, melyet a *mecA* kódol. Ez a gén egy fontos patogenitási sziget, az SCC*mec* (staphylococcal cassette chromosome *mec*) területen helyezkedik el, többnyire más rezisztencia gének társaságában. Alacsonyabb mértékű rezisztencia kialakításáért felelősek 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.

A különbség a PBP-khez képest az, hogy az enzim gyorsan el is hidrolizálja az antibiotikumot, és vízfelvétellel regenerálja hidroxil-csoportját. Ezeket a baktériumok többnyire kiválasztják a környezetükbe, bár membránkötött formák is előfordulnak.

1.2. A borderline methicillin rezisztens *Staphylococcus aureus* (BORSA) törzsek jellemzői

Az általunk vizsgált BORSA (borderline methicillin rezisztens *Staphylococcus aureus*) törzsek oxacillin-rezisztenciája átmenetet mutat az érzékeny és a methicillin-rezisztens törzsek között. Az emelkedett MIC-ért (minimal inhibitory concentration: minimális gátló koncentráció) legtöbbször nagy mennyiségű β -laktamáz (a BlaZ penicillináz) termelése a felelős, de az oxacillin MIC emelkedéséhez nem elég a β -laktamáz génjét bejuttatni egy érzékeny törzsbe, és ott túltermeltetni azt. 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 PRP-kra, vagyis a plazmidon jelen kell lennie a megnövekedett rezisztenciáért felelős faktor génjének.

Massidda és munkatársai kimutatták, hogy methicillin indukció hatására az általuk vizsgált törzsek membránjában a BlaZ mellett (32 kDa) megjelent egy kisebb, 31 kDa molekulatömegű enzim. Ez a nitrocefín és a penicillin mellett hidrolizálta a methicillint, oxacillint és a PADAC-ot is (a nitrocefín és a PADAC – Pyridinium-2-Azo-p-Dimethylaniline Chromophore = piridinium-2-azo-p-dimetilanilin kromofór 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/oxacillináz enzim.

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-keket, 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. Azt feltételezték, hogy ez az új enzim a BlaR1 (egy transzmembrán fehérje, mely a BlaZ kifejeződését szabályozza) mutációjával keletkezhetett, de biztosan nem tudták a mibenléte felől.

2. CÉLKITŰZÉS

A Gram-negatív Enterococcusoknál leírtak egy enzimet, mely képes hidrolizálni az oxacillint. Dr. Orietta Massidda és munkatársai leírtak egy olyan enzimet borderline meticillin-rezisztens *Staphylococcus aureus*-ban (BORSA), mely szintén képes volt bontani az oxacillint illetve a meticillint, meticillin indukció hatására jelent meg a membránfrakcióban, 31 kDa volt a molekulatömege (a BlaZ penicillinázé 32 kDa), és nem lehetett átvinni *E. coli*-ba a *blaZ*-t hordozó plazmid transzformálásával. Végső célunk az volt, hogy ezt az oxacillinázt azonosítsuk.

Munkánk során a következő lépéseket terveztük elvégezni:

1. Staphylococcus törzsek gyűjtése különböző forrásokból, és azonosítani köztük oxacillin és methicillin MIC érték meghatározásával a borderline methicillin-rezisztens törzseket.
2. Az így gyűjtött BORSA törzsek karakterizálása, úgymint esetleges PBP2a termelésük kimutatása, fág típusuk azonosítása, β -laktám bontásuk kimutatása.
3. A hipotetikus methicillináz/oxacillináz kimutatása és azonosítása proteomikai módszerekkel.
4. Annak megvizsgálása, hogy van-e különbség a humán izolátumok és a szarvasmarha tüdőgyulladásból izolált törzsek β -laktamázai között.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Humán és bovin törzsek gyűjtése

A vizsgált humán izolátumok a Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum (DE OEC) Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet humán beteganyagból származó törzsgyűjteményébe tartozó törzsek és referencia törzsek. A referencia törzsek Dr. Douglas S. Kernodle-tól (Vanderbilt University, Nashville, Tennessee, USA) származnak. Az 56, humán mintából izolált törzset (52 *Staphylococcus aureus*, 4 *Staphylococcus epidermidis*) a DE OEC Mikrobiológiai Intézet azonosította és bocsátotta a Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet rendelkezésére. Korábbi kísérletek során az összes törzs penicillin, methicillin és oxacillin MIC értékét meghatároztuk önállóan és szulbaktámmal illetve klavulánsavval kombinációban makrodilúciós technikával a Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, korábban NCCLS – National Committee for Clinical Laboratory Standards) irányelvei szerint. Ez alapján öt törzsről állapítottuk meg, hogy BORSA törzs. Két további humán izolátum (a36 és a53) az Institute of Microbiology, University of Ancona Medical School, Italy gyűjteményéből származik, melyeket Dr. Orietta Massidda közbenjárására Dr. Marina Mingoia-tól kaptunk. Kaptunk még további törzseket Dr. Rozgonyi Ferenc-től (Semmelweis Egyetem, Orvosi Mikrobiológiai Intézet, Budapest), két *Staphylococcus aureus* és négy *Staphylococcus epidermidis* törzset. Az állati fertőzésekből illetve élelmiszerből izolált 28 törzset az Országos Állategészségügyi Intézettől (OÁI, Budapest) kaptuk.

3.2. Makrodilúciós MIC meghatározás

A törzsek besorolását makrodilúciós MIC meghatározás segítségével végeztük el, melyet a CLSI irányelvei szerint kivitelezünk. Mivel munkánk Dr. Orietta Massidda és munkatársai kísérleteinek a folytatása, ezért a törzsek borderline methicillin-rezisztensként való besorolásakor az ő kísérleteik során alkalmazott kritériumrendszert alkalmaztuk (oxacillin MIC 1-2 $\mu\text{g ml}^{-1}$, mely β -laktamáz gátló hatására 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ alá csökken).

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). A többi törzs esetében izolálásukkor PCR-rel történt a *mecA* kimutatása.

3.4. Fágtypizálás

A fágtypizálás a debreceni Állami Népegészségügyi és Tisztiorvosi Szolgálat (ÁNTSZ) nemzetközi fágsozozatával történt, a helyi fáglabor kivitelezésében a WHO (World Health Organization) előírásainak megfelelően. 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. A membrán izolálása

A 16 órán át 37°C-on 1%-os, pH 7,4 CY (casein-yeast – kazein-élesztőkivonat) táptalajban 0,5 µg ml⁻¹ methicillin jelenlétében tenyésztett sejteket mosás után 1 mg ml⁻¹ lizozim oldatban való inkubációval és ozmotikus lízissel tártuk fel, majd sorozatos centrifugálással membrán izoláltunk. Ha a lizozimos emésztés nem volt elégséges, akkor ultrahangos sejteltávolítóval (Branson Sonifier 250) végeztük el a sejtek feltárását, illetve az a53 törzs esetében X-Press készülékkel (X 25, AB Biox, Göteborg, Svédország) Dr. Emri Tamás (DE TTK Mikrobiális Biotechnológiai és Sejtbiológiai Tanszék) kivitelezésében.

3.6. A fermentlé ultraszűrése

A tenyésztéskor nyert fermentlé 50 ml-ének sterilre szűréséhez 0,45 µm pórusátmérőjű membránt (Millipore, Bedford, USA) használtunk, míg az ultraszűrést Diaflo PM10 (10000 Da molekulatömeg kizárású) illetve YM5 (5000 Da molekulatömeg kizárású) Amicon ultrafiltrációs membránnal (Millipore, Bedford, USA) végeztük 2 atmoszféra nyomású nitrogén gázzal, 4°C-on, állandó kevertetés mellett, végezetül a mintát Centricon YM-3 szűrőegységekkel (Millipore, Bedford, USA) centrifugáltuk.

3.7. Oxacillináz aktivitás meghatározása biológiai titrálással

A BORSA törzsek membránkötött és extracelluláris oxacillináz aktivitását izolált membránfrakció és ultraszűrt fermentlé oxacillin-bontó képességének meghatározásával végeztük el. 50-50 µl mintát 30 percig 50 µl 80 µg ml⁻¹ koncentrációjú oxacillin oldattal 37°C-on előinkubáltunk, és a megmaradt oxacillin mennyiségét határoztuk meg *Bacillus subtilis* ATCC 6633 tesztörzs különböző oxacillin koncentrációkra kapott kioltási gyűrűi alapján felállított kalibrációs görbe segítségével 24 órás tenyésztés után.

3.8. β -laktamáz aktivitás kimutatása poliakrilamid géleken

A törzsek membránkötött és extracelluláris fehérjéit 1-D illetve 2-D gél elektroforézis segítségével választottuk el. Az utóbbi esetben izoelektromos fókuszálás előzte meg a molekulatömeg-szerinti elválasztást, mely során a membránkötött fehérjék esetében a „cup loading”, az extracelluláris fehérjék esetében pedig a klasszikus technikát alkalmaztuk, és 2% CHAPS (3-[(3-kolamidopropil)dimetilammónio]-1-propánszulfonát), 50 mM DTT (ditiotreitól), 0,2% Bio-Lyte 3/10 amfolit, 0,002% bromofenolkék mellett 7 M ureát és 2 M thioureát illetve csak 8 M ureát tartalmazó minta puffert használtunk.

A Na-dodecil-szulfát-poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE) során a Laemmli által leírt módszer szerint jártunk el.

Az SDS-PAGE után a két párhuzamos gél közül az egyiket 8-10 órán át inkubáltuk 37°C-on az 1% Triton X-100-at és 0,1 mM cink-szulfátot tartalmazó regeneráló oldatban, majd regenerálás után 1 mg ml⁻¹ koncentrációjú nitrocefín oldattal detektáltuk az enzimek elhelyezkedését a gélen, oly módon hogy nitrocefínbe mártott Whattman-papírcsíkot tettünk a gél 1-D gél elektroforézissel megállapított megfelelő régiójára. A detektálás és a foltok megjelelése után a gélét megfestettük Coomassie Brilliant Blue G-250 (Blue Silver) festőoldattal. A másik gélét is megfestettük Coomassie Brilliant Blue G-250-nel, és a regenerált gélen detektált enzimaktivitás segítségével azonosítottuk rajta a β -laktamáz aktivitású fehérjét.

3.9. β -laktamázok tömegspektrometriás azonosítása

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 Dr. Medzihradzky Folkl Katalin Proteomikai Kutatócsoportjának (Magyar Tudományos Akadémia Szegedi Biológiai Központ) illetve a Kromat Kft. (ugyanott) munkatársainak kivitelezésében.

3.10. β -laktamáz aktivitás mérése spektrofotometrián

A β -laktamáz aktivitású fehérjék antibiotikum-bontó képességének vizsgálatát Perkin-Elmer λ 12 UV/VIS termosztálható spektrofotométerrel végeztük. A fotometrálas 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⁻¹ lizozim törzsoldatból 0,1 ml) és 0,9 ml antibiotikum törzsoldatból állt. A nitrocefín kivételével mindegyik antibiotikum törzsoldatot (penicillin G, oxacillin, cefalorodin,

cefamandol, cefoperazon) tízszeres hígításban alkalmaztuk. A fotometrázás hullámhosszai: nitrocefin: 486 nm, penicillin G: 233 nm, oxacillin: 260 nm, cefalorodin: 260 nm, cefamandol: 274 nm, cefoperazon: 273 nm. Az enzimaktivitást az alábbi képlet segítségével számoltuk ki:

$$dA/dt \times 1000 l/\epsilon \times V_s/1000 l \times D_e, \text{ ahol}$$

dA: abszorpció változása; dt: idő változása; ϵ : extinkciós (abszorpciós) koefficiens; V_s : minta térfogata (ml); D_e : enzim hígítása. Az ϵ értékei ($\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$): nitrocefin: 16,7, penicillin G: 0,94, oxacillin: 0,45, cefalorodin: 10,2, cefamandol: 10,3, cefoperazon: 9.

3.11. 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).

4. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

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. Az OÁI által gyűjtött törzsek közül 4 szarvasmarha tőgygyulladásból izolált törzset tudunk a BORSA törzsek közé sorolni (19599/3A, 19599/3B, 7789/47, 7789/98). A Semmelweis Egyetemtől kapott törzsek mindegyike oxacillin-érzékeny volt. Így összesen 11 törzsszel végeztük el a vizsgálatokat a már előzetes kísérletek során borderline oxacillin-rezisztensnek bizonyuló, a debreceni törzsgyűjteményből származó VU94, 822, 14287/1, 9800, 9989 törzseken, és az Orietta Massidda-tól és Marina Mingoia-tól kapott a36 és a53 törzseken.

4.2. A PBP2a termelés kimutatása

Az összes klinikai izolátum esetében elvégeztük a PBP2a kimutatását. 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. Valószínűleg a PBP2a fehérje nem megfelelően működik, ezért rendelkezik a törzs alacsony oxacillin MIC-cel.

Az OÁI törzseinél és az a36 és a53 törzseknél már az izoláláskor elvégezték a *mecA* kimutatást, a törzsek *mecA* negatívak voltak.

4.3. Fágtypizálás

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.

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} $\mu\text{mol oxacillin perc}^{-1}\text{mg}^{-1}$ teljes fehérje 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. A BORSA törzsekre jellemző V. fágcsoporthoz tartozó fágokkal nem tipizálódó 7789/47 törzs esetében mértük a legalacsonyabb oxacillin-bontó képességet, ami megfelel annak a korábbi tapasztalatnak, hogy jelentősebb oxacillináz aktivitással csak az V. fágcsoporthoz tartozó BORSA törzsek rendelkeznek. Némileg ellentmond ennek, hogy az egyáltalán nem tipizálható 822-es törzs bizonyult a legaktívabbnak.

4.5. β -laktamázok molekulatömegének meghatározása 1-D SDS-PAGE-val

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

A fehérje azonosítását az 19599/3B törzs membránfrakciójából végeztük el. A 14 kDa molekulatömegű fehérjéről a MALDI-TOF analíziskor kiderült, hogy lizozim, ami a membrán izolálásakor maradt a membránhoz kapcsolódva a mintában. Ellenőrzésként 1 mg ml^{-1} lizozim törzsoldatból $10 \mu\text{l}$ -t felvittük 1-D SDS-poliakrilamid gélre, és a lizozim regenerálása után detektáltuk a nitrocefínáz aktivitást, illetve a lizozim nitrocefín és az I. generációs cefalosporin cefaloridin bontását is sikerült fotometriásan detektálnunk. Nitrocefín esetében a mért enzimaktivitás $0,162 \mu\text{mol perc}^{-1}\text{mg}^{-1}$ lizozim, cefaloridin esetén $0,0784 \mu\text{mol perc}^{-1}\text{mg}^{-1}$ lizozim volt. Sem penicillinre és oxacillinre (penám vázas antibiotikumok), sem cefamandolra (II. generációs cefalosporin), sem cefoperazonra (III. generációs cefalosporin) nem tudtunk számottevő hidrolízist kimutatni.

A lizozim a baktériumok sejtfalának gerincét alkotó glikánlánc N-acetil-muraminsav komponensét ismeri fel, és az N-acetil-muraminsav és az N-acetil-glukózamin közötti glikozid kötések hasítja. Korábbi kísérletek során kimutatták, hogy a penicillin szerkezete, funkció csoportjainak elhelyezkedése nagyon hasonló az 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 nitrocefin 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.

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

Az azonosítást minden törzs fermentlevében és membránfrakciójában elvégeztük. A 2-D gél elektroforézis után az enzimaktivitás detektálásakor általában savas (pI 4-5) és bázikus (pI 9-10) pH értéknél is tapasztaltunk nitrocefin-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. 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. 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.

A savas illetve a bázikus pI-nél azonosított fehérjék leggyakrabban a BlaZ penicillináz enzimnek bizonyultak. Az esetek többségében (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-típusú 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. 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, ez is magyarázhatja, hogy a 7789/98 és 7789/47 (különösen ez utóbbi) nem bizonyult hatékony oxacillin-hidrolizáló törzsnek. 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 plazmival rendelkeztek) a *blaZ*-nek is el kellett volna vesznie. Inkább elképzelhető, hogy eredetileg a két fehérjesáv ugyanazt a fehérjét tartalmazta, csak eltérő molekulatömeggel. Bármi is az igazság, az olasz kutatócsoport is csak a *BlaZ*-t tudta transzformálni *Escherichia coli*-ba. 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 Da) a fehérje molekula-tömegét is megemelik (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, 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.

Azonosítottunk továbbá más nitrocefin-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; 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).

5. ÖSSZEFOGLALÁS

Különböző forrásból származó *Staphylococcus aureus* törzsek 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.

Megállapítottuk, hogy az általunk gyűjtött BORSA törzsekre is jellemző, hogy tipizálódnak az V. fágcsoporthoz 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).

Kimutattuk, hogy a membrán izolálásakor használt lizozim rendelkezik antibiotikum-bontó aktivitással. Nitrocefín és cefaloridin esetén spektrofotometriásan is mérhető volt ez az aktivitás.

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.

A két bovin izolátum BlaZ enzimei kb. 7%-ban eltértek a humán eredetű törzsek enzimeitől. A törzsek vagy két BlaZ-t tartalmaztak, vagy, ami valószínűbb, egy új szekvenciavariánst.

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, a ProMoST szoftver segítségével elvégzett elemzés alapján a foszforiláció a legvalószínűbb. Ez lehet felelős az ~1kDa molekulatömeg-eltérésekért is.

6. KÖZLEMÉNYEK

6.1. A tézis alapjául szolgáló 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



6.2. 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., Schmelczer, 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



6.3. A tézishez kapcsolódó előadások, poszterek

- Keserű J**, Gál Zs, Hernádi F, Barabás Gy, Szabó I (2001) *Staphylococcus aureus* borderline meticillin rezisztenciájának vizsgálata. A Magyar Kemoterápiai Társaság XVI. Kemoterápiai Konferenciája, Hajdúszoboszló (poszter)
- Keserű J**, Gál Zs, Hernádi F, Barabás Gy, Szabó I (2001) Borderline meticillin rezisztencia mechanizmusának vizsgálata *Staphylococcus aureus* törzseken. A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2001. évi Jubileumi Nagygyűlése, Balatonfüred (előadás)
- Keserű J**, Gál Zs, Barabás Gy, Szabó I (2004) β -laktamázok borderline meticillin rezisztens *Staphylococcus aureus* törzsekben. A Magyar Kemoterápiai Társaság XVIII. Kongresszusa, Budapest (előadás)
- Keserű J**, Gál Zs, Kaszanyitzky É, Jánosi Sz, Somogyi P, Szabó I (2004) Csökkent methicillin érzékenységű humán és bovin eredetű *Staphylococcus aureus* izolátumok vizsgálata. A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2004. évi Nagygyűlése, Keszthely (előadás)
- Keserű J**, Buzás K, Csorba A, Medzihradszky F. K, Birta G, Hulvely J, Szabó I (2006) *Staphylococcus*ok béta-laktamáz termelésének vizsgálata proteomikai módszerrel. A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2006. évi Nagygyűlése (előadás)
- Keserű J**, Szabó I, Gál Zs, Hulvely J, Hunyadi-Gulyás É, Medzihradszky F. K, Biró S (2009) Proteomic investigation of beta-lactamases in human and bovine isolates of borderline methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. Second Central European Forum for Microbiology, Keszthely (előadás)

6.4. Egyéb előadások, poszterek

- Laukó A, Vargha Gy, Szabó I, Penyige A, Barabás Gy, Hunyadi-Gulyás É, Medzihradszky F. K, Czipa E, Maracsineszku C, **Keserű J** (2010) Szénhidrogén-szennyezett talaj bioremediációjára képes Actinomyceták szelektálása és a leghatékonyabb törzs proteomikai vizsgálata. Magyar Mikrobiológiai Társaság 2010. évi Nagygyűlése, Keszthely (poszter)
- Gulyás G, Czeglédi L, **Keserű J**, Birkó Zs, Jávora A (2010) 2D PAGE analyses of pig muscle membrane proteome. Proteomic Workshop, Aveiro, Portugália (poszter)
- Czeglédi L, Gulyás G, Prokisch J, Birkó Zs, **Keserű J**, Pohóczky K, Jávora A (2011) Selenium as feed supplement changes proteome of chicken liver. COST-Farm Animal Proteomics Spring Meeting, Glasgow, Scotland, UK (előadás)