

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

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

Készítette:
Dr. Bartalné Deák Eleonóra
Biológus, gyógyszerész



Témavezetők:
Dr. Penyige András
Egyetemi docens
és
Dr. Szabó István
Tudományos főmunkatárs

DEBRECENI EGYETEM
ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR
HUMÁNGENETIKAI INTÉZET
2004

BEVEZETÉS

A STREPTOMYCESEK JELENTŐSÉGE

A *Streptomyces* Gramm-pozitív, fonalas, talajlakó, obligát aerob, szaprofita, bonyolult morfológiai differenciálódási folyamattal rendelkező prokaryoták. A *S. griseus* törzset 3 figyelemreméltó tulajdonsága emeli ki a többi *Streptomyces* fajok közül: 1. Az első aminoglikozid antibiotikumot, a streptomycint, ebben a törzsben fedezték fel; 2. Ez a species, eltérően sok más *Streptomyces* fajtól, folyadék kultúrában is képez spórákat, ezért az antibiotikum termelés és a morfológiai differenciálódás folyamata könnyen vizsgálható; 3. A *S. griseus* termel egy kis molekulatömegű, diffúzibilis autoregulátor hatású vegyületet, - ún. prokaryota „hormont”- az A-faktort (AF), ez az extracelluláris regulátor molekula szabályozza a spóráképzést és a streptomycin termelést is.

A *Streptomyces*-ek életciklusa eltérőnek mutatkozik, ha szilárd vagy folyékony táptalajon növesztjük a sejteket. A talajban, és mesterséges szilárd táptalajon az életciklus a spórák csírázásával kezdődik, a spórákból kifejlődő csíracsővekből apikálisan növekvő elágazó hifák jönnek létre, melyek szövedéke alkotja a vegetatív vagy szubsztrát micéliumot. A vegetatív micéliumból többszöri elágazás után a talajból kiemelkedő fehér színű lég- vagy reproduktív micélium jön létre, amelynek a csúcsán kialakuló sporangiumokban megjelennek a spórák. A legtöbb *Streptomyces* faj laboratóriumi körülmények között tenyészthető folyékony táptalajban is, a megfelelő oxigénellátás biztosításával (rázott tenyészet). Ebben az esetben más jellegű az életciklus, itt ugyanis még azon fajok esetében sem jön létre légmicélium, amelyek spóráznak folyadék tenyészetben, hanem a vegetatív micéliumból kialakult reproduktív micélium hozza létre a spórákat az életciklus végén.

A β -LAKTÁM ANTIBIOTIKUMOK

A β -laktám antibiotikumok a 3 C és 1 N atomból felépülő négytagú β -laktám gyűrűjükről kapták nevüket. A penicillinen kívül a cefalosporinok, monobaktámok és carbapenemek tartoznak a β -laktám antibiotikumok családjába

A penicillinek tulajdonképpen a 6-amino-penicillánsav különböző savakkal acilezett származékai. A biológiai hatásért a penicillin alapváza a felelős, ha szerkezetében változás történik, akkor antibakteriális hatása elvész. A β -laktám antibiotikumokkal szemben kialakuló rezisztencia leggyakoribb típusa a β -laktamáz enzim termelésén alapul, a baktériumok által termelt β -laktamáz enzim a β -laktám antibiotikumok hatócsoportját, a β -laktám gyűrűt hasítja el, ami hatástalanná teszi a molekulát.

A β -laktám antibiotikumok baktériumokra kifejtett letális hatása egy nagyon komplex jelenség. Ezek az antibiotikumok kettős, baktericid és bakteriolitikus hatással is rendelkeznek. A baktérium tenyészet a penicillinnel való kezelés után röviddel elpusztul, míg a lízis egy rövid lag-periódus után következik be. A penicillin a növekedési fázistól függő hatást mutat, csak az exponenciális növekedési szakaszban levő sejteket pusztítja el. Amint a baktérium belép a stationer fázisba, a baktériumsejtek túl tudják élni a penicillinnel való kezelést. Terápiás, baktericid hatásuk alapja, hogy gátolják a sejtfa­l szintézisének utolsó lépéseit katalizáló, a peptidoglikán molekula aminosav oldalláncai közti keresztkötéseket kialakító transzpeptidáz enzimet.

A BAKTÉRIUMOK LÍZISE

Több mint 70 évvel a felfedezése után a penicillin bakteriolitikus hatásának mechanizmusa még mindig nem tisztázott. A penicillin és egyéb rokon vegyületek lítikus hatását két hipotézis magyarázza. Az egyik elképzelés szerint a lízis egy morfogenetikai hiba következménye. A β -laktám antibiotikumok megszüntetik a sejtfa­l normális metabolizmusában közreműködő szintetikus enzimek és az endogén autolizinek, az endogén peptidoglikán hidrolázok kiegyensúlyozott normál működését. A hidrolázok kontrollálatlan aktivitása következtében a peptidoglikán 3 dimenziós struktúrájának integritása és stabilitása megbomlik, az előzetesen elkészült sejtfa­lon kialakuló lyukakon keresztül a belső nagy turgor nyomás következtében a citoplazma membrán kitüremkedik, s ez vezet végül a sejt líziséhez. A másik elképzelés egy, a peptidoglikán hidrolázokat aktiváló mechanizmust feltételez. Ez az elmélet a bakteriofágok által generált sejt­lízis eredményeit felhasználva próbálja megmagyarázni a sejtfa­l lízis folyamatát. Ez az elmélet feltételezi, hogy a citoplazma membrán energetizált állapota fontos tényező az autolizinek működésének szabályozásában. Az utóbbi időben vált ismertté, hogy a λ -fággal fertőzött *E. coli* sejtekben a membránpotenciál depolarizációja, a λ S holin fehérjék összeszerelődését eredményezi a membránban. A holin fehérjék olyan méretű lyukat hoznak létre a membránban, amelyen keresztül kijutnak az autolitikus enzimek, és könnyen hozzáférnek a szubsztrátjukhoz. Az ily módon működőképessé vált holin fehérjék a murein sejtfa­l lízisét idézik elő. A holinokkal homológ fehérjéket baktériumokban is leírtak.

A β -LAKTAMÁZ ENZIM JELLEMZÉSE

A β -laktamáz enzimek egyaránt megtalálhatóak a Gram-pozitív, és Gram-negatív baktériumokban is. Ezen enzimek egyetlen közös tulajdonsága, és eddig egyetlen ismert

funkciója a β -laktám gyűrű hidrolízise, és ezáltal az antibiotikum inaktiválása. Az ismert β -laktamázok többsége (A, C és D osztály) szerin aminosavat tartalmaz az aktív centrumában, β -laktám vegyületekkel reakcióba lépve acilenzim intermediert képeznek, ám a DD-peptidázokkal ellentétben ez az intermedier gyorsan hidrolizál és az antibakteriálisan inaktív penicilloesav származék keletkezik. A patogén baktériumok többségében a β -laktamáz enzim jelenléte a felelős a β -laktám antibiotikumokkal szemben kialakuló rezisztenciáért.

A Gram-pozitív baktériumok β -laktamázai többnyire extracelluláris fehérjék, míg a Gram-negatív baktériumokban a periplazmatikus térben akkumulálódnak. *Streptomyces*-ekben eddig csak extracelluláris térben akkumulálódó β -laktamázokat írtak le.

A legtöbb *Streptomyces* faj különösen rezisztens nagy penicillin koncentrációkkal szemben. Érdekes módon ezekben a törzsekben a β -laktamáz enzim rezisztenciában betöltött szerepe kérdéses, hiszen nincs korreláció az enzimtermelés mértéke és a rezisztencia foka között. Ráadásul ezekben a fajokban a β -laktámokkal szembeni legfőbb védelmi mechanizmus valószínűleg nem az enzimtermelés, hanem olyan PBP-ek jelenléte, amelyek nagyon kis affinitással rendelkeznek a β -laktám molekulákkal szemben.

A β -laktamáz enzim fiziológiai szerepe, különösen a nem patogén és β -laktám antibiotikumot nem termelő baktériumokban, mint pl. a *Streptomyces* fajokban, azonban máig is tisztázatlan. Az 1990-es évekig tartotta magát az a nézet, hogy a β -laktamázok, ellentétben a PBP-vel, nem szükségesek a peptidoglikán sejtfal metabolizmusához. Legújabb eredmények azonban arra utalnak, legalábbis Gram-negatív baktériumokban, hogy a β -laktamáz enzim termelés kapcsolatban állhat a sejtfal metabolizmusával. A Gram-negatív baktériumok többségében megtalálható AmpC β -laktamáz indukcióját ugyanis a sejtfal prekursorok intracelluláris koncentrációja szabályozza.

CÉLKITŰZÉS

Egészen a 90-es évek elejéig úgy gondolták, hogy a β -laktamáz enzimek elsődleges és egyetlen szerepe az antibiotikumot termelő törzsekben a baktérium által termelt antibiotikummal szembeni saját rezisztencia biztosítása. A β -laktamáz enzim génje ugyanis, a többi rezisztencia génhez hasonlóan, az antibiotikum szintézisét végző génklaszterben található. Az antibiotikumot nem termelő törzsekbe géntranszferrel kerültek be a rezisztencia gének, ami szelekciós előnyt biztosított számukra.

Az utóbbi évek tanulmányai, amelyek arra keresik a választ, hogy a baktérium sejtek hogy ismerik fel, és hogy reagálnak a β -laktám antibiotikumok jelenlétére, érdekes megvilágításba helyezte a β -laktamáz enzim szerepét. Az a felfedezés, hogy egyes β -laktamáz enzimek (pl. AmpC, AmpH) szerepet játszanak a peptidoglikán szintézisben és metabolizmusban, valamint a sejtek morfológiájának kialakításában, megerősíti azt a feltételezést, hogy a β -laktamáz enzimek sokkal fontosabb szerepet játszanak a bakteriális fiziológiai folyamatokban, mint azt korábban gondolták.

Munkánk során a következő feladatokat tűztük ki célul:

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

Bár a penicillint már a II. Világháború idején alkalmazták a fertőző betegségek gyógyításában, valójában az antibiotikum bakteriolitikus / baktericid hatása máig sem tisztázott. A β -laktám antibiotikumok peptidoglikán sejtfal szintézisét gátló hatásának molekuláris mechanizmusa jól ismert, azt azonban nem tudjuk, hogy milyen mechanizmus útján okozzák a baktérium sejtek lízisét. Feltételezések szerint, a baktériumok sejt lízisének kiváltásában egy fontos korai szignál a sejtmembránon keresztül kialakuló elektrokémiai-proton gradiens egyik komponensének, a membránpotenciálnak a változása. *Bacillus subtilis*-ban kimutatták, hogy azok az antibiotikumok és szétkapcsoló szerek, amelyek megváltoztatják a sejtmembrán ionokkal szembeni permeabilitását, azaz depolarizálják a $\Delta\Psi$ -t, az autolízist stimulálják és a sejtek halálát eredményezik. Ezen információk alapján feltételeztük, hogy a β -laktám antibiotikumok autolízist előidéző hatása mögött álló ismeretlen mechanizmus a sejtmembrán elektrofiziológiai állapotának β -laktámok hatására bekövetkező változása lehet.

Hipotézisünk bizonyítására két kísérleti rendszert dolgoztunk ki:

1. A β -laktám antibiotikumokkal és ionofór vegyülettel történő kezelésre bekövetkező bakteriolízis tanulmányozására.

2. Annak bizonyítására, hogy a sejtmembrán energia állapota fontos faktora az antibiotikum lítikus hatásának, kidolgoztunk egy módszert a β -laktám antibiotikumoknak a sejtmembrán elektrofiziológiai állapotára való hatásának tanulmányozására a *Streptomyces griseus* NRRL B-2682 törzsben.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

I. Baktérium törzsek

Kísérleteink során a talajból izolált, vad fenotípusú, streptomycin antibiotikumot termelő *S. griseus* NRRL B-2682 törzset, és ennek a törzsnek az általunk izolált, nem spórázó, AF-t és antibiotikumot nem termelő, spontán mutáns *S. griseus spoI⁻, spo2⁻, spo3⁻* törzseit használtuk. A *spoI⁻, spo2⁻, spo3⁻* törzsek érzékenyek az AF-ra, külsőleg adott szintetikus AF hatására normál differenciálódásuk, és az antibiotikum termelésük is visszaállítható.

II. Tenyésztési körülmények

A *S. griseus* vad típusú törzsének mélytenyészetét DM táptalajra oltott spóra szuszpenzióval indítottuk, a tenyészetet 27 °C-on, rázógépből inkubáltuk 250-es fordulatszám mellett. Szilárd táptalajként 2 % (m/v) Bacto agarral kiegészített DM médiumot használtunk, és 27 °C-on termosztátban tenyésztettük a *S. griseus* törzset.

A nem spórázó, mutáns *S. griseus* törzs tenyészetét az AF segítségével létrehozott spóra szuszpenzióval indítottuk mély és szilárd felszínű tenyészetekben egyaránt.

III. A β -laktamáz enzim aktivitásának mérése

A β -laktamáz enzim aktivitását a nitrocefin hidrolízisének mérésével határoztuk meg. A nitrocefinből (NC) törzsolatot készítettünk, a β -laktamáz enzimforrást, a 0.05 M foszfát puffert (pH 7.0) tartalmazó reakcióelegyet 5 percig 37 °C-on inkubáltuk, majd hozzámértük a NC törzsolatot. Az 1 ml végtérfogatú reakció elegyet pontosan 10 percig inkubáltuk 37 °C-on. A reakcióelegy fényelnyelését 485 nm-en mértük.

IV. Analitikai módszerek

1. A *S. griseus* törzs β -laktamáz enzimeinek tisztítása, N-terminális szekvencia meghatározása

A *S. griseus* vad típusú törzs tenyészetét lecentrifugáltuk, és a felülúszóból 70 % (m/v) (NH₄)₂ SO₄-tal csaptuk ki a β -laktamáz enzimet, majd az így bekonzentrált mintákat Bio-Gel P6

oszlopon só-mentesítettünk. Az enzim izolálásának következő lépéseként FPLC készülékkel végzett **kromatofókuszálás**, majd **gélszűrés** következett. A citoplazma membránhoz kötött enzim izolálásához membránt preparáltunk a *S. griseus* vad típusú és a mutáns törzsének tenyészetéből nyert protoplasztokból. A β -laktamáz enzim sejtmembránból történő kinyeréséhez a Kharroubi és munkacsoportja által leírt limitált tripszines emésztést választottuk. A tripszines emésztéssel nyert mintákból az előzőkben leírt, az extracelluláris enzim tisztításánál alkalmazott eljárásokkal (kromatofókuszálás, koncentráció, gélszűrés) teljesen azonos módon izoláltuk a membránhoz kötött β -laktamáz enzimet a *S. griseus* vad és mutáns törzséből.

A *S. griseus* NRRL B-2682 törzs citoplazma membránjából és az extracelluláris teréből, valamint a *S. griseus spoI* törzs membránjából izolált β -laktamáz enzimeket a kromatofókuszálást és gélszűrést követően 13 %-os SDS-poliakrilamid gélen futtattuk meg. A gélből a fehérjéket elektroforetikusán átblottoltuk ProBlottTM (Applied Biosystems) immobilizációs membránra „semi-dry” rendszerben, és az így készített blottot használtuk a β -laktamáz enzim N-terminális szekvenciájának a meghatározásához.

V. Egyéb módszerek

1. A sejtlízis mérése a micéliumban

A *S. griseus* NRRL B-2682 törzset DM táptalajban tenyésztettük 27 °C-on, rázott tenyészetben. A sejtfal jelölése céljából a 10 órás, korai-exponenciális növekedési fázisban levő tenyészetet kiegészítettük 0,1 mM N-acetil-D-(1-³H)glükózámmal (5 μ Ci/minta, 370 GBq/mmól). Három órás inkubálás után a jelzett micéliumot centrifugálással gyűjtöttük össze, kétszer mostuk 0.1 M Tris/HCl pufferrel és reszuszpendáltuk friss, radioaktívan nem jelölt DM táptalajjal. Ebből a kultúrából egyenlő mennyiségű mintákat vettünk, és kiegészítettük a megfelelő teszt reagensekkel. Ezeket a mintákat tovább tenyésztettük, 27 °C-on és 250 rpm sebességgel rázógéppben rázatott tenyészetben. A tenyészetből vett minták felülúszójában folyadék szcintillációs módszerrel megmértük a lízis során a sejtfalból felszabaduló radioaktivitást.

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

A membránpotenciál mérésére a $\Delta\Psi$ szenzitív karbocianin festéket, a DiOC₆(3)-ot használtuk, a végső festék koncentrációt 100 nM-ra állítottuk be minden kísérletben. A *S. griseus* sejtekből készült protoplasztokat gyenge kevertetés mellett adtuk a festék oldathoz, a

végző sejtszám kb. $1-2 \times 10^8$ protoplaszt/ml médium volt. Miután a protoplasztokat hozzáadtuk a mintákhoz, megvártuk, míg a rendszer egyensúlyi állapotba kerül, majd a teszt reagensek (ionofórok, antibiotikumok) injektálása után folyamatosan regisztráltuk a minta fluoreszcens intenzitását. A fluoreszcens intenzitás mérését egy termosztálható, Hitachi Perkin-Elmer MPF-4 spektrofluoriméterrel végeztük, állandó $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ hőmérsékleten. A mérések során a gerjesztési hullámhossz, $\lambda=475\text{ nm}$, az emissziós hullámhossz $\lambda=510\text{ nm}$ volt. A fluoreszcens szignálokat a Sims és munkatársai által a karbocianin festék származékokra javasolt „response” mechanizmus alapján értékeltük. Így a reagensek injektálása után, a rendszer egyensúlyi fluoreszcens intenzitásának csökkenése hiperpolarizációt, míg az emissziós intenzitás növekedése a plazmamembrán depolarizációját jelenti.

EREDMÉNYEK

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

1. A β -laktamáz enzim expressziójának időbeli lefutását és az enzim lokalizációját megvizsgálva kimutattuk, hogy a *S. griseus* NRRL B-2682 vad típusú törzsből az enzim extracelluláris és membránhoz kötött formája is megtalálható, míg a nem differenciálódó, spontán mutáns *spoI* tenyészetében csak a membránban mérhető enzimaktivitás.

2. Két további spontán mutáns, nem spórázó törzset (*spo2*⁻, *spo3*⁻) izolálva megerősítettük ezt a tapasztalatunkat, ezekben is csak a plazmamembránba lokalizált enzimet tudtuk kimutatni.

3. Az autoregulátor AF-t nem termelő, nem differenciálódó mutáns törzsek tenyészetéhez adva az AF-t, visszaállította a vad fenotípust, és ezzel párhuzamosan az enzim extracelluláris térbe történő szekrécióját is kiváltotta.

4. Ha 0.5 % kazein hidrolizátummal (CH) vagy $15\text{ }\mu\text{M}$ *m*-amino-fenil-boronsavval meggátoljuk a vad típusú törzs spórázását, a β -laktamáz enzimaktivitás sem jelent meg a vad típusú törzs tenyészetének felülúszójában, aktivitás csak a membránban volt mérhető.

5. A globomycin a spórázó és a *spoI* mutáns törzsek tenyészetében jelentősen megnövelte az enzim extracelluláris térbe történő kiválasztását, és ezzel párhuzamosan csökkentette a plazmamembránba lokalizált enzim mennyiségét, a totál penicillináz aktivitás nem változott.

6. A differenciálódásban 0.5 % CH-mal gátolt tenyészetekben a sejtfal peptidoglikán prekursorok, a tisztított és autolizinnel emésztett sejtfalpreparátum, az $\text{Ac}_2\text{-L-Lys-D-Ala-D-Ala}$ valamint szubinhibitor koncentrációjú penicillin G is megnövelte a β -laktamáz enzim extracelluláris térbe történő szekréciójának mértékét a kontroll kultúrához képest, amelyben az

enzim szolubilis formája nem volt kimutatható. Ugyanakkor ezek a vegyületek jelentősen lecsökkentették a membránhoz rögzített enzimforma mennyiségét, míg a tenyészetek teljes β -laktamáz aktivitása változatlan maradt.

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

1. A módszertani fejezetben leírt elválasztási lépéseket (kromatofókuszálás, gélszűrés, ultraszűrés) követően az SDS-poliakrilamid gélből elektroforetikusán átblottoltuk a fehérjéket ProBlott™ membránra, s ebből a mintából határoztuk meg a β -laktamáz enzim N-terminálisán levő aminosavakat. Az extracelluláris enzimfehérje fehérje N-terminális régióján a következő szekvenciát mutattuk ki: **AAADIPIANVNA**. A membránhoz kötött enzim N-terminális aminosavait nem sikerült meghatározni (blokkolt N-terminális vég).

2. A Samuni által kidolgozott UV spektrofotometriás módszerrel kimutattuk, hogy a β -laktamáz enzim vad és a mutáns törzsből izolált formái a benzilpenicillint bontották a leggyorsabban, hasonló mértékben hidrolizálták az ampicillint, a cefalosporinok közül az első generációs cefaloridin már sokkal gyengébb szubsztrátnak bizonyult, a második generációs cefamandol kis mértékben bontotta az enzim, míg a harmadik generációs cefalosporinokat egyáltalán nem hidrolizálta egyik β -laktamáz enzim sem.

3. Enzim inhibitorok közül 1 mM koncentrációjú *m*-APBA majdnem 50 %-kal csökkentette valamennyi enzimforma aktivitását. A *p*-CMB-vel szemben érzékeny volt a β -laktamáz enzim, ezt a gátlást ciszteinnel ki lehetett védeni. A NaCl valamint az EDTA egyáltalán nem volt hatással a β -laktamáz enzim aktivitására.

3. A β -laktamáz enzimek specifikus gátlószereinek K_i értékét a Dixon módszerrel határoztuk meg. A β -laktamáz enzim valamennyi formája a klavulánsavval szemben mutatkozott a legérzékenyebbnek, kisebb mértékben gátolta az enzimeket a szulbaktám, míg az aztreonám és a cloxacillin alig befolyásolta működésüket.

III. A *S. griseus* NRRL B-2682 törzs morfológiai differenciálódásának befolyásolása β -laktám vegyületekkel, peptidoglikán sejtfalat alkotó molekulákkal és a peptidoglikán szintézisét gátló antibiotikumokkal

Szilárd felszínű tenyészetek vizsgálata

β -laktám szerkezetű vegyületek hatásának tanulmányozása

1. A gradiens lemez módszerrel a differenciálódást gátló 0.5 % CH-ot és penicillin G antibiotikum gradienst ($0-100 \mu\text{gml}^{-1}$) is tartalmazó DM táptalajra leoltva a *S. griseus* spóráit, a penicillin G MIC alatti koncentrációban visszaállította a légmicélium és spóráképzést. A penicillin G spórázást befolyásoló hatásának életkortól való függését agar-diffúziós teszttel bizonyítottuk. A differenciálódásban gátolt, 24 órás sejtekhez adott penicillin G már nem állította helyre sem a légmicélium-, sem a spóráképződést.

2. Az agar-diffúziós tesztet alkalmazva tanulmányoztuk egyéb β -laktám antibiotikumok hatását a differenciálódásban gátolt *S. griseus* sejtekre. Az ampicillin, a cefaloridin és a cefamandol a penicillinhez hasonlóan életciklus függő hatást mutatott, csak a korai exponenciális növekedési fázisban adva állította vissza a spórázást, 24 órás korú tenyészetekhez adva már hatástalannak bizonyult mindhárom antibiotikum.

3. A fentiekkel teljesen megegyező körülmények mellett teszteltük a 6-APA-nak, a penicillin inaktív prekurzorának a hatását. A 6-APA nem befolyásolta a differenciálódást.

A peptidoglikán komponensek differenciálódásra gyakorolt hatása

1. Agardiffúziós módszerrel, az előzőkkel teljesen azonos körülmények között megvizsgáltuk a sejtfalet felépítő peptidok, valamint az N-acetilmuraminsav (NAM) hatását a törzs differenciálódására. A D-Ala-D-Ala, az $\text{Ac}_2\text{-L-Lys-D-Ala-D-Ala}$ és a NAM visszaállították a differenciálódásában gátolt törzs szabályos életciklusát.

2. Azokban a kontroll kísérletekben, amelyekben olyan aminosavakat használtunk (triptofán, hisztidin, cisztein), amelyek nem találhatóak meg a sejtfaletben, egyik esetben sem tapasztaltuk az eredeti fenotípus visszaállását.

A peptidoglikán szintézisét gátló, de nem β -laktám típusú antibiotikumok hatásának vizsgálata

1. A sejtfalet bioszintézis gátlószerei közül a vancomycin kor és koncentráció-függő módon visszaállította a spórázásában gátolt tenyészet légmicélium képzését, 36 órás korban már a spórák is megjelentek.

2. Érdekes módon a sejtfaletszintézis korábbi lépéseit gátló antibiotikumok esetében nem tapasztaltunk hasonló hatást, a bacitracin, a foszfonomycin és a cikloszerin egyáltalán nem befolyásolta a törzs differenciálódását.

Folyadék tenyészetek vizsgálata

1. A *Streptomyces* törzsek többségével ellentétben a *S. griseus* folyadék tenyészetben is képez spórákat. A sporulációban 0.5 % CH-mal gátolt tenyészetben a penicillin G, az $\text{Ac}_2\text{-L-Lys-D-Ala-D-Ala}$, az adjuváns peptid és az emésztett és tisztított sejtfalet fragmensek korfüggő módon

helyreállították a törzs szabályos differenciálódását, bár a spórázás kb. 60 órában indult meg, a normál életciklushoz képest 24 órával később.

2. Azonos feltételek mellett azokból az aminosavak (hisztidin, cisztein, triptofán), amelyek nem vesznek részt a peptidoglikán felépítésében, nem függesztették fel a CH spórázást gátló hatását.

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

1. Kísérleteink második részében a β -laktám antibiotikumok sejtfal lízist kiváltó hatásának mechanizmusát vizsgáltuk. Pontosabban azt, hogy van-e szerepe a citoplazma membrán $\Delta\Psi$ értékében bekövetkező változásnak a sejtfal autolízisének kiváltásában. Tanulmányoztuk a penicillin G és a gramicidin D hatását [^3H]-N-acetilglükózaminnal jelzett sejfalfragmentek felszabadulására *S. griseus* törzs tenyészetében.

2. A penicillin G és a gramicidin D a kezeletlen kultúrához képest jelentősen megnövelte a jelölt sejtfal fragmentek felszabadulását, azaz a sejlízist. A penicillin G-vel kezelt mintákban a felszabadult radioaktivitás már az inkubáció kezdetétől eltelt 3. órára magasabb értéket ért el, mint amit a gramicidin D okoz a 12 órás inkubálás alatt. Ráadásul a penicillin G hatására felszabadult sejtfal fragmentek mennyisége már 5 órás inkubálás után megközelíti a maximális értéket.

A Gramicidin D ionofór és a penicillin G hatása *S. griseus* NRRL B-2682 sejtek membránpotenciál értékére

1. A membránpotenciálra ($\Delta\Psi$ -re) szenzitív fluoreszcens festéket, (DiOC₆(3)) használva spektrofluorimetriás módszerrel mértük, hogy a gramicidin D és a penicillin G milyen hatással van a citoplazma membrán elektrofiziológiai állapotára.

2. Eredményeink azt mutatták, hogy a gramicidin D a várakozásnak megfelelően depolarizálta a $\Delta\Psi$ -t.

3. A korai-exponenciális növekedési fázisban levő sejtekből preparált protoplasztokhoz adott $2 \times \text{MIC}$ penicillin G az alkalmazott dózisok számától függő, fokozatosan növekvő, de csak részleges depolarizációt okozott, ugyanis gramicidin D-t adva ezekhez a protoplasztokhoz, további depolarizációt tudunk kiváltani.

4. A penicillin G $5 \times \text{MIC}$ koncentrációban nagyobb csökkenést okozott a $\Delta\Psi$ értékében, ráadásul a nagyobb koncentrációjú antibiotikumból adott második dózis szinte teljesen

depolarizálta a membránt, az ezt követően adott gramicidin D már csak kis mértékben tudta tovább depolarizálni a protoplasztok $\Delta\Psi$ értékét.

5. A penicillin G depolarizáló hatása korfüggést mutat. Az idősebb korú protoplasztokon a penicillin G-nek még $5 \times \text{MIC}$ -ban sem volt hatása a membránpotenciál értékére.

6. Miután a β -laktamáz aktivitás már a csírázás után is detektálható a *S. griseus* membránjában, így elvileg az is lehetséges, hogy nem maga a penicillin G, hanem ennek elbontott, biológiailag inaktív származéka a penicilloesav befolyásolja a $\Delta\Psi$ értékét. Ezt a lehetőséget is megvizsgáltuk, azonban a penicilloesav még igen nagy, 10^{-3} M koncentrációban sem depolarizálta a *S. griseus* protoplasztjainak a $\Delta\Psi$ értékét.

7. A penicillin G biológiailag inaktív alkotója, a 6-amino-penicillánsav nagy dózisa még hosszabb inkubáció után sem változtatta meg a protoplasztok membránpotenciálját.

8. Az ampicillin és más cefalosporin antibiotikumok is kor és koncentráció függő módon depolarizálták a protoplasztok $\Delta\Psi$ értékét, bár egyik β -laktám vegyület sem volt olyan jó depolarizáló ágens, mint a penicillin G. Az ampicillin és a cefalosporin kezelést követően a gramicidin D 10^{-6} M koncentrációban a protoplasztok membránjának azonnali, szignifikáns depolarizációját okozta.

MEGBESZÉLÉS

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

A β -laktamáz enzim termelődését tanulmányozva kimutattuk, hogy a *S. griseus* NRRL B-2682 vad típusú törzsben és a nem spórázó, spontán mutáns *spoI* törzsében is először a citoplazma membránban jelenik meg az enzim, már az 5 órás sejtekben mérhető a β -laktamáz aktivitás. Az extracelluláris enzimaktivitás azonban csak a spórázó törzs tenyészetében, a késői-exponenciális növekedési szakban jelenik meg. A *Streptomyces* törzsekből eddig izolált β -laktamáz enzimek mind konstitutívan szintetizáltak, extracelluláris enzimek, tudomásunk szerint **ez az első membránhoz kötött enzimforma**, amit *Streptomyces* fajokban kimutattak.

Összefoglalva tapasztalatainkat látható, hogy minden olyan tenyésztési körülmény esetén, ahol gátoltuk a spórázást (0.5 % CH vagy 15 μM APBA adása), a β -laktamáz enzim mindig a citoplazma membránhoz kötve maradt. A nem spórázó mutáns törzseket (*spoI*, *spo2*, *spo3*)

AF-ral sporulációra bírva, a mutánsok a spórák megjelenésével párhuzamosan kiválasztották a fermentlébe az enzimet. Ezek az eredmények alátámasztják kiindulási hipotézisünket, hogy a *S. griseus* törzsben **a β -laktamáz enzim extracelluláris térbe történő szekréciója a differenciálódási folyamattal kapcsolatos történik.**

Globomycin - mely a membránhoz kötött lipoproteinek „processzingjét” katalizáló szignál-peptidáz II enzim specifikus gátlószere - jelenlétében csökkent a β -laktamáz akkumulációja a membránban, és ezzel párhuzamosan fokozódott az enzim extracelluláris térbe történő szekréciója a spórázó és a nem spórázó mutáns törzsben is. Ezek az adatok megegyeznek a Nielsen és mtsai által *B. licheniformis*-ban, és *B. cereus*-ban közölt eredményekkel. A szignál-peptidáz II enzim gátlása miatt elmarad az N-terminális szignál peptid megfelelő „processzingje”, nem képződik az N-terminálison szabad aminosocporttal rendelkező cisztein, aminek hiányában nem jön létre az enzimet a membránba horganyzó lipidmódosítás, ennek eredményeképpen a módosítatlan β -laktamáz enzim kikerül az extracelluláris térbe. Eredményeink azt mutatják, hogy a *S. griseus* törzsben **a β -laktamáz enzim prelipoproteinként szintetizálódik**, és a megfelelő „processing” után az enzim posztranszlációosan módosult formája egy lipid molekula segítségével a membránhoz kötődik, és csak az életciklus későbbi szakaszában kerül ki az extracelluláris térbe.

A közel homogenitásig tisztított mintákból a következő aminosavakat mutattuk ki az extracelluláris enzim N-terminálisán: **AAADIPIANVNA**. Az így azonosított szekvencia a Swiss-Prot / TrEMBL adatbázisok alapján egy *S. griseus* törzsből izolált D-aminopeptidáz enzim N-terminális aminosavaival (**APDIPLANVKA**) mutat nagyfokú, 81.8 %-os homológiát. Tulajdonképpen a β -laktamáz enzimet, D-aminopeptidáz enzimet és a PBP-eket hasonló tulajdonságaik, és az általuk katalizált reakciók hasonlósága alapján penicillin felismerő enzimek szupercsaládjába sorolják.

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

A vad típusú és a mutáns *S. griseus* törzsből izolált valamennyi enzimforma a benzilpenicillint bontotta a legnagyobb mértékben, és a többi β -laktám szerkezetű vegyületet hasonló mértékben hidrolizálták az enzimek. Ezen eredmény alapján feltételezzük, hogy a *S. griseus* törzsből **penicillináz** típusú enzimet izoláltunk. Kísérleteink szerint valamennyi enzimforma nagymértékben gátolható volt *m*-APBA-val és *p*-CMB-tal, ami valószínűsíti, hogy az izolált β -laktamáz enzimek aktív centrumában szerin aminosav található, és katalitikusan fontos egy cisztein aminosav jelenléte. Dixon módszerrel meghatározva a jól ismert β -laktamáz

gátló vegyületek különböző enzimformákra vonatkozó K_I értékét, a klavulánsav K_I értéke bizonyult a legkisebbnek, alátámasztva azt a feltételezésünket, hogy a *S. griseus* törzs β -laktamáz enzime penicillináz típusú. Mivel az eltérően lokalizált enzimeknek valamennyi kísérletesen megállapított jellemzője (szubsztrát profil, enzimgátlás, K_I , IEP, molekula tömeg) azonosnak bizonyult, feltételezzük, hogy a *S. griseus* NRRL B-2682 törzs membránhoz kötött illetve az extracelluláris térből izolált β -laktamáz enzime ugyanannak a fehérjének eltérően processzált formája.

Tanulmányoztuk a β -laktamáz enzim termelése és a sejtfa bioszintézis / metabolizmus között fennálló lehetséges kapcsolatot is a *S. griseus* törzsben. Ha a vad típusú törzs olyan mélytenyészetéhez, amely spórázást represszáló körülmények között növekedett a penicillin G-t MIC-nél kisebb koncentrációban adtuk, az antibiotikum kiváltotta az enzim extracelluláris térbe történő szekrécióját. Fontos megjegyezni, hogy a β -laktamáz enzim termelése nem indukálódott ilyen feltételek mellett növesztett tenyészetekben sem. Teljesen azonos, tehát spórázást gátló feltételek mellett tesztelve a tisztított és autolizinnel emésztett sejtfafragmentek, és a sejtfa-analóg tripeptid az $Ac_2-L-Lys-D-Ala-D-Ala$ β -laktamáz enzimprodukciónak gyakorolt hatását, az előzőkkel megegyező eredményeket kaptunk.

Ezek az eredmények megerősítik korábbi feltételezésünket, miszerint a *S. griseus* NRRL B-2682 törzs β -laktamáz enzime konstitutívan szintetizált fehérje, amely a stacioner növekedési fázisig a sejtmembránhoz kötődve található, majd a spórázás megindulásakor kerül ki az extracelluláris térbe.

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

A sejtfafragmentek / prekursorok és a β -laktám vegyületek β -laktamáz szekrécióra gyakorolt hatását vizsgálva érdekes és meglepő jelenséget figyelhettünk meg. A *S. griseus* vad típusú törzsének spórázást represszáló feltételek mellett növekvő tenyészetében a sejtfa szintézist gátló penicillin G, a β -laktám szerkezetű egyéb antibiotikumok (ampicillin, cefaloridin), a sejtfa prekursor D-Ala-D-Ala, az $Ac_2-L-Lys-D-Ala-D-Ala$ és a NAM vegyületek hatására megjelent a légmicéliumok, majd ennek csúcsán a spóra a *S. griseus* tenyészetében. Ezek a vegyületek korfüggő módon hatnak, a stacioner növekedési fázisban levő tenyészetekre már hatástalanok bizonyultak. Valamennyi eredményünk összhangban van legutóbb megjelent irodalmi adatokkal is, amelyek szerint a β -laktamáz enzim termelés kapcsolatban áll a sejtfa szintézissel és szerepet játszhat a morfológia kialakításában. Úgy tűnik, hogy a sejtfa prekursorok koncentrációjának az extra és intracelluláris térben való megemelkedése befolyásolja a *S. griseus* differenciálódási

folyamatát, feltételezhetően a sporulációs folyamat iniciálásának szignáljaként szolgálhat. A normál differenciálódási folyamat „visszaállítása” együtt jár a β -laktamáz enzim extracelluláris térbe történő szekréciójával. Valószínű, hogy a baktérium sejtek a peptidoglikán turnover-t, mint egy általános jelzőrendszert használják, hogy információt kapjanak a peptidoglikán aktuális állapotáról, s képesek legyenek megfelelően reagálni azokra a változásokra, amelyek a peptidoglikán mechanikai stabilitását veszélyeztetik. Ezt a feltételezést erősítik meg a 6-APA-val, és nem sejtfallkomponens aminosavakkal végzett kísérletek, ezek a vegyületek egyáltalán nem voltak hatással a differenciálódásra.

Érdekes eredményt hozott a sejtfall bioszintézist gátló, nem β -laktám szerkezetű egyéb antibiotikumok vizsgálata. Az agar-diffúziós módszerrel vizsgált antibiotikumok (vancomycin, bacitracin, cikloszerin, foszfonomycin) közül csak a vancomycin állította vissza kor-, és koncentráció-függő módon a légmicélium és spóráképzést. Ha megvizsgáljuk, hogy a vancomycin hol gátolja a sejtfall bioszintézisét, érdekes jelenségre figyelhetünk fel. A vancomycin ugyanis a még nem keresztköött peptidoglikán D-Ala-D-Ala végződéséhez kötődve megakadályozza az új sejtfall prekursorok beépülését. Ezért a vancomycin hatására is megemelkedik a sejtfall prekursor alegységek koncentrációja, ami szignálként szolgálhat a baktérium normál differenciálódásához. A β -laktamáz enzim feltehetően a szabályos differenciálódás eredményeként szabadul fel a membránból, és kerül az extracelluláris térbe.

A gramicidin D ionofór és a penicillin G hatása a peptidoglikán sejtfall turnover-re és a membránpotenciálra a *S. griseus* NRRL B-2682 törzsben

Kísérleteink második részében a β -laktám molekulák hatására létrejövő bakteriolízis folyamatát tanulmányoztuk a *S. griseus* törzsben. Az [³H]-N-acetilglükózaminnal jelölt sejteket gramicidin D ionofór vegyülettel illetve penicillin G-vel inkubálva a jelölt sejtfall fragmentek felszabadulásának növekedését tapasztaltuk. A sejtfall lízisének indukálásában a penicillin G bizonyult a hatékonyabb vegyületnek. A gramicidin D-vel kezelt minták közti különbség különösen jelentős a mérés első 5 órájában.

A *S. griseus* sejtek membránpotenciál változásainak mérésére a $\Delta\Psi$ szenzitív fluoreszcens festék molekulát, a DiOC₆(3)-ot használtuk fel. A gramicidin D azonnal és erősen depolarizálta a protoplasztok membránpotenciálját. Mivel a gramicidin D-vel történő kezelés jelentősen megnövelte a kezelt tenyészetben a sejtfallból felszabaduló peptidoglikán fragmensek

mennyiségét is, feltételezzük, hogy a $\Delta\Psi$ értékében bekövetkező csökkenésnek szerepe van a sejtfa lízisének előidőzésében.

A fluoreszcens módszert alkalmazva azt találtuk, hogy a penicillin G koncentráció-függő módon jelentősen lecsökkentette a korai-exponenciális fázisban levő micéliumból izolált *S. griseus* protoplasztok $\Delta\Psi$ értékét. A penicillin G $\Delta\Psi$ depolarizációt kiváltó hatása függ a protoplasztok életkorától is, a késői-exponenciális fázisban levő sejtekből izolált protoplasztok membránját még nagyon magas, $5 \times \text{MIC}$ -ban sem depolarizálta. Ennek nem lehet az a magyarázata, hogy elpusztultak a protoplasztok, ugyanis gramicidin D adásával jelentős depolarizációt tudunk kiváltani a penicillinnel kezelt idős protoplasztokon. Az idősebb protoplasztok penicillin G-vel szembeni rezisztenciája nem lehet annak sem a következménye, hogy ezen protoplasztok membránjában magasabb a β -laktamáz enzim aktivitása, hiszen amikor ezeket a 17 órás protoplasztokat előzetesen β -laktamáz gátlóval, klavulánsavval kezeltük, a penicillin G hatékonysága nem változott. Alátámasztja ezt a megállapításunkat az a tény is, hogy a penicillin G biológiailag inaktív bomlásterméke, a penicilloesav nem depolarizálta a *S. griseus* protoplasztjainak $\Delta\Psi$ értékét. A penicillin G membránpotenciálra kifejtett, életkortól függő *in vitro* hatása összhangban van tehát az *in vivo* mutatott, növekedési stádiumtól függő bakteriolitikus hatásával.

Egyéb β -laktám szerkezetű antibiotikumok, mint pl. a penicillin származék ampicillin és cefalosporinok $\Delta\Psi$ -re kifejtett hatásának azonos módszerrel történő vizsgálatával hasonló eredményeket kaptunk. Valamennyi tesztelt β -laktám antibiotikum depolarizálta a *S. griseus* protoplasztok membránpotenciálját, az általuk kiváltott fluoreszcens intenzitásnövekedés azonban sokkal kisebb mértékű, mint a penicillin G esetében.

Eredményeink alátámasztják munkahipotézisünket, miszerint a sejtmembrán elektrofiziológiai állapota fontos faktor a sejtfa autolízisének regulációjában. A β -laktám antibiotikumok depolarizálják a *S. griseus* sejteit, és a $\Delta\Psi$ értékében bekövetkező változás szignálként szolgálhat az autolízis előidőzésében. De önmagában a membrán depolarizációja nem elegendő a masszív autolízis indukálásához. A peptidoglikán sejtfa bioszintézisének a gátlása szintén fontos összetevője a β -laktám antibiotikumok lítikus hatásának. Feltehetően a kombinált hatás, azaz a $\Delta\Psi$ depolarizációja és a sejtfa bioszintézis gátlása együttesen teszi ezeket a vegyületeket ilyen hatásos antibiotikumká. Szeretnénk kihangsúlyozni, hogy a β -laktám molekulák depolarizáló hatása nem a murein sejtfa bioszintézis gátlásának a következménye, hanem egy direkt hatás, hiszen a protoplasztok nem rendelkeznek sejtfallal. A β -laktám

antibiotikumok által kiváltott depolarizáció molekuláris mechanizmusának részleteit azonban még nem ismerjük. Egy érdekes hipotézis lehet az, hogy a holinszerű fehérjéknek a penicillin által indukált depolarizáció révén történő aktiválódása, és a sejtfal bioszintézisének gátlása teszi lehetővé a baktériumok sejtfalának masszív lízisét.

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

ÖSSZEFOGLALÁS

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

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

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

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

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

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

Közlemények listája:

Az értekezéshez felhasznált publikációk:

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

Microbiology, **142**: 1937-1944

Impakt faktor: 2.897

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

Microbiology **144**: 2169-2177

Impakt faktor: 2.897

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

BBRC, **290**: 1169-1175

Impakt faktor: 2.935

Egyéb publikáció:

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

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

Impakt faktor: 0.828

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

Beküldve: *Microbiology*

Az értekezéshez felhasznált poszterek, előadások:

Deák, E., Penyige, A., Szabó, I., Barabás, Gy.

β -laktamáz enzim lehetséges szerepének vizsgálata a *Streptomyces griseus* 2682 törzs differenciálódásában. Magyar Biokémikusok 1. Országos Munkaértekezlete, Seregélyes, 1996.

Deák, E., Penyige, A., Szabó, I., Barabás, Gy.

Isolation of membrane-bound and extracellular form of β -lactamase from *S. griseus* 2682.

8th International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology Division.

18-23. 08. 1996. Jerusalem, Israel.

Deák, E., Penyige, A., Szabó, I., Barabás, Gy.

β -laktamáz enzim lehetséges fiziológiai szerepének vizsgálata a *S. griseus* 2682 törzs differenciálódásában,

Magyar Biokémikusok 2. Országos Munkaértekezlete,

Lilafüred, 1997. május 13-16.

Deák, E., Penyige, A., Szabó, I., Barabás, Gy.
Isolation of membrane-bound and extracellular form of β -lactamase from *S. griseus* 2682.
Xth International Symposium on Biology of Actinomycetes
May 27-30. 1997. Beijing, China.

Deák, E., Szabó, I., Kálmánczhelyi, A., Barabás, Gy. and A. Penyige.
Isolation of membran-bound and extracellular form of β -lactamase from *S. griseus* 2682, a possible role of the enzyme
3rd International conference of the Hungarian Biochemical Society
July 6-9. 1997. Pécs, Hungary.

Penyige, A., Matkó, J., **Deák, E.,** Bodnár, A., Barabás, Gy.
 β -lactam induced depolarisation of the membrane potential as a possible signal to trigger autolysis of *S. griseus*.
XIIth International Symposium on the Biology of Actinomycetes
August 5-9. 2001. Vancouver, Canada.

Előadások:

Deák, E. Membránhoz kötött és extracelluláris β -laktmáz enzim izolálása a *Streptomyces griseus* 2682 törzsből.
Doktoranduszok Első Konferenciája, Debrecen, 1995.

Deák, E. β -laktmáz enzim lehetséges szerepe a *Streptomyces griseus* 2682 törzs sporulációjában.
Doktoranduszok Első Országos Konferenciája, Debrecen, 1996.

Penyige, A., **Deák, E.,** Kálmánczhelyi, A., Barabás, Gy.
Signal transduction and differentiation in *S. griseus*.
Xth International Symposium on Biology of Actinomycetes
May 27-30. 1997. Beijing, China.

Penyige, A., **Deák, E.,** Kálmánczhelyi, A., Barabás, Gy.
Evidence of a role of ADP-ribosyltransferase in growth and differentiation of *S. griseus*.
3rd International conference of the Hungarian Biochemical Society
July 6-9. 1997. Pécs, Hungary

Penyige, A., **Deák, E.,** Kálmánczhelyi, A., Barabás, Gy. Eukariota szignál transzdukciós mechanizmusok *Streptomyces griseus*-ban.
A DEOEC és a DAB Tudományos ülése Prof. Szabó Gábor emlékére
Debrecen, 1997. December 11.

Deák, E., Penyige, A., Szabó, I., Kálmánczhelyi, A., Barabás, Gy.
 β -laktamáz enzim termelése a *Streptomyces griseus* törzsben. A DEOEC és a DAB Tudományos ülése Prof. Szabó Gábor emlékére
Debrecen, 1997. December 11.

Egyéb poszterek:

Deák, E., Vinnai, A., Kozma, J. és Szentirmai, A. Plazmidreplikáció szinkronizált tenyészetben. Magyar Mikrobiológusok Országos Nagygyűlése, Székesfehérvár, 1992.

Szabó, I., **Deák, E.**, Vargha, Gy. and W. Kurzatkovsky.
Isolation an extracellular DD-carboxypeptidase enzyme from *Streptomyces griseoflavus*.
7th International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology Division
July 3-8. 1994. Prague, Czech Republic.

Kálmánchelyi, A., Dobi, E., **Deák, E.**, Barabás, Gy., Penyige, A.
A kálcium szerepe a *Streptomyces griseus* morfológiai differenciálódásában.
Magyar Biokémikusok 2. Országos Munkaértekezlete,
Lilafüred, 1997. május 13-16.

Kálmánchelyi, A., Dobi, E., **Deák, E.**, Barabás, Gy. Penyige, A.
The role of Ca⁺⁺ in morphological differentiation of *Streptomyces griseus* NRRL B 2682.
3rd International conference of the Hungarian Biochemical Society
July 6-9. 1997. Pécs, Hungary.