

Ph.D. értekezés

A MreB, mint bakteriális aktin vizsgálata biofizikai módszerekkel

Szajkóné Longauer Beáta

2023

Témavezetők:

Prof. Dr. Nyitrai Miklós

Dr. Huberné Dr. Barkó Szilvia



Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Biofizikai Intézet

Interdiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola D93

Doktori iskola vezetője: Prof. Dr. Gallyas Ferenc

Program: Funkcionális fehérjedinamika vizsgálata biofizikai módszerekkel (B-130/1993)

Program vezetője: Prof. Dr. Nyitrai Miklós

Témavezetők: Prof. Dr. Nyitrai Miklós
Dr. Huberné Dr. Barkó Szilvia

*„Felfedezni valamit annyit tesz,
mint látni, amit mindenki lát,
és közben arra gondolni, amire még senki.”*

(Szent-Györgyi Albert)

Tartalom

Rövidítések jegyzéke.....	4
1. Irodalmi áttekintés	6
1.1 A bakteriális citoskeleton.....	6
1.2 A MreB fehérje	8
1.2.1 A MreB főbb feladatai a sejtekben.....	9
1.2.2 Sejtalak meghatározás, sejtfalszintézis	10
1.2.3 DNS szegregáció, sejtosztódás.....	11
1.3 Az aktin és MreB fehérjék szerkezeti és funkcionális hasonlóságai és különbségei	12
1.4 A MreB polimerizációja, ATP hidrolízis	13
1.5 Polimerizáció során bekövetkező szerkezeti átalakulások	15
1.6 A fehérjék hőstabilitása	18
1.7 Antibiotikumok hatásmechanizmusai.....	20
1.7.1 A vankomicin	22
1.7.2 Az A22 hatásmechanizmusa és analógjai	25
1.7.3 Az A22 biofilm gátló hatása.....	28
2. Célkitűzések.....	30
3. Anyagok és módszerek	32
3.1 <i>Thermotoga maritima</i> MreB fehérje natív preparálás	32
3.2 Funkcionalitás vizsgálatok	33
3.2.1 Polimerizáció követése fényszórás mérésekkel	33
3.2.2 Inorganikus foszfát mérés	33
3.2.3 Triptofán fluoreszcencia mérések	33
3.2.4 Hőmérsékletfüggő triptofán emisszió mérés.....	34
3.2.5 Kémiai denaturáció	34
3.2.6 Nukleotid kötés, leszorítás vizsgálata TNP-ATP-vel.....	34
3.2.7 Steady-state anizotrópia	35
3.3 Mikroszkópiai mérések.....	36
3.4 Baktériumpopuláción végzett mikrobiológiai tesztek	36
3.4.1 Szaporodási görbe és sejtparaméterek vizsgálata.....	36
3.4.2 Minimális gátlókoncentráció és szinergizmus meghatározása.....	37
4. Eredmények	38
4.1 <i>Thermotoga maritima</i> MreB preparálási protokoll kidolgozása	38
4.2 <i>Thermotoga maritima</i> MreB stabilitásának vizsgálata	39

4.2.1	Hőstabilitás vizsgálata.....	39
4.2.2	A <i>Thermotoga maritima</i> MreB kémiai denaturációja.....	40
4.2.3	Só és nukleotid hatása a triptofán emisszióra.....	41
4.3	Nukleotidok szerepe a MreB polimerizációjában	42
4.4	Az A22 és vankomicin hatásának leírása	45
5.	Eredmények megvitatása	54
6.	Következtetések	58
7.	Mellékletek	61
8.	Köszönetnyilvánítás	63
9.	Irodalomjegyzék	64
10.	Publikációs lista.....	73

Rövidítések jegyzéke

A22: S-(3,4-diklorobenzil) izotiourea, MreB gátlószer

Alp: actin-like protein

AlfA: actin-like segregation protein

ADP: adenzin-difoszfát

ATP: adenzin-trifoszfát

BODIPY: bór-dipirrometén

BtuA/B: bakteriális tubulin fehérje

FICI: frakcionális gátló koncentráció

FLV: fluoreszcens vankomicin

FtsZ/A: Filamenting temperature-sensitive mutant Z/A, filamentáló hőmérséklet érzékeny Z/A mutáns

GFP: zöld fluoreszcens fehérje

GTP: guanozin-trifoszfát

LPS: lipopoliszacharid

MamK: Magnetosome associated actin-like protein K, *Magnetospirillum magneticum* fajból származó bakteriális aktin fehérje

MESG: 2-amino-6-merkaptó-7-metilpurin ribonukleozid purin nukleozid foszforiláz

Mbl: MreB-like

MIC: minimális gátló koncentráció

MreB: Murein formation gene cluster E, type B, murein formáló E génklaszter B fehérjéje

NDB: nitro-benzoxadiazol

Ni-NTA: nickel-nitrilotriacetic acid

NV: natív vankomicin

P100: polimerizáló só, 4 mM TRIS, 100 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1mM EGTA

ParM: partitioning motor, szétválasztó motor)

PBP: Penicillin binding protein, penicillinkötő fehérje

PBS: Phosphate-buffered saline, foszfáttal pufferelt sóoldat

PG: peptidoglikán

PNP: purin nukleozid foszforiláz

QS: quorum sensing, kvórumérzékelés

RodA: Rod shape maintaining protein A

SEDS: shape, elongation, division and sporulation protein

TNP-ATP: 2',3'-O-(2,4,6-Trinitrofenil) -adenozin-5'-trifoszfát, tetra (triethylammónium) só

VAN: vankomicin

1. Irodalmi áttekintés

1.1 A bakteriális citoskeleton

A sejtek alakja jellegzetes és örökletes jellemző. Az eukarióta sejtek alakját a citoskeleton biztosítja, ami mikrofilamentumokból, mikrotubulusokból, és intermedier filamentumokból áll. Sokáig úgy tartották, hogy ezek csak az eukarióta élőlények meghatározó alkotóelemei. Azonban a mikroszkópos technikák és a biokémiai módszerek fejlődésével lehetővé vált a kisebb méretű élőlények, a baktériumok részletesebb vizsgálata is. Hasonlóan az eukarióta sejtekhez, a prokariótákban is megfigyeltek egy dinamikus, fonalas fehérjehálózatot, amelyben a felépítő fehérjék a citoskeletonális elemekkel homológok, és kulcsfontosságú szerepet játszanak számos sejtfunció szabályozásában [1, 2].

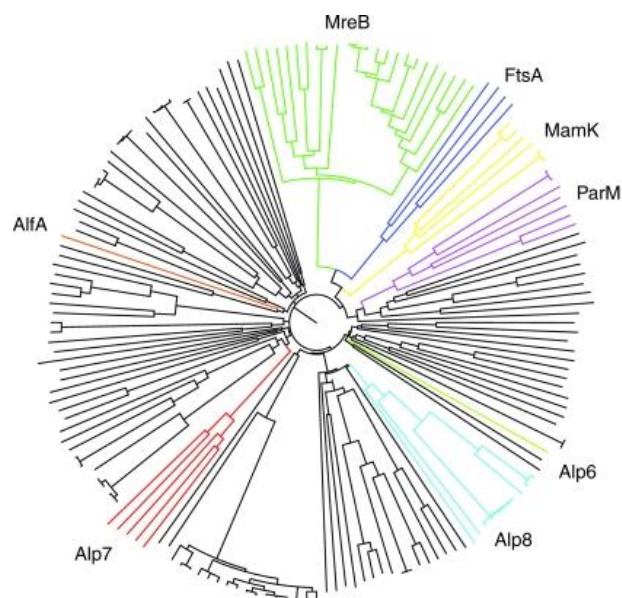
A bakteriális citoskeletonális elemek felfedezése az 1990-es évek elején kezdődött, a tubulin-szerű FtsZ (*Filamenting temperature-sensitive mutant*) fehérje azonosításával. Ez az erősen konzervált citoszolikus fehérje GTP-áz aktivitással rendelkezik [3], és a citokinézis során gyűrű formát (Z-gyűrű) vesz fel az osztódási oldalon, így fontos szerepe van a sejtosztódásban. Az elsődleges fehérjeszerkezete a tubulinnal csak kevés egyezőséget mutat (~17%), de háromdimenziós térszerkezete, és polimerizációs tulajdonságai nagyon is hasonlóak az eukarióta tubulinhoz. Két másik tubulin-szerű fehérjét is azonosítottak BtubA és BtubB néven, amelyek szintén baktériumokban vannak jelen [2].

Ezek után megindult az aktin-szerű fehérjék (1.ábra) kutatása is, de évekig nem értek el átütő eredményeket. 2001-ben tudták bizonyítani, hogy a *Bacillus subtilis* MreB (*Murein formation gene cluster E, type B*) és Mbl (*MreB-like*) fehérjéi a sejt-morfogenezis folyamatában fontos szerepet játszanak, és helikális struktúrákba rendeződnek a sejt teljes hosszában, az aktinhez hasonlóan [2]. Jones, Carballido-López és Errington [4] fénymikroszkópos vizsgálatokkal azonosította a helikális filamentumok jelenlétét *Bacillus subtilis*-ben (*B. subtilis*), míg van den Ent, Amos és Löwe [5] elektronmikroszkópos és röntgenkristallográfiai módszerekkel támasztotta alá, hogy a MreB az aktinhez hasonlóan filamentumokba épül. Azóta már azonosítottak két másik aktin-homológ fehérjét ParM (*Partitioning motor M*) és MamK (*Magnetosome associated actin-like protein K*), amelyek szintén a baktériumsejtek citoskeletonális struktúrájának építőkövei, illetve az Archaea-ák csoportjában is találtak egyet (Ta0583) [1, 2] (1. ábra).

A ParM (más néven StbA) fehérje, az aktinhez hasonlóan kettős helikális filamentumokat alkot, és ATP-függő polimerizációra és depolimerizációra képes, csakúgy, mint az aktin. A molekuláris szerkezete nagyon hasonló az aktinhez és a MreB-hez, és ugyanúgy megfigyelhető

a nukleotidkötés és -hidrolízis során a domének elmozdulása egymáshoz képest [2]. A *parM* a *parR*-el (plazmid DNS-kötő fehérje) és *parC*-vel (cisz-hatású, centromer-szerű DNS szekvencia) közösen alkotja a *par* komplexet, ami a DNS szegregációért felel a baktériumokban [6]. Az eukariótákhoz hasonló mitózis-szerű kromoszóma szegregáció történik, amiben vélhetően a MreB is részt vesz, de a ParM fonalak tolják, mintsem húzzák a bakteriális kromoszómákat.

A MamK a magnetotaktikus baktériumokban található. Ezek a baktériumok képesek érzékelni a tér mágneses viszonyait a magnetoszómájuk segítségével. A magnetoszóma egy intracelluláris membrán organelum, ami magnetit kristályokat tartalmaz. Ezek lineáris láncokat alkotnak, amivel a magnetotaktikus baktériumok érzékelni tudják a Föld mágneses mezőjét. Négy-öt magnetoszóma párhuzamosan helyezkedik el a sejtben, amiket legfeljebb hét MamK filamentum vesz körül, melyek az F-aktin filamentumokhoz hasonló struktúrát alkotnak [7].



1. ábra: A MreB szupercsalád tagjai [8].

A MreB szupercsaládhoz tartozik még az FtsA (*Filamenting temperature-sensitive mutant A*) és az AlfA (*actin-like segregation protein A*) fehérje, illetve az Alp (*actin-like proteins*) fehérjék, úgy, mint az Alp6/7/8. Ezenkívül sok más olyan fehérje, ami nem polimerizálódik filamentumokba, mint a cukorkinázok (pl: hexokináz), vagy chaperonok (pl.: Hsp70) [8]. Az AlfA DNS szegregációban játszik szerepet, az FtsA pedig az FtsZ-t rögzíti a membránhoz, amelyek a diviszóma alkotórészei a sejtsztódás során [1].

A citoszkeletális rendszer harmadik fő családjának, az intermedier filamentumoknak megfelelő bakteriális fehérje családot 2003-ban sikerült leírni. A *Caulobacter crescentus*

crescentin fehérjéről [9] bizonyosodott be, hogy filamentumokat alkot, amik az ívelt, és spirális sejtalakot határozzák meg és biokémiai és szerkezeti struktúrájukban az intermedier filamentumokkal mutatnak egyezést [1, 2].

1.2 A MreB fehérje

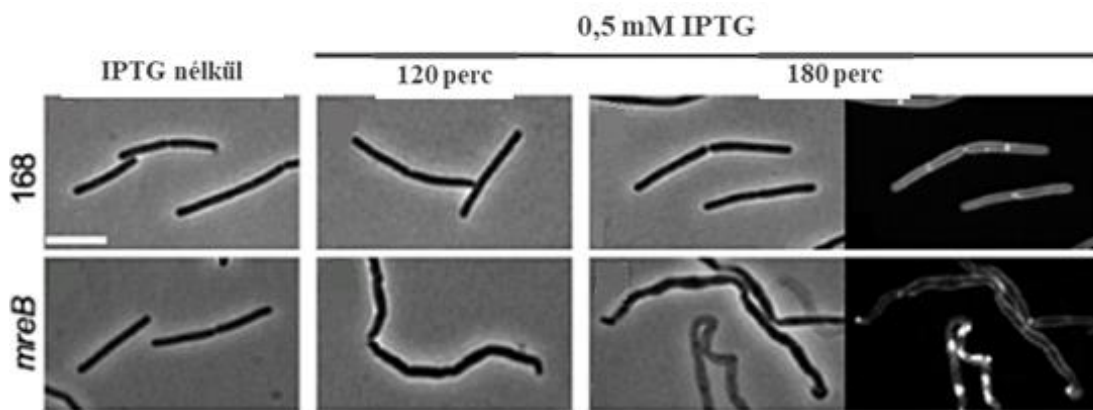
A prokarióta citoskeletális elemek közül a MreB felfedezése új utat nyitott a bakteriális aktin kutatás felé. Azt már biztosan tudjuk, hogy a prokarióta sejtek tartalmaznak aktin-szerű fehérjéket, és ez a dinamikus citoskeletális struktúra számos sejtfolymatban szerepet játszik [2].

A MreB egy prokarióta aktin fehérje, nevét a sejtfa fő komponenséről, a mureinről kapta. (*Mre*, azaz *Murein Region E*). Szinte minden nem coccoid baktériumban megtalálható. Jelen van mind a Gram-pozitív, mind a Gram-negatív baktériumokban, bár a *mreB* gén a Gram-pozitív organizmusoknál gyakrabban fordul elő [2]. Kromoszómán kódolt fehérje, amely a *mre* lókuszon helyezkedik el, ami tartalmazza a *mreC*-t és *mreD*-t is. Ebben az operon régióban található a sejtfaépítő PBP2 (*Penicillin binding protein 2*) és RodA (*Rod shape maintaining protein A*) is. Sok éven át úgy gondolták, hogy a penicillinkötő fehérjék (PBP-k) a sejtfa szintézishez szükséges kulcsenzimek. A RodA és a tágabb SEDS (*shape, elongation, division and sporulation*) család más fehérjéi mostanra az esszenciális glikoziltransferáz enzimek korábban ismeretlen osztályaként jelentek meg, amelyek kulcsfontosságú morfogenetikai szerepet játszanak a bakteriális sejtfa szintézisében [10]. Feltehetően együttesen, komplexet alkotva koordinálják a sejt hosszabbodását [4, 11].

Mivel a MreB, hasonlóan az aktinhoz a sejtek vázát adja meg, fontos tudni, hogy a baktériumsejten belül hol helyezkedik el és miként tölti be a szerepét a különböző sejtfunciókban. A MreB elhelyezkedését elsőként *Bacillus subtilis*ben karakterizálták [4]. Dekonvolúciós mikroszkópiás és immunfluoreszcens mikroszkópiai vizsgálatok azt mutatták, hogy a fehérje helikális filamentum-kötegeket képez a sejtmembrán alatt, *Caulobacter crescentus*ban, és *Escherichia coli*-ban is. Ezenkívül gyűrű formát is felvehet az osztódási oldalon [11].

Az utóbbi években a fluoreszcens jelölési technikák és a mikroszkópok fejlődése lehetővé tette az időbeli és térbeli felbontás rohamos javulását, így a baktériumok részletesebb vizsgálatát. Kiderült, hogy a sejtekben a MreB mozgékony foltokba és/vagy filamentumokba szerveződik a citoplazma membrán közelében [12, 13]. A nagyobb felbontás érdekében

Swulius és Jensen az elektron-kriotomográfia módszerével különböző pálcika alakú baktériumokat kezdett vizsgálni. Míg a fluoreszcens vizsgálatok egyértelműen helikális MreB szerkezetet mutattak, ezzel az eljárással nyomát sem találták hélixeleknek. Cikkükben három olyan írásra is utalnak, melyekben TIRF (*Total Internal Reflection Fluorescence*) és konfokális mikroszkópos módszerek segítségével kiderítették, hogy a MreB inkább kisebb foltokba, vagy pontokba rendeződik és a pálcika alakú baktériumsejt kerülete mentén dinamikusan mozog körbe[14]. Chastanet és Carbadillo-López [15] *Bacillus subtilis* GFP-MreB expresszált sejteken végzett kutatásaik alapján úgy gondolják, hogy a sejteken belül előfordulnak helikális MreB filamentumok és dinamikus foltok is. A kétféle megfigyelés közti különbség oka lehet, hogy a MreB fehérje hosszú, megnyúlt filamentumokat és sejteket (2. ábra), vélhetően csak túlexpresszált állapotban és a késői növekedési fázisban hoz létre [16–18].



2. ábra: Vad típusú (168) és *mreB* transzformált *Bacillus subtilis* sejtek IPTG jelenlétében [18].

Létezik tehát több fajta megfigyelés és elmélet a MreB elhelyezkedésének leírására, de ezek sokszor ellentmondásosak, és a kérdés máig vitatott.

1.2.1 A MreB főbb feladatai a sejtekben

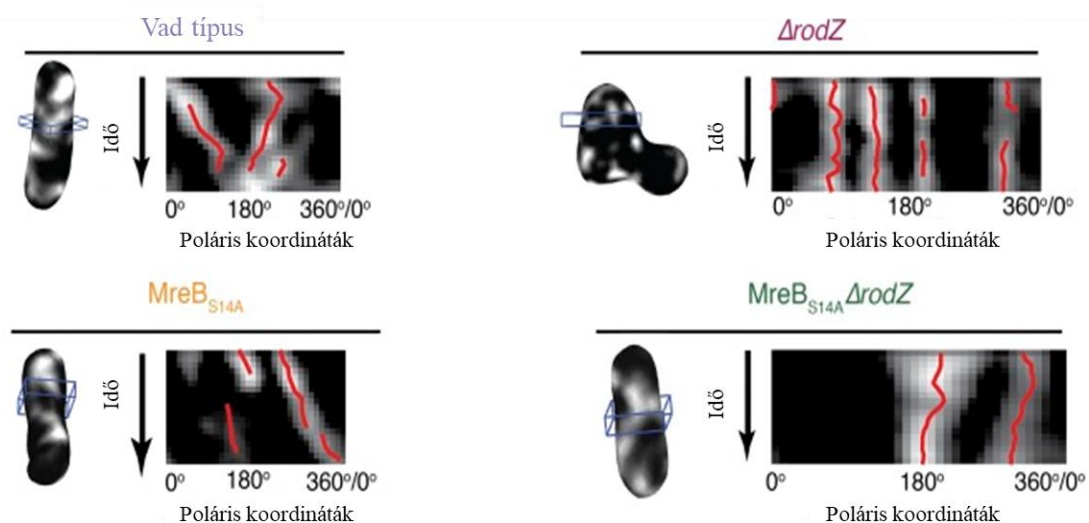
Az eukarióta aktin ortológ MreB filamentumok közvetlenül szabályozzák a sejthalakot, szerepet játszanak a morfogenezisben [19, 20], sejtosztódásban, sejtfalszintézisben, sejt polaritás kialakításában, sejtorganellumok elhelyezkedésében, ezen kívül a kromoszómaszegregációban, replikációban és a dekaténációban (katenáció = láncképződés) [8, 15]. A MreB, Gram-negatív baktériumokban a sejtfal-szintetizáló egység közelében lokalizálódik és az élesztő aktinhoz hasonló módon szabályozza a sejtfal működését. A MreC

és MreD mintegy hídként játszik szerepet a MreB és a sejtfa-szintetizáló egység között [4, 11, 15].

1.2.2 Sejtalak meghatározás, sejtfa-szintézis

A mureinréteg egy peptidoglikán (PG) makromolekula, ami a baktériumsejtet borítja. Ebben a hosszú cukormolekulák peptidhidakkal kereszteződnek és háromdimenziós hálószerű képződményt alkotnak, ami a sejt alakját megtartja, fizikai egységet és mechanikai szilárdságot biztosít a baktérium számára. Gram-pozitív baktériumokban a sejten kívül helyezkedik el, Gram-negatívoknál a periplazmában (citoplazmamembrán és külső membrán közti terület, lásd később). A PG szintézis PG prekursor képződésével kezdődik a citoszólban, ami N-acetilglükózamin és N-acetilmuraminsav diszacharid. Ez a prekursor a membránon átfordul, feltételezhetően a RodA fehérje segítségével, és beépül a sejten kívüli már létező PG-hálózatba transzglykoziláz és/vagy transzpeptidáz aktivitású PBP-k segítségével [21, 22].

Mivel a MreB a citoplazmában helyezkedik el, a sejtfa pedig a periplazmában, kötő fehérjék szükségesek, hogy a MreB aktivitás a belső sejtmembránon keresztül hatékony legyen. Egy ilyen fontos faktor a RodZ. *Escherichia coli* (*E. coli*) sejtekben a RodZ citoplazmatikus doménje a MreB-hez köt [23], miközben a periplazmatikus doménje számos sejtfa-szintetizáló enzimmel kapcsolódik [24]. A RodZ tehát a MreC-vel és MreD-vel hidat biztosít a MreB és a sejtfa-szintetizáló egység között [15, 23]. A *rodZ* deléciója gömbölyű sejteket eredményez, és ebben az esetben a MreB nem forog tovább a periféria mentén, hanem diffúziós mozgást végez [24] (3. ábra).



3. ábra: A MreB diffúziós mozgása *rodZ* gén deléciója után. A poláris koordináta az MreB jel helyzetét jelzi, a hosszanti tengelyre merőlegesen [24].

A baktériumsejtek alakbeli változatossága a peptidoglikán tér-időbeli szerveződésének különbözőségeiből adódik a sejtfal bioszintézis során [25]. A PG lokalizációjában szerepet játszó peptidoglikán szintázok és citoskeletális fehérjék összehangolt aktivitása határozza meg a baktériumok morfológiai jellemzőit [26]. A MreB polimerek lokalizációja és mozgása összefügg a PG-lerakódással, következésképpen az MreB-t sejtfeljődés szabályozóként és a sejtalkak meghatározó tényezőjeként írták le számos fajban [13, 27, 28].

1.2.3 DNS szegregáció, sejtosztódás

A pontos kromoszóma szegregáció létfontosságú a sejtosztódásban. Eukariótákban ezt a feladatot citoskeletális fehérjék segítik [29]. Baktériumokban azonban ez a folyamat másképpen zajlik. Például *E. coli*-ban és *B. subtilis*-ben a replikáció kiindulási helye a sejt feléhez illetve negyedéhez lokalizálódik a sejtciklus különböző fázisaiban [30, 31]. A DNS replikáció és szegregáció egy időben történik, ami arra utal, hogy ezek kapcsolt folyamatok és a DNS replikáció egy hajtóerőt jelenthet a kromoszóma szegregációhoz. Eukariótákban egy mikrotubulus alapú citoskeletális rendszer látja el a kromoszómák szétesztését. A baktériumokban is van hasonló, a tubulin-homológ FtsZ. Ennek DNS szegregációban játszott szerepe azonban valószínűtlen, mivel az *ftsZ* mutánsok nem mutatnak kromoszóma szegregációs hibákat, és az FtsZ sejt közepére történő szubcelluláris lokalizációja nincs összhangban a kromoszóma szegregációban betöltött szerepével [32, 33].

Egy másik lehetséges résztvevő éppen az aktin homológ MreB fehérje [4, 5]. Erre utal egyrészt az, hogy a replikáció kiindulási helyei abnormális számban és pozícióban helyezkednek el a *mreB* mutánsban [34–36]. Másfelől logikusnak tűnik, hogy a spirálisan elhelyezkedő MreB, ami a sejt hosszában végighalad, potenciálisan mozgathatja a kromoszómákat a sejt egyik végéről a másikba [4, 34, 37, 38]. Elképzeléseink szerint leginkább a sejtalkak meghatározásában és fenntartásában lehet szerepe [39]

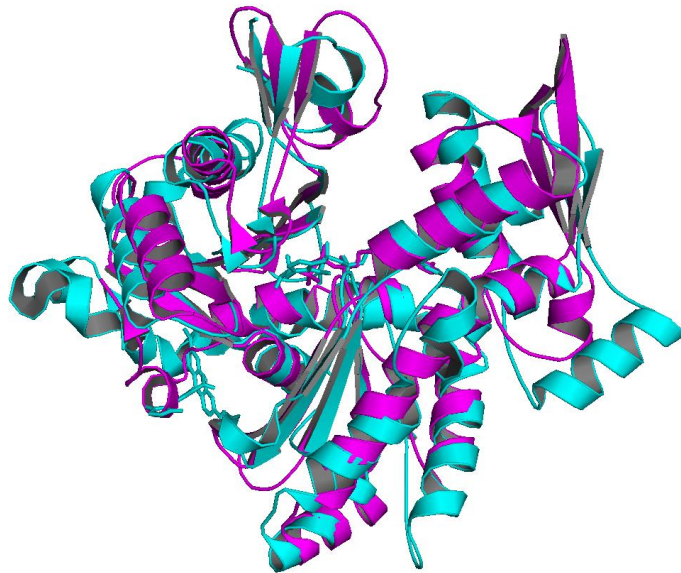
Az A22 (specifikus MreB-gátlószer, részletesen lásd később) képes blokkolni a DNS szegregációt anélkül, hogy a DNS replikációt befolyásolná, ami szintén arra utal, hogy a két folyamat független egymástól. Az eddig tisztázatlan, hogy a MreB szerepet játszik-e a kromoszóma szegregációban, vagy más funkciójának a következménye, hogy hatással van a kromoszóma dinamikára [29].

Az, hogy a baktériumok a sejtosztódás során hogyan irányítják a sejt növekedését, még kevésbé ismert folyamat. A sejt megnyúlását a MreB szabályozza, míg a sejtosztódásért az FtsZ

is felelős. A sejtek közepén kialakuló gyűrű-struktúra (Z-gyűrű) FtsZ-t tartalmaz, ami a sejtosztódás helyére vonzza a többi részt vevő fehérjét is, amik így közösen alkotják a válaszfal képződéshez és a sejtek elválásához szükséges létfontosságú fehérje csoportosulást, a diviszómát. A MreB és FtsZ között direkt kapcsolat jön létre *Escherichia coli*-ban, ami valószínűleg szükséges a Z-gyűrű összehúzódsához.

1.3 Az aktin és MreB fehérjék szerkezeti és funkcionális hasonlóságai és különbözőségei

A bakteriális aktin homológ fehérjék közül szekvenciájában a MreB áll legközelebb az aktinhoz. Az aktinhoz hasonlóan 4 alegységből épül fel (IA, IB, IIA, IIB), köztük egy nukleotid-kötő zsebbel (4. ábra). A MreB-nek több kölcsönható partnere ismert, a sejten belüli feladatait ezekkel együtt látja el [8].



4. ábra: Az aktin és MreB szerkezeti hasonlóságai
Kékkel az aktin monomer, lilával a *Thermotoga maritima* MreB monomer szerkezete (PDB:1NWK-aktin,1JCG-*T. maritima* MreB)

2001-ben van den Ent, Amos és Löwe [5] bizonyította, hogy a MreB *in vitro* polimerizálódik, és az aktin-szerű filamentumok helikális struktúrába rendeződnek *in vivo*. Ezekben a kísérletekben *Thermotoga maritima*-ból (*T. maritima*) tisztított MreB1-et használtak, ami változatos körülmények között képes polimerizálódni és a folyamat ATP vagy GTP igényes, míg aktin esetén csak ATP-vel történik a polimerizáció. A MreB többnyire

egyenes protofilamentumokat képez, általában merev filamentumokba szerveződik, néha feszes gyűrűszerű spirálba, a polimerizáció körülményeitől függően [4, 8].

Bacillus subtilis-ben mindhárom MreB homológ ugyanazokat az alapvető aktin szupercsalád jellemzőket tartalmazza, és mind képes a polimerizációra. [8].

1.4 A MreB polimerizációja, ATP hidrolízis

Fényszóráson alapuló polimerizációs kísérletek bizonyították, hogy a MreB fehérjék képesek ATP, AMP-PNP, GTP, vagy ADP jelenlétében polimerizálni [40–43]. *Bacillus subtilis* esetén megfigyeltek nukleotid-független polimerizációt is [42]. Sőt, *Caulobacter crescentus* MreB esetén is bizonyították, hogy nukleotid nélkül is történt kettős protofilamentum összeépülés [44].

Ha az aktin polimerizációjának jellemzésére használt paraméterekkel és puffer körülményekkel kívánjuk leírni a MreB polimerizációs kinetikáját, akkor az irodalmat csoportosíthatjuk az alkalmazott pufferkörülmények szerint. Vannak olyan kutatócsoportok, akik a kísérleteket sómentes pufferben végezték [40, 42, 43], mások pedig magas sótartalmú pufferben renaturált fehérjén dolgoztak és nukleotid hozzáadásával kezdeményezték a polimerizációt [5, 41, 45, 46]. Van den Ent és munkatársai [5] 200 mM NaCl tartalmú pufferben vizsgálták a fehérjét, és megfigyelésük szerint a *Thermotoga maritima* MreB (*Tm*-MreB) polimerizációja csak ATP vagy GTP hatására történt. Esue és mtsai. [45] alacsony sókoncentrációt (100 mM NaCl) alkalmaztak, és a polimerizációt az aktinhoz hasonlóan polimerizáló só (100 mM Tris-HCl, pH 7,0, 100 mM NaCl) és ATP hozzáadásával indukálták. Tapasztalataik szerint a MreB filamentumokba épül össze, amit az ATP hidrolízise, és erről történő foszfát lehasadása követ. A kalcium és magnézium már 1 - 4 mM koncentrációban lassította a fényezés növekedés sebességét, amiből arra következtettek, hogy a MreB polimerizációja lassul ezen ionok jelenlétében. A hőmérséklet növekedésével (37-50-65 °C-on) pedig a fényezés mértéke szignifikánsan nőtt, amit ők a polimerizáció gyorsulásával értelmeztek. Bean és Amann [40] szintén sómentes körülmények közt tartotta a fehérjét, ATP jelenlétében. Ők úgy találták, hogy a *Tm*-MreB polimerizációjában nincs szükség kétértékű kation jelenlétére, de a magas koncentrációjú egyértékű sók gátolták a polimerizációt. A hőmérséklet és/vagy koncentráció növelésével a monomerek összeépülése is gyorsabb, azonban Esue és csoportja kutatásaira hivatkozva ők úgy gondolták, hogy a fényezés növekedését nem a polimerizáció sebességének növekedése idézte elő, hanem a fehérje

denaturációja következett be magas hőmérsékleten. Popp és munkatársai [46] kutatásai szerint a MreB polimerizációjához ATP-re vagy GTP-re és sóra van szükség, viszont a magas sókoncentráció gátolja a polimerizációt. Mayer és Amann [42] *Bacillus subtilis*-en végzett kutatásaikban is azt találták, hogy az ATP gyorsítja a polimerizációt, és a magnézium is elősegíti azt. Viszont a KCl lassítja, ahogy Popp vizsgálataiban is igazolódott ez az elmélet. Ezen kívül megállapították, hogy a polimerizáció folyamata független a nukleotid típusától, illetve a baktériumfajtól (*T. maritima*, vagy *B. subtilis*). A fényszóráson alapuló polimerizáció mérésekben megállapították, hogy a *B. subtilis* MreB filamentumok kb. 50-szer nagyobb fényszórás intenzitást mutatnak, mint az aktin. Ez pedig magasabb rendű struktúrák kialakulásának okán lehetséges. Nurse és Mariani [41] szintén megerősítette, hogy a KCl gátolja a polimerizációt *E. coli* MreB esetében. Magas sókoncentráció alkalmazása esetén a polimerizáció lassult. Viszont a MreB monomerek összeépüléséhez szükség van ATP jelenlétére, mert ATP nélkül hosszabb lett a lag (nukleáció) fázisa a polimerizációnak. Gaballah és kutatócsoportja [43] szintén azt találta, hogy a KCl lassítja a polimerizációt, míg az alacsony pH és a magnézium jelenléte elősegíti a folyamatot. Kísérleteikben bizonyították, hogy a *Chlamydomonas reinhardtii* MreB-nek (*Cp*-MreB) nincs szüksége ATP-re a polimerizációjához, de képes hidrolizálni az ATP-t.

Az aktinhoz hasonlóan a MreB is egy ATP-áz lehet, a legtöbb esetben ugyanis ATP-re van szüksége a polimerizációhoz, a polimerizáció pedig elősegítheti a nukleotidok hidrolízisét [47]. A monomerek megkötik az ATP-t, ami ADP-re és P_i -re (inorganikus foszfát) hidrolizál a polimerizációja során, majd lehasad az inorganikus foszfát. Végül az ADP ATP-re cserélődik és a folyamat kezdődik előlről. Azonban, hogy ez a folyamat a MreB esetén milyen módon megy végbe, még nem tisztázott. Ami bizonyos, hogy ezt az ATPáz aktivitást és foszfát leválást több baktériumfajból származó MreB fehérje esetén is bizonyították. Bean és Amann [40] kutatásaikban úgy találták, hogy a polimerizált MreB a sejtekben ADP-kötött állapotban van jelen, ami kevésbé támogatja a további összeépülést. A foszfát felszabadulás pedig a MreB-vel arányosan érte el maximumát, ami arra utal, hogy minden protomer (filamentumba beépült monomer) egy ATP-t képes hidrolizálni. Később Mayer és Amann [42] ezt a megfigyelést kiegészítette azzal, hogy az inorganikus foszfát leválás monomer állapotban nem történik meg, csak polimerizáció után. Popp és munkatársai [46] is megerősítették, hogy a polimerizációt követi a foszfát disszociáció, és azt is megállapították, hogy a *Tm*-MreB monomer állapotban is hidrolizálja az ATP-t. Gaballah kutatócsoportjával [43] szintén erre a megállapításra jutott, miszerint nem polimerizáló körülmények között a *Cp*-MreB képes volt hidrolizálni az ATP-t. Azonban polimerizáló körülmények esetén az ATP-áz aktivitás megszakadt a lezajlott

polimerizáció után. Ebben az esetben a mért inorganikus foszfát mennyisége csak harmada volt a kiindulási MreB monomer mennyiségnek, ami arra utal, hogy az ATP-áz aktivitás inkább a monomer állapotú MreB-hez kötött folyamat. Az A22-vel végzett kísérleteik azt mutatták, hogy az A22 sem a polimerizációt, sem a hidrolízist nem tudta blokkolni, amiből arra következtek, hogy az A22 nem képes a *Cp*-MreB nukleotid-kötő zsebéhez kötni.

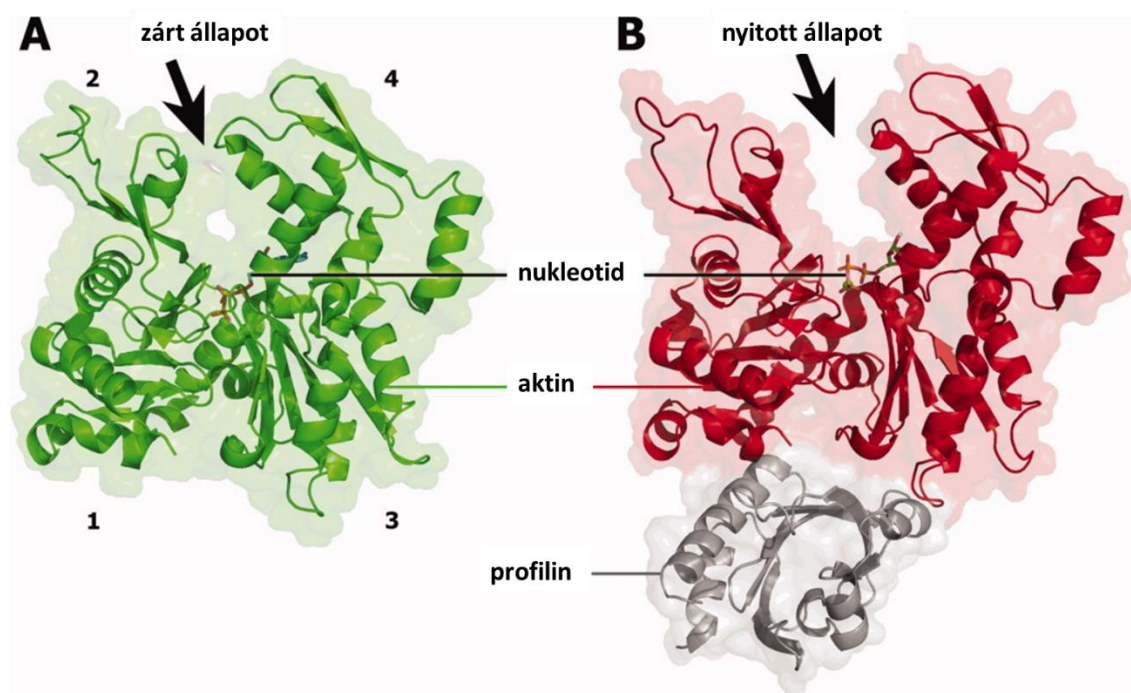
Ezen felül a nukleotid kötés a MreB polimerizációja során befolyásolja a kritikus koncentrációt (azon egyensúlyi monomerkoncentráció, amely fölött a monomer/filamentum arány csökken). Ahogy aktin esetén is megfigyelték, a MreB ADP-vel történő polimerizációjánál a kritikus koncentráció mintegy háromszorosa az ATP-vel történő polimerizációhoz képest. Ugyanígy a hőmérséklet is növeli a kritikus koncentrációt, és magasabb hőmérsékleten a MreB polimerizációja gyorsabb lesz [40]. A MreB fehérjékben megfigyeltek egy konzervált aminosav motívumot is, ami arra utalhat, hogy az ATP kötés folyamata a MreB család fehérjeiben egységesen meghatározott lehet[48].

Azonban nem csak a nukleotidok, az ionkörülmények is hatással vannak a MreB polimerizációjára. Az intracelluláris ionszintek meghatározhatják azt az optimális ionösszetételt, ami mellett a MreB spontán összeépülése vagy a rövid polimerek, oligomerek helyspecifikus összeszerelése szabályozottá válik [39, 49–51]. A *Tm*-MreB polimerizációja ATP hozzáadásával kezdeményezhető. A polimerizáció sebessége a $MgCl_2$ koncentráció emelésével nő [45], míg a $CaCl_2$ nincs jelentős hatással a folyamatra. A kalcium beáramlása azonban fontos szerepet játszik az *E. coli* sejtek sejtciklusában és kemotaxisában [52] és meghatározhatja azok alakját [39]. Hogy melyik ionok fontosak a MreB polimerek stabilitásához, és hogyan szabályozzák a MreB összeépülést, szétszerelést, az további vizsgálatokat igényel.

1.5 Polimerizáció során bekövetkező szerkezeti átalakulások

Az eukarióta aktin esetén leírták, hogy a polimerizáció során megkülönböztetünk egy zárt (polimerben lévő monomer esetén) és egy nyitott (monomerre jellemző) konformációt [53] (5. ábra). Nukleotid-trifoszfát kötött állapotban (ATP/GTP) a nukleotidot körülvevő hurkokban konzervált szerin, treonin és glicin hidrogénkötéseket képeznek a γ -foszfáttal, amely zárva tartja a nukleotid zsebet. Nukleotid-difoszfát kötött állapotban (ADP vagy GDP) ez a híd megszűnik, és megnyílik a nukleotidkötő zseb [54]. Az aktin polimerizációja során hajlott,

zártabb, ellapult konformációt vesz fel. A főbb konformációs változások akkor mennek végbe, amikor az ATP-aktin beépül egy filamentumba, nem pedig az ATP hidrolízisével vagy foszfát felszabadulásával. Azonban a finomabb konformációs változások az 1-es aldoménben és a D- hurokban a foszfátfelszabadulás után hatással vannak az alegység disszociációjára. Mind a filamentumban, mind a monomerben a P_i felszabadulásakor fellépő finom változások a nukleotidkötő helyre és a szomszédos peptidláncokra korlátozódnak, és ezek a változások a jelek szerint befolyásolják a 2-es aldomén stabilitását, de nem befolyásolják a szerkezetét [53]. Az ATP hidrolízise, és az inorganikus foszfát leválása a nukleotid kötő zseb és így az aktin molekula záródását eredményezi [55].



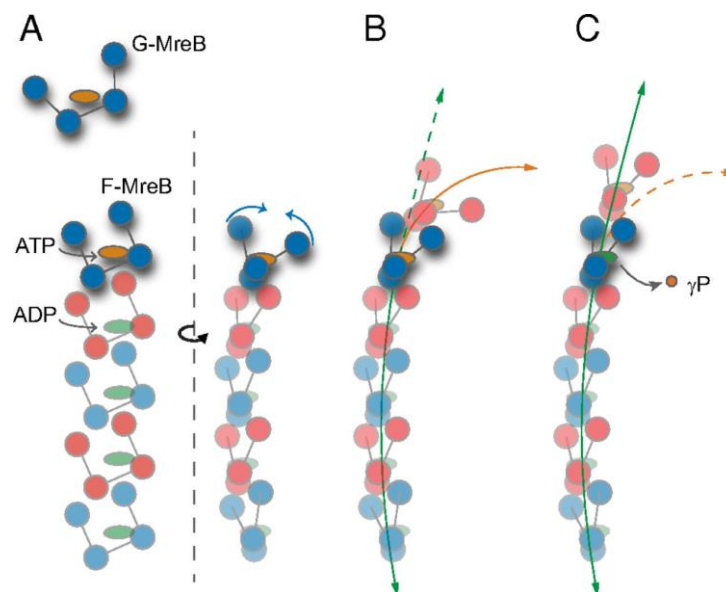
5. ábra: Aktin monomer zárt (A) és nyitott (B) állapotban [56].

Kutatócsoportunk korábban sikeresen jelölte *Leptospira interrogans* MreB (*Li*-MreB) két ciszteinjét Alexa-488-maleimiddel. Ezek az aminosavak a nukleotidkötő zseb közvetlen közelében helyezkednek el, és ezért a fluoreszcens jel érzékenyen reagál a MreB polimerizációja során történő konformációs változásra. A polimerizáció során a MreB filamentumok zártabbá válnak, így az első lépésben a fluoreszcencia intenzitás csökkenés fényszórási kísérletekkel nem is követhető. A második lépés lassabb, a monomerek konformációs átmenete után a MreB filamentumok, illetve szimultán a filamentumok asszociációjával a szuperstruktúrák kialakulása zajlik. A molekula dinamikai szimulációk alátámasztják azt a hipotézist, miszerint a *Thermotoga maritima* MreB konformációs változásai

hasonlóak [47]. Ezen értelmezés alapján feltételezhető, hogy a fluoreszcens jel gyors változását a protomer konformációs változása okozza, amely megváltoztatja a fluorofórok környezetét. További fluoreszcencia intenzitás csökkenés figyelhető meg a polimerizáció második, lassabb folyamata során, illetve ellenkező folyamat figyelhető meg az MreB depolimerizációja során. Tehát a fluoreszcencia jel érzékeny és szelektív jelző a MreB protomer konformációjára és nagymértékben függ a sókoncentrációtól [57].

A MreB ezen felül többretegű „lemezeket” (olyan szerkezet jelent, amelynek szélessége lényegesen nagyobb, mint a magassága) is ki tud alakítani. Ezek morfológiája nukleotid-, ionkoncentráció-, pH- és hőmérsékletfüggő [46]. A baktériumok tipikus fiziológiai sókoncentrációja esetén (180-350 mM körül) [39] és pH 7,0-7,7 között a lemezek 30-100 nm szélesek, és több mikrométer hosszúak voltak. Ezzel szemben a nukleotid hiányában nem keletkeztek ilyen polimer struktúrák. A nem hidrolizálható nukleotid formák, mint AMP-PNP és GMP-PNP amorf szuperszerkezeteket hoznak létre. A kalcium koncentrációjának csökkentésével, vagy a pH növelésével szélesebb lemezek keletkeztek. A pH csökkentésével pedig keskenyebb lemezeket figyeltek meg. Ez azt igazolhatja, hogy a lemezek méretét a MreB tényleges elektrosztatikus felületi töltöttsége befolyásolja.

A polimerizáció során kialakuló filamentumok szerkezeti változásainak vizsgálatához Colavin és kutatócsoportja [47] szimulációval igazolták, hogy a MreB aktinszerű, polimerizációtól függő szerkezeti változásokat mutat, ahol a polimerizáció során a MreB alegységek ellaposodnak, ami úgy alakítja át a nukleotid kötő zsebet, hogy elősegítse a hidrolízist. A MreB filamentumok alegységei között nukleotid-függő „elhajlást” tapasztaltak, a hidrolizált polimerek pedig merevebb konformációt eredményeztek (6. ábra). Colavin és munkatársai a MreB-vel irányított szimulációt alkalmaztak az alegységek közötti görbület és az egyes alegységek ellaposodási foka közötti kapcsolat bemutatására, ami arra mutat, hogy a MreB filamentum mentén kooperatív hajlás történik. Elektronmikroszkópiai vizsgálatokban a MreB struktúrák vegyes populációit figyelték meg. Szimulációik azt sugallják, hogy ez a vegyes szerkezeti populáció, tehát az egyenes, ADP-kötött, és görbült, ATP-kötött filamentumok, a két különböző nukleotid állapotot reprezentálják. Nem hidrolizálható ATP analógot használva (AMP-PNP) a MreB filamentumok kizárólag hajlottak, vagy feltekeredettek, nem mutatnak egyenes struktúrát. Tehát végső soron a hidrolízis vezethet a filamentumok kiegyenesedéséhez [47].



6. ábra: A MreB összeépülés modellje. (A) A G-MreB alegységeknek Mg^{2+} -ra és ATP-re van szükségük ahhoz, hogy az F-MreB protofilamentumok kialakuljanak. A polimerizáció elősegíti a monomer ellaposodását (kék nyilak) és a nukleotidkötő zseb átszerveződését. (B és C) ATP-kötött (B) és ADP-kötött (C) A MreB filamentumok többé-kevésbé ívelt konformációt vesznek fel (narancssárga és zöld nyilak) [47].

Eredményeik arra utalnak, hogy a MreB hidrolízis állapotát is figyelembe kell venni; tehát ha egy ívelt, ATP-hez kötött MreB filamentum a viszonylag lapos membránhoz köt, kiegyenesedhet a filamentum, ami pedig elősegítheti a hidrolízist, vagy elősegítheti a MreB preferenciális kötődését specifikus membrángörbületű régiókhoz [58]. A nukleotid állapot szintén befolyásolhatja az MreB affinitását más fehérjékhez, amint azt az aktin és az aktin-kötő fehérjék között megfigyelték [59]. Végző soron a baktériumsejt alakját a sejtburrok (sejtfal+sejtmembrán), a sejtfalszintetizáló egység és a MreB közötti komplex kölcsönhatások határozzák meg [47].

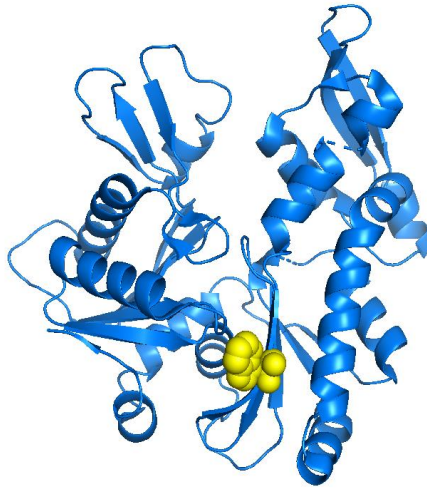
1.6 A fehérjék hőstabilitása

A fehérjék nagy része egy meghatározott háromdimenziós szerkezetet vesz fel. A fehérje hőstabilitásának vizsgálatán keresztül megtudhatjuk, hogy mennyire stabil a kialakult szerkezet, és hogy a különböző környezeti hatások hogyan befolyásolják azt. A termofil, azaz hőtűrő fajok esetén több oka is lehet a nagyobb hőmérsékleti stabilitásnak fehérje szinten, mint például a nagyobb hidrofobicitás, a hurokszerű szerkezeti elemek („loop”-ok) rövidülése, az oligomerizáció (a monomerek nem épülnek hosszú filamentumokba, a polimerizáció folyamata megreked egy alacsonyabb szinten) során elfedett szabad felületek, aminosav kicserélődés a

másodlagos szerkezetben, a prolin származékok nagyobb előfordulása, hőérzékeny aminosavak csökkent előfordulása, erősebb hidrogén-kötés, sóhidak jelenléte [60]. Érdekes megfigyelés, hogy az egymásnak megfeleltethető termofil és mezofil (közepesen hőtűrő, 20-45 °C az optimális) fehérjék hasonló hidrofobicitással és oligomer szerkezettel rendelkeznek, illetve a főlánc-főlánc, vagy főlánc-oldallánc közti hidrogénkötések is hasonlóak. Viszont a hőtűrő fehérjék több sóhíddal rendelkeznek. A sóhidak stabilizálják a fehérje szerkezetét, ezáltal az képes lesz ellenállni a külső behatásoknak, olvadásnak, vagy kitekeredésnek magasabb hőmérsékleten. A Kumar és munkatársai [60] által vizsgált szerkezeti paraméterek közül csak a sóhidak növekednek következetesen a termofil fehérjékben. Más szerkezeti tényezők, például az oligomer állapot, a hidrofób magok és a hidrogénkötések szintén hozzájárulhatnak a fehérje termostabilitásához, közreműködésük mértéke azonban nem egyértelmű. A közeli sóhidak együttműködve és kölcsönösen erősítik egymást, és növelik a stabilitást. A sóhidak összetarthatják és merevíthetik a fehérjestruktúrákat [60].

A termális denaturáció hatására a fehérje szerkezete változásokon megy keresztül. Általában a belső fluorofórok a fehérjében jobban kitetté válnak a környezeti hatásoknak, ami jellemzően a triptofán fluoreszcencia kvantumhatásfokában (a kibocsátott és elnyelt fotonok aránya) történő változást jelenti, illetve a fluoreszcencia spektrum eltolódását a hosszabb hullámhosszak irányába. Éppen ezért a hődenaturáció folyamata jól követhető a triptofán fluoreszcencia spektrumának mérésével. A fluoreszcencia intenzitás csökkenése, vagy spektrum vörös eltolódása egyértelműen a megnövekedett hő hatására bekövetkező szerkezeti változásra utal [61].

Az általunk vizsgált *Thermotoga maritima* MreB egyetlen triptofán aminosavat tartalmaz (7. ábra), mely a molekula központi, két szubdomén közötti részén helyezkedik el. Ennek megfelelően, a triptofán specifikus gerjesztésével a hő hatására bekövetkező spektrális változások során a molekulának erről a részéről nyerhetünk elsősorban információkat.

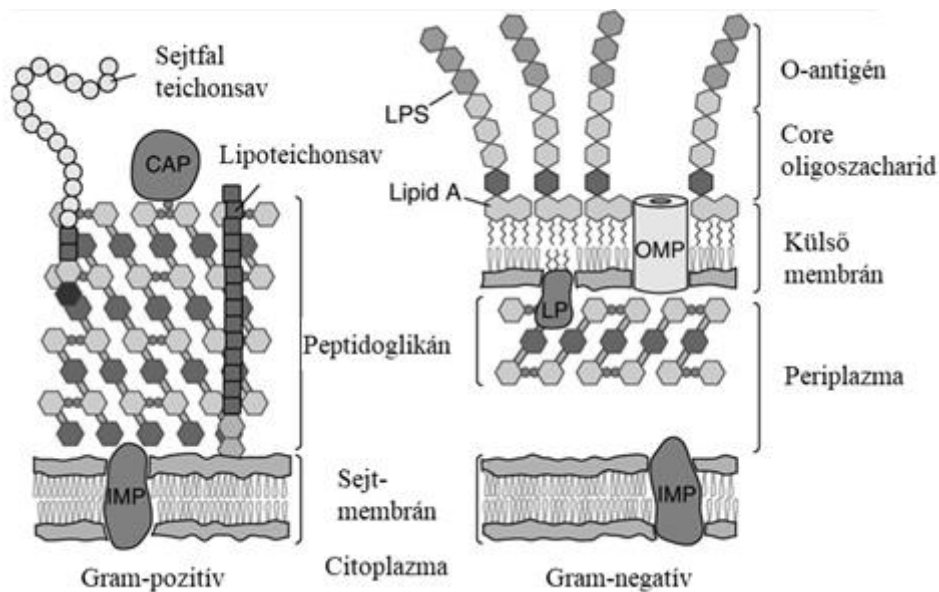


7. ábra: *Thermotoga maritima* MreB szerkezeti ábrája (PDB: 1JCG). Sárgával jelölve a MreB egyetlen triptofánja, Trp-172.

1.7 Antibiotikumok hatásmechanizmusai

A baktériumok sejtfaa egy nagyon összetett, többrétegű szerkezet, amely arra szolgál, hogy megvédje őket a kiszámíthatatlan és gyakran ellenséges környezettől. A túlélés érdekében a baktériumok kifinomult és összetett sejtburkot alakítottak ki, amely megvédi őket, de lehetővé teszi a tápanyagok kívülről és a salakanyagok belülről történő szelektív átjutását.

A Gram-negatív baktériumokat vékony peptidoglikán sejtfaa veszi körül, amelyet egy lipopoliszacharidot tartalmazó külső membrán borít. A Gram-pozitív baktériumoknak nincs külső membránjuk, de a Gram-negatív baktériumoknál sokkal vastagabb peptidoglikán réteg határolja őket (8. ábra). A peptidoglikán rétegein hosszú anionos polimerek, úgynevezett teichoinsavak futnak át. A Gram-negatív baktériumok általánosságban ellenállóbbak az antibiotikumokkal szemben. Viszont érzékenyebbek a mechanikai törésekre, mint a Gram-pozitív baktériumok, pontosan a vékony peptidoglikán miatt. Külső membránjuk egy komplex lipopoliszacharidot (LPS) tartalmaz, amelynek lipid része (lipid A) endotoxinként működik. Ez az emberi szervezet számára erős gyulladáskeltőnek számít, azonban a baktériumok ezt nem választják ki, csak a pusztulásuk után a szétesés következtében szabadul fel [62].



8. ábra: A Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumok sejtfalának összehasonlítása. (CAP = kovalensen kötött fehérje; IMP, integrált membránfehérje; LP, lipoprotein; LPS, lipopoliszacharid; OMP, külső membránfehérje) [62].

Az antibiotikumok többféleképpen fejtik ki hatásukat a baktériumon, más-más célpontjuk van. Lehetnek baktericidek, ami azt jelenti, hogy elpusztítják a baktériumot, vagy bakteriosztatikus hatásúak, amikor csak például a keletkező sejtfal kialakulását gátolják, de a már létrejött sejtfalra nincs hatásuk, tehát csak a szaporodást akadályozzák meg.

Az alapján, hogy mely sejtfolyamatokon keresztül gátolnak, hat nagy csoportba oszthatjuk őket: sejtfalszintézisgátló antibiotikumok, fehérje bioszintézis gátlók, membrán funkciót gátlók, nukleinsav-szintézis gátló antibiotikumok, anyagcsere útvonalat gátlók, ATP-szintáz gátló antibiotikumok [63].

1. táblázat: Antibiotikumok hatástani csoportosítása.

ANTIBIOTIKUMOK CSOPORTOSÍTÁSA				
Hatásmechanizmus	Antibiotikum típusa	Antibiotikum	Spektrum	Hatás
Sejtfalszintézist gátló	β-laktámok	penicillin cephalosporin carbapenem monobactam	Gram +/- Gram +/- Gram +/- Gram -	baktericid baktericid baktericid baktericid
	glikopeptidek	vankomicin teicoplanin	Gram + Gram +	baktericid baktericid
Fehérje bioszintézist gátló	makrolidok	eritromicin	Gram +	bakteriosztatikus
	klóramfenikol	klóramfenikol	Gram +/-	bakteriosztatikus
	amino-glikozidok tetraciklinek	gentamicin tetraciklin	Gram +/- Gram +	baktericid bakteriosztatikus
Membrán funkciót gátló	polipeptidek	daptomicin	Gram +	baktericid
Nukleinsav-szintézist gátló	fluorokinolonok	rifampin	Gram +/-	baktericid
Folát-szintézist gátlók	szulfonamidok	szulfametoxazol	Gram +/-	bakteriosztatikus

A sejtfallszintézist gátló antibiotikumok csoportjába tartoznak például a glikopeptidek és a β -laktám antibiotikumok (1. táblázat). A két antibiotikumcsoport hasonló módon fejti ki hatását. Utóbbiak nagy affinitással szubsztrátként kötődnek a PBP-khez, amelyek a β -laktámokkal vannak kapcsolatban és a transzpeptidációs, transzglykozilációs folyamatokat katalizálják a baktériumban. Ezek a gyógyszerek az acil-D-alanil-D-alanin szerkezeti analógjai, és képesek a PBP aktív helyéhez kötődni a transzpeptidációs reakció során, inaktiválva a PBP- k transzpeptidáz doménjét. Így a transzpeptidációs reakciót blokkolják, a sejt nem képes kialakítani a keresztköteket, gyenge sejtfa szintetizálódik. A sejtosztódások során egyre gyengébb sejtfa keletkezik, így a peptidoglikán bioszintézist gátló antibiotikumok képesek elpusztítani a mikroorganizmust [63]. Ilyen sejtfa gátló antibiotikum az elsőként felfedezett penicillin, amelynek felszintetikus származékait napjainkban is gyakran alkalmazzák.

A penicillin feltalálásával kezdetét vette a különböző antibiotikumok fejlesztése és a modern orvostudományokban való felhasználása. Azonban a baktériumok rendkívül gyorsan képesek a változó környezethez alkalmazkodni, és az antibiotikumokkal szemben rezisztenciát kialakítani. Míg az 1940-es években szinte az összes Gram-pozitív baktérium a penicillinre érzékeny volt, manapság majdnem mindegyik fertőzést okozó Gram-pozitív baktérium, például a *Staphylococcus aureus* is penicillinrezisztens, és 50%-uk a penicillin ellenállóbb utódjával, a meticillinnel szemben is ellenállóvá vált. Ezekre az evolúciós változásokra ráadásul az emberi beavatkozás is szelektív nyomást gyakorol az antibiotikumok túlzott használatával, sokszor felesleges alkalmazásával. Ezt felismerve egyes antibiotikumokat csak olyan esetekben használnak, ha minden más antibiotikum eredménytelen. Ilyen nagy hatékonyságú, korlátozott, végső megoldásként alkalmazott antibiotikum például a vankomicin [64].

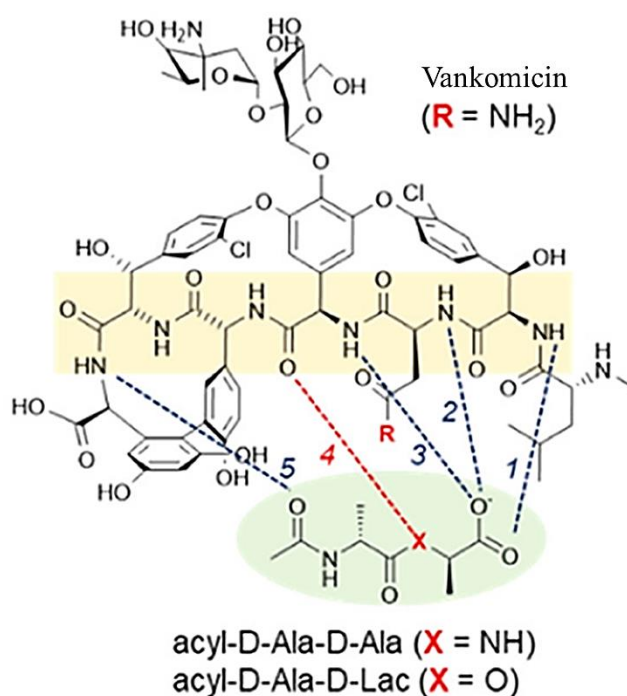
A másik általunk tanulmányozott antimikrobiális vegyület az A22, amely közvetlenül a MreB fehérjén fejti ki a hatását, és annak blokkolásával megakadályozza a baktériumsejt növekedését, szaporodását. Erről részletesebben a későbbiekben lesz szó.

Ahhoz, hogy az antibiotikumok mellékhatásait csökkenteni tudjuk, fontos megérteni, milyen módon hatnak az emberi szervezetre, illetve, hogy a baktériumokkal hogyan és milyen kölcsönhatásokat alakítanak ki.

1.7.1 A vankomicin

A vankomicin egy glikopeptid, amelyet általában Gram-pozitív fertőzések kezelésére végső megoldásként használnak, mint ún. „last resort” antibiotikumot. Célpontja a sejtfa,

pontosabban a membránkötött lipid II molekula, ami a bakteriális peptidoglikán bioszintézis prekurzora. A vankomicin az N-terminális részével kapcsolódik a lipid II C-terminálisán lévő D-Ala-D-Ala régióhoz. A tripeptid PG analóghoz kötött vankomicin szerkezetét az 1980-as évek elején leírták. A szerkezet azt mutatja, hogy a PG D-Ala-D-Ala szára egy vankomicin-aglikon (nem cukor jellegű alkotórész a molekulában) által alkotott hasadékhoz kötődik, és 5 H-híd kötés stabilizálja [65](9. ábra). Ennek a kapcsolatnak két lehetséges módja van: direkt kapcsolat a lipid II-höz, vagy előbb a membránhoz kötődik és ezt követően jut át a membrán túloldalára. A direkt membránkapcsolat esetén úgy tűnt, hogy a vankomicin nem vett fel egy előnyös orientációt, csak a vankomicin N-terminusa és a lipid II C-terminusa közti kapcsolat volt a felismerés szempontjából meghatározó. A vankomicin és a lipid II kapcsolatának egy másik módja, hogy a dimerizálódott vankomicin két lipid II molekulához spontán kötődik [66]. Ellentétben a β -laktám antibiotikumokkal, amelyek a PG bioszintézis transzpeptidációs lépésének gátlásával a penicillin-kötő fehérjékhez való kötődésen keresztül a sejtfalat is célozzák, a vankomicin a lipid II-höz köt, és ezáltal gátolja a PG bioszintézis transzglykozilációs lépését [67]. A lipid II megkötése megakadályozza a lipid transzporter (C55) regenerálódását a lipid II-ből, amihez transzglykoziláz aktivitásra van szükség. Mivel a baktériumban a C55 kópiák száma kis számban található, a vankomicin kötése a lipid II-höz hatékony eszköz a bakteriális sejtfal bioszintézisének gátlására [65].



9. ábra: A vankomicin és a D-Ala-D-Ala lánc között kialakuló H-kötések [65].

A vankomicin egy nagy hidrofil molekula, amely nem transzportálódik a membrán porin molekuláin, és nem diffundál szabadon a külső membránon [68], ezért Gram-negatív baktériumokkal szemben hatástalan, mert be sem tud jutni a sejtbe.

Egy nemrégiben megjelent tanulmány a vankomicin kationos módosítással való használatát taglalja Gram-negatív baktériumok ellen [69]. A Gram-negatív baktériumok kezelésének egyik fő kihívása az egyedi külső membránjuk és sejt felszíni módosulásaik, amelyek bizonyos antibiotikumok bejutását akadályozzák. A kutatás adatai alátámasztják azt az elképzelést, hogy az argininnel kapcsolt vankomicinen belüli kationos tulajdonság lehetővé teszi az *E. coli* és esetleg más Gram-negatív baktériumok külső membránján történő átjutását [70]. A hatásosságának okai valószínűleg magába foglalják a sejt felszínen a negatív töltésű csoportokkal való jobb asszociációt, a külső membránon keresztül történő hatékony transzlokációt, ami fokozott gyógyszerhatóanyag felvételhez vezet, és a peptidoglikán szintézis megzavarását a periplazmatikus téren belül. Ezek az eredmények megerősítik, hogy egy már meglévő antibiotikum kationos tulajdonságokkal történő ellátása egy egyszerű és gyors megoldás lehet új antibiotikumok kifejlesztésére [69]. Egy másik megfigyelés, hogy a baktérium stressz hatására érzékenyebbé válhat az antibiotikumokkal szemben. Így például az *E. coli* hidegstressz hatására permeábilis lesz a vankomicinre, ami képes átjutni a külső membránon és hasonló módon gátolja a baktériumok szaporodását, mint Gram-pozitív organizmusokban [71].

Fluoreszcensen jelölt antibiotikummal könnyebben nyomon követhető az antibiotikum hatásmechanizmusa a sejten belül, vagy akár az élő szervezetben [72]. A fluoreszcens antibiotikumok két csoportra oszthatók: autofluoreszcens antibiotikumok, amelyekben az antibiotikum egy intrinzik fluorofórt (fluoreszcens belső aminosav) tartalmaz, vagy olyan fluoreszcens antibiotikumok, ahol az antibiotikumhoz szintetikusán kapcsolják a fluorofórt. A fluorofór antibiotikumhoz való kötődése ideális esetben nem változtatja meg a célsejthez való kötődést vagy a gyógyszer farmakokinetikáját. A leggyakrabban alkalmazott fluorofórok a bór-dipirrometén (BODIPY), fluoreszcein, danzil, nitro-benzoxadiazol (NBD), és a pirén, amelyek mind relatív kis méretű és molekulásúlyú molekulák [73].

A BODIPY-vankomicin-t és egyéb fluoreszcens származékait a *Bacillus subtilis* peptidoglikán-bioszintézis vizualizációjára használják. Azonban a fluoreszcens vankomicin minimális gátlókoncentrációja (MIC: az a legkisebb antibiotikum mennyiség ml-ben, amely gátolja az összes baktérium szaporodását) magasabb, mint a hagyományos formáé, azaz kevésbé hatékony. A negatív töltésű fluorofór ugyanis gátolja a komplexnek a baktérium anionos peptidoglikán rétegén való átjutását. Ezt általában azzal küszöbölik ki, hogy a

fluoreszcensen jelölt antibiotikum mellett a jelöletlen formából is juttattak a baktériumba [74]. A BODIPY azonban viszonylag kisebb mérete, és neutralitása miatt a minimális gátlókoncentrációt sem növelte meg olyan mértékben, mint a fluoreszcenccel jelölt antibiotikum [74].

1.7.2 Az A22 hatásmechanizmusa és analógjai

Az A22 (S-(3,4-diklorobenzil) izotiourea) S-benzilizotiourea származék. [44, 75]. Az A22 mikromoláros érzékenységgel kötődik a MreB-hez (minimális gátlókoncentráció: ~13 µg/ml), és a polimerizáció folyamatába avatkozik be [76]. Emellett gátolja a baktérium mozgékonyágát, felülethez tapadását, és a biofilm képzését, amely tulajdonságok szükségesek a bakteriális fertőzések és az antibiotikum rezisztencia kialakulásához [77, 78].

Ismertek az A22 új generációs származékai, mint a CBR-4830, ami fokozott aktivitást mutat *Pseudomonas aeruginosa* ellen, és hasonlóan az A22-höz, a sejtalkot befolyásolja, valamint a MreB polimerizációt gátolja. A TXH11106 nevű, harmadik generációs A22 származék pedig jóval erősebb baktericid hatást fejt ki a Gram-negatív patogének széles skáláján, gátolva az *E. coli*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii* és *P. aeruginosa* szaporodását. Jobban gátolja a MreB ATP-áz aktivitását, mint a két elődje, és rezisztenciát is kisebb mértékben alakít ki [79].

Az A22 volt az első kémiai anyag, amiről kiderítették, hogy kromozómavesztést okoz *E. coli*-ban [80]. Mivel közvetlenül a MreB-re hat, így segítségével vizsgálható, hogy a fehérje hiánya, hibás működése milyen következményekkel jár a baktériumsejtekben.

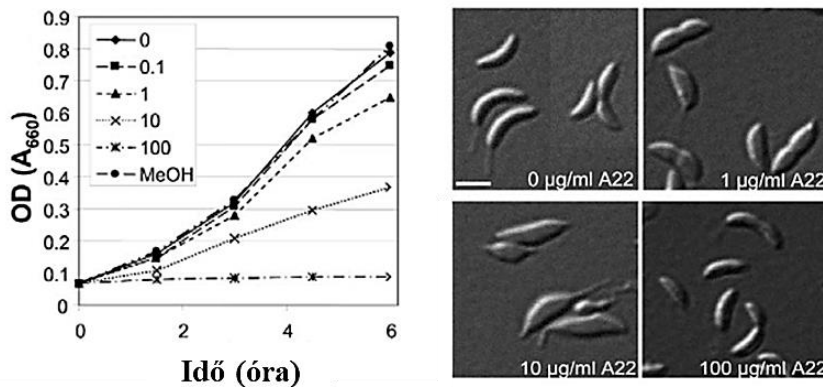
Az A22 depolimerizálja a MreB filamentumokat, szétroncsolja a bakteriális aktin citoskeletont, ezzel a morfológia és kromozómaszegregáció meghibásodását okozva. Korábban azt gondolták, hogy úgy köt a MreB nukleotid-kötő zsebébe, hogy ezzel egyidejűleg az ATP kötés térbelileg lehetetlenné válik. Így az A22 megakadályozza az ATP beépülését, ezzel a MreB hosszú, merev filamentumokba való összeépülését. Ezt korábbi kutatásokban fluoreszcens mikroszkóppal és szedimentációs próbával is bizonyították [8, 76]. Bean és munkatársai 2009-ben bizonyították először, hogy a MreB és A22 közt direkt kapcsolat jön létre [76]. Méréseik alapján az A22 affinitása nukleotid mentes MreB-hez 1,3 µM. Ez az érték jóval alacsonyabb, mint amekkora koncentrációt a sejtes vizsgálatokban alkalmaznak.

Két aminosav, az E131 és T158 vesz részt az A22 kötésben, és mindkettő konzervált a MreB fajok közt. Gitai és kutatócsoportja [29] hét misszensz (báziskicserélődés során megváltozik a

kódolt aminosav minősége) mutánszt izoláltak *C. crescentus*-ból, és a legtöbb esetben a T176A volt az A22 rezisztens mutáció. Ez pedig megfeleltethető a *T. maritima* T158 aminosavjának. Bean és csoportja kutatásai alapján az A22 gátolta a MreB összeépülését, és csak kisebb oligomerszerű alakzatok jöttek létre a kezelés hatására. Fényszóráson alapuló tesztekben bizonyították, hogy az A22 lassította a polimerizációt, 300 μM -os koncentrációig. E fölött kicsapódott a MreB fehérje. A kritikus koncentráció 500 nM-ról 2000 nM-ra tolódott el, ha a MreB-hez ATP helyett A22 kötött. Ez pedig közeli érték az ADP-kötött MreB esetén mért 1700 nM-hoz. Ebből arra következtettek, hogy az A22-MreB funkcionálisan ADP-MreB-nek feleltethető meg. Mivel az eukarióta aktin néhány száz mikromolár koncentrációban található a citoplazmában, míg a MreB csak alacsony mikromolár koncentrációban, ezek a kis változások is képesek a bakteriális citoskeletont leépíteni.

Awuni és munkatársai azonban molekula dinamikai szimulációkban megállapították, hogy az A22 a MreB nukleotid kötő zsebe melletti árokba köt [81], és kötési affinitása 20-30-szor nagyobb di- és trinukleotid foszfátok jelenlétében [44]. ATP-A22-MreB esetén az A22 az ATP γ -foszfát csoportjával hidrogén-híd kötések keresztül kölcsönhatásba lép, és ez a kölcsönhatás megakadályozza, illetve lassítja a γ -foszfát lehasadását, ezzel a filamentum instabilitását okozva. Véleményük szerint az A22 megakadályozza az ATP által kezdeményezett szerkezeti változásokat, amelyek szükségesek a stabil MreB polimer szerkezet kialakulásához. [81].

Irodalmi adatok arra utalnak, hogy az A22 kezelés hatására a MreB *in vivo*, sejten belüli helikális lokalizációja megszűnik, depolimerizálódik, ami a MreB diffúz elhelyezkedését okozza a citoplazmában, és a pálcáalak illetve az életképesség elvesztéséhez vezet [8, 29, 76]. Az A22-nek bakteriosztatikus hatása van. Ugyanis *Caulobacter crescentus* faj esetén az A22 10 $\mu\text{g/ml}$ ($\sim 50\mu\text{M}$) koncentrációban lassította a sejtek növekedését, amelyek a szer hatására gömbölyű formát vettek fel. Viszont 100 $\mu\text{g/ml}$ koncentráció már leállította a sejtnövekedést, de nem okozott változást a sejtek alakjában [29] (10. ábra).

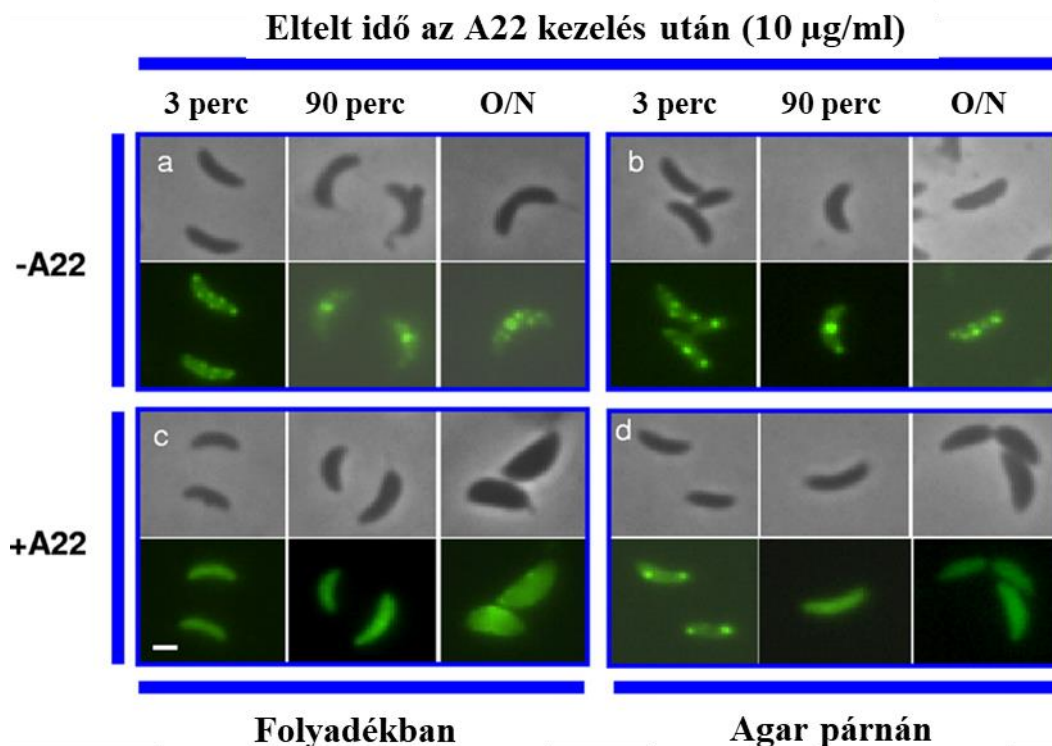


10. ábra: *C. crescentus* szaporodása A22 ($\mu\text{g/ml}$ jelenlétében) és a sejtek alakja a különböző A22 koncentrációk alkalmazása mellett [29].

Ebben a tanulmányban vizsgálták az A22 GFP-MreB fluoreszcens jelére való hatását. Az A22 GFP-MreB-re gyakorolt hatása nagyon gyors: a GFP-MreB 1 perc alatt delokalizálódik. Azonban ez a hatás gyorsan visszafordítható. Az A22-vel kezelt sejtek A22-koncentrációját csökkentették úgy, hogy a sejteket A22-t nem tartalmazó párnákra (pad) helyezték, ami a MreB lokalizációjának 1 perc alatt történő teljes helyreállításához vezetett. A GFP-MreB-t ugyanazon sejtekben figyelték meg az A22 kezelés előtt, alatt és után a sejtek timelapse-ábrázolásával, egy áramlási kamrában, amely lehetővé teszi az A22 be- és kiáramlását. Az A22 mind a MreB spirálokat (foltokat), mind a gyűrűket (sávokat) delokalizálta, bár a MreB gyűrűknek hosszabb időre volt szükségük a teljes delokalizációhoz, ami azt sugallja, hogy stabilabbak lehetnek, vagy több MreB szálból állhatnak, mint a spirálok. A sejtek általában visszanyerték az A22 kezelés előtt jelenlévő MreB szerkezetet, azaz eredeti lokalizációs mintázatukat. Ezek az eredmények összhangban állnak azzal, hogy a MreB lokalizációját a sejtciklus állapota által szabályozott külső tényezők határozzák meg, nem pedig a belső MreB lokalizációs ciklus. Ebben a tanulmányban a leggyakoribb A22-rezisztens *mreB* missense mutációt (T158A) GFP-vel fuzionálták, és feltették a kérdést, hogy ezen *mreB*-mutáns sejt szerkezete fennmarad-e 10 $\mu\text{g/ml}$ A22 koncentráció jelenlétében. Ezt a fúziót a megfelelő A22-rezisztens törzsben expresszálták, merodiploid (részben diploid) sejteket állítva elő, amelyek mind a GFP-jelölt, mind pedig a jelöletlen mutációt mutató *mreB*-t tartalmazták, de vad típusú *mreB* gént nem tartalmaztak. Ezek a sejtek még mindig foltos MreB-lokalizációt mutattak, de úgy tűnik, hogy nem teljes mértékben kondenzálják gyűrűkké a spiráljukat. Mivel ez a MreB ATP-kötő zsebében lévő mutáció megzavarja a MreB dinamikus lokalizációját, a nukleotid-hidrolízis szerepet játszhat az MreB-dinamika szabályozásában. A mutált GFP-MreB lokalizációját az A22-es kezelés csak részben befolyásolta. Ebben a kísérletsorozatban Gitai és társai arra is rámutattak, hogy az A22

a MreB-re hatva befolyásolja a kromoszómaszegregációt, viszont a DNS sokszorozódást nem akadályozza meg. Mindezek az eredmények együttesen arra utalnak, hogy a MreB fehérje az A22 célpontja [29].

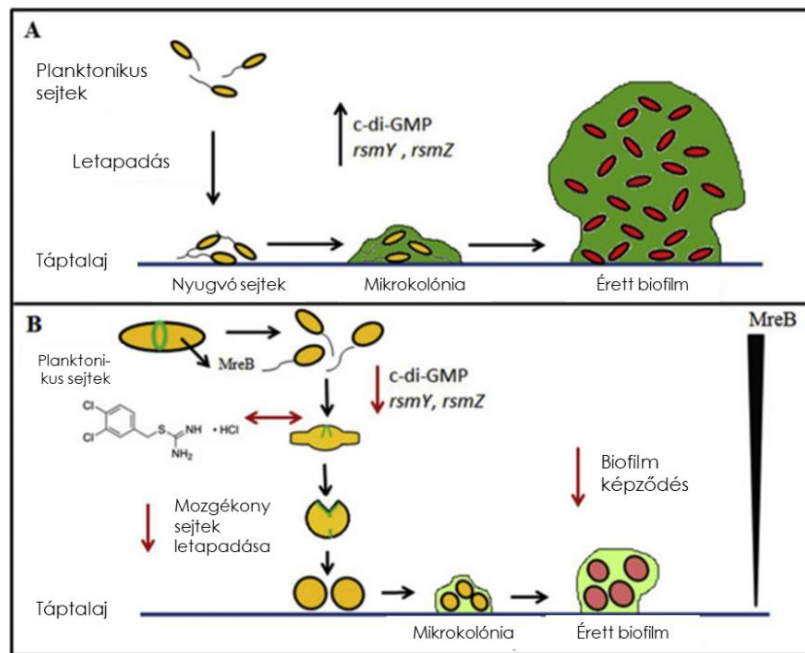
A *Caulobacter* sejtek növekedése érzékenyebb volt az A22-re, ha a sejteket folyékony tápközegben növesztették, mint a szilárd tápközegben, 1,25 µg/ml és 2,5 µg/ml koncentráció esetén. A GFP-MreB-t csak részben delokalizálja 2,5 µg/ml A22, viszont 10 µg/ml A22 koncentráció alkalmazásával teljes delokalizáció érhető el [82](11. ábra).



11. ábra: Az A22 delokalizálja a GFP-MreB jelet *C. crescentus*-ban. Egy GFP-MreB-t expresszáló törzset 10 µg/ml A22-vel kezeltek folyékony tápközegben (a és c) és agaróz párnán (b és d). A bal oldalon a folyadékban növesztett sejtek láthatók A22 kezelés nélkül (a) és A22 kezeléssel (c), a jobb oldali képeken pedig az agaróz párnán növesztett baktériumok. Az A22 kezelést 3 percig, 90 percig, vagy éjszakán át (O/N) végezték. Lépték: 1 µm [82].

1.7.3 Az A22 biofilm gátló hatása

Az A22 gátolja a biofilm képződést, ami nagyban hozzájárul a baktériumok fertőzőképességéhez [77]. A biofilmképzés során a baktériumsejtek a felületre tapadnak és egybefüggő réteget képeznek (12. ábra). Ebben az esetben a minimális gátlókoncentráció többszörösét kell alkalmazni, mint a tápoldatban lévő folyékony baktériumkultúra szaporodásának a gátlása során [83, 84].



12. ábra: A biofilmképződés sematikus ábrája (A) és a MreB A22-vel történő gátlásának következménye (B) [77].

Az atomerőmikroszkópiai mérések képesek lehetővé tenni a biofilm teljes szerkezeti felépítésének alapos kiértékelését. A kutatásban *Pseudomonas aeruginosa* baktériumot vizsgáltak, mert tipikus biofilmképző, és a klinikumban is nagy jelentősége van, ugyanis az orvosi eszközökön és implantátumokon is képes megtapadni. Ezen túlmenően, mivel már több gyógyszerrel szemben is rezisztensek, az adhézións képesség csökkentheti az antimikrobiális lehetőségeket és tovább súlyosbíthatja a fertőző állapotot. A kutatás eredményei azonban tíz különböző törzs esetén is azt mutatják, hogy az A22 sikeresen megakadályozta a biofilm képződést, annak ellenére, hogy ezek a mikroorganizmusok könnyen kitapadnak a felületre. Az A22 azonban nem mutatott anti-biofilm aktivitást a multirezisztens izolátumokkal szemben. Hasonlóképpen, az A22 vegyület nem volt hatékony a már képződött biofilmek elpusztításában. Ezért feltételezhető, hogy az A22 vegyület a tapadás kezdeti szakaszában hat, befolyásolva a biofilm fejlődés alapvető paramétereit, például a baktériumok mozgékonytását, a kitapadást a felszínre. Mivel az A22 vegyület a bakteriális sejtfal MreB fehérjéjére hatva megváltoztatja a sejthalakot, feltételezhető, hogy a sejt olyan részeit is, mint a flagella és a fimbria destabilizálhatja vagy szétbonthatja, befolyásolva a baktériumok mozgási képességét [77].

Egy másik feltételezés lehet, hogy az A22 megakadályozhatja a baktériumsejtek közötti kommunikációt, az úgynevezett „kvórumérzékelést” (*quorum sensing*, QS). A QS azonban a biofilmek késői fejlődésében játszik nagyon fontos szerepet és azok diszpergálásában, nem pedig a kezdeti adhézións szakaszban, ahogy ebből a kutatásból tűnik. Ha az A22 vegyület képes

gátolni a QS jelátviteli molekuláit, akkor valószínűleg hatékony a meglévő biofilmek megsemmisítésében vagy gyengítésében [77].

Az A22 származékait más antimikrobiális szerekkel kombinálva olyan új készítményeket kaphatunk a kórházi környezetben használt eszközök, felületek bevonására, amelyek a baktériumok adhéziójának megelőzésére szolgálnak. Az A22 *Pseudomonas aeruginosa* HeLa sejtekhez (emberi, tumor eredetű sejtvonal) való tapadását is tanulmányozták, mivel sok fertőzés esetén az emberi szöveten képeznek a baktériumok biofilmet. Ez a vegyület pedig ebben az esetben is csökkentette a baktérium HeLa sejtekhez tapadását [77].

Kézenfekvő lehet tehát, hogy az A22-t, illetve hatásmechanizmusán alapuló hatékonyabb származékait antibiotikumként, terápiás célra használjuk. Megerősíti ezt, hogy sem citotoxikus, sem genotoxikus hatása nincsen, tehát sem a sejtekre, sem az örökítőanyagra nincsen hatással. Mivel közvetlenül a MreB-re hat, így új antimikrobiális ágens lehet a multirezisztens baktériumok ellen [85].

2. Célkitűzések

A korábban leírt MreB irodalom alapján világosan látszik, hogy a MreB fehérjék *in vitro* vizsgálata komoly nehézségekbe ütközik, hiszen a fehérje tisztítása és stabil, funkcióképes állapotban való tartása nagy kihívást jelent [40, 45, 86].

Ennek megoldására tűztük ki célul, hogy natív körülmények között tudjunk funkcionális fehérjét, nagy mennyiségben előállítani. Ehhez egy új bakteriális expressziós rendszert (*E. coli* BL21 Arctic Express (DE3)) használatunk. Ez az expressziós rendszer ugyanis tartalmaz chaperon fehérjét is, ráadásul alacsonyabb hőfokon történik az expresszió, ami segítheti a fehérje natív konformációjának a felvételét, illetve a zárványtestek keletkezését is megakadályozza. A MreB irodalomban leírt egyik leggyakoribb baktériumfajjal, a *Thermotoga maritima* MreB fehérjéjével folytattuk kísérleteinket. Ennek a MreB-nek írták le elsőként a monomer kristályszerkezetét [5], ráadásul tartalmaz egy spektroszkópos szempontból jól vizsgálható triptofán aminosavat is. Célunk volt tehát annak megállapítása, hogy az ebben az új expressziós rendszerben megtermelt szolubilis fehérje milyen körülmények között marad stabil és funkcionális.

Disszertációm második felében az A22 és vankomicin hatásait vizsgáltuk az előzőekben leírt módon előállított *Tm*-MreB fehérjén. Mindkét antibiotikummal (külön-külön) végeztek korábban szinergizmus vizsgálatokat is [87, 88], ahol bebizonyosodott a pozitív kölcsönhatásuk más antibiotikumokkal. Kísérleteinkben a két antibiotikum egymással való kölcsönhatását is vizsgáltuk.

- Célunk volt, hogy kidolgozzuk a *Thermotoga maritima* MreB natív feltárási protokollját, egy újonnan alkalmazott ArcticExpress (DE3) expressziós rendszerben, amit MreB fehérjék esetén még nem használtak korábban.
- Ezután a tisztított *Tm*-MreB funkcionális tesztjei következtek. Ehhez elsősorban denaturációs tesztekkel végeztünk: hődenaturáció és kémiai denaturáció módszerével, a triptofán emisszió nyomon követésével szereztünk információkat a *Tm*-MreB hő- és kémiai stabilitásáról.
- Célunk volt meghatározni a MreB nukleotid kötését, és a különböző nukleotidok fehérje polimerizációjára gyakorolt hatását.
- Terveink között szerepelt az A22 és a vankomicin *Tm*-MreB-hez való kötésének leírása, a fehérjére kifejtett hatásuk karakterizálása.
- Kíváncsiak voltunk, hogy az A22 hogyan változtatja meg a MreB lokalizációját a sejten belül.
- Célunk volt tanulmányozni a két antimikrobiális ágens *E. coli* baktériumsejtek növekedésére kifejtett hatását is. Ehhez szaporodási tesztekkel terveztünk, amit mikrobiológiai módszerekkel támasztottunk alá.

3. Anyagok és módszerek

3.1 *Thermotoga maritima* MreB fehérje natív preparálás

A *Thermotoga maritima* MreB-t tartalmazó plazmidot ArcticExpress (DE3) (Agilent Technologies) kompetens sejtbe transzformáltuk. 100 µl kompetens sejtbe 2 µl 1:10 arányban desztillált vízzel hígított β-merkaptotetanolt adtunk. A sejteket jégen inkubáltuk 10 percig, 2 percenként megforgatva a csöveket. A 10 perc letelte után 5 µl plazmid DNS-t adtunk a kompetens sejtekhez. A transzformált sejteket ezután 30 percig jégen inkubáltuk. 20 másodperces hősokkot követően (42 °C-os vízfürdő), ismét 2 percre jégre tettük a sejteket. A transzformált baktériumsejteket 0,9 ml előmelegített Luria Broth (LB) tápoldatban növesztettük 37 °C-on, 1 órán keresztül, 220- 250 rpm sebességgel rázatva. Ezután 150 µl sejt kultúrát szélesztettünk kettős rezisztenciát tartalmazó plate-re (gentamicin: 20 µg/ml és ampicillin: 100 µg/ml).

Egy különálló teleppel beoltottunk 100 ml LB oldatot, ami tartalmazza a megfelelő mennyiséget mindkét antibiotikumból. A sejt kultúrát 37°C-os rázóinkubátorban (220-250 rpm) növesztettük egy éjszakán át. A következő napon 20-20 ml sejt kultúrát adtunk 1-1 l LB tápoldathoz és 30 °C-on, 220-250 rpm-el ráztuk 3 órán keresztül. Az inkubációs idő letelte után a hőmérsékletet visszavettük 11,5 °C-ra. Ahogy a sejtek visszahűltek 20 °C-ra, 0,8 mM végkoncentrációjú IPTG-vel expresszáltunk, 24 órán keresztül. A sejteket centrifugáltuk (2900xg, 10 min.) és a pelletet – 20 °C-on tároltuk.

A *Thermotoga maritima* MreB sejt pelletet (1-2 g) TRIS-HCl pufferben homogenizáltuk (50mM TRIS, pH 8,0, 1 g pellet/10 ml puffer). Lizozim hozzáadása után jégen szonikáltuk a sejteket (80%, impulzus 1 percig, majd 1 perc szünet, 6-7-szer ismételve). Centrifugálás (328000xg, 4 °C, 30 perc) előtt DNáz I-et adtunk a lizátumhoz (50 µg/ml). A Ni-nitrilotriacetic acid (Ni-NTA) (Qiagen) oszlopot 5% imidazol pufferrel (1M imidazol, 50 mM TRIS-HCl, pH 6.0) és 95% NaCl pufferrel (300 mM NaCl, 50 mM TRIS-HCl, pH 6.0) equilibráltuk és a felülúszót minimum 1 órán keresztül hűtve kevertettük. Azután az oszlopot rendre 10-20-30-50% imidazol pufferrel mostuk (NaCl pufferben oldva). A frakciókat külön gyűjtöttük és SDS gél elektroforézissel vizsgáltuk.

A MreB-t tartalmazó frakciókat A pufferben dializáltuk (4 mM TRIS-HCl, 0.1 mM CaCl₂, pH 7,5) két puffercserével. A MreB-t végül ultracentrifugáltuk (328000xg, 4 °C-on, 30 percig). A His tag-et PreScission proteázzal távolítottuk el (GE Healthcare Life Sciences) (2U/100 µg fehérje), amit a fehérje mellett hagytunk éjszakán keresztül 4 °C-on. A proteázt másnap

glutation oszlopon távolítottuk el, a proteáz GST affinitás tagjának köszönhetően. A fehérje végső koncentrációját spektrofotométerrel mértük meg. Extinkciós koefficiens: $11460 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

3.2 Funkcionalitás vizsgálatok

3.2.1 Polimerizáció követése fényszórás mérésekkel

A MreB polimerizációját fényszórás mérésekkel követtük SAFAS Xenius XLS Fluoriméterrel, 400 nm-re állítva a gerjesztési és az emissziós hullámhosszt. A MreB polimerizációs folyamatainak vizsgálatához 100 mM KCl koncentrációt alkalmaztunk (P100: 4 mM TRIS, 100 mM KCl, 2 mM MgCl_2 , 1mM EGTA). Kísérleteinkben az A22-t a polimerizáció kezdetén, a polimerizáló sóval egyidejűleg adtuk a fehérje oldathoz. Feltételeztük, hogy minél több filamentum alakul ki, illetve van jelen az oldatban, annál nagyobb a szórás mértéke.

3.2.2 Inorganikus foszfát mérés

A MreB ATP felhasználása során keletkező foszfát méréséhez EnzCheck® Pyrophosphate Assay Kit-et használtunk (Biocenter). Inorganikus foszfát jelenlétében a 2-amino-6-merkaptó-7-metilpurin ribonukleozid (MESG) enzim a purin nukleozid foszforiláz (PNP) segítségével ribóz 1-foszfáttá és 2-amino-6-merkaptó-7-metilpurinná bomlik. Ezen enzimatikus átalakulás során a 2-amino-6-merkaptó-7-metilpurin abszorpciós maximuma 330 nm-ről 360 nm-re tolódik el. Időben követve tehát a 360 nm-en történő növekvő optikai denzitás egyenes arányosságban van a felszabadult inorganikus foszfát mennyiségével.

3.2.3 Triptofán fluoreszcencia mérések

20 μM *Tm*-MreB vagy 20 μM triptofán aminosavat mértünk sómentes (4 mM TRIS-HCl, 0,1 mM CaCl_2 , pH 7,5) vagy magas sótartalmú (20 mM TRIS-HCl, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7,5) pufferben, Horiba Jobin Yvon spektrofluorométerrel. A gerjesztést 295 nm-re állítottuk, az emissziót 310 nm és 450 nm között mértük 22 °C-on.

3.2.4 Hőmérsékletfüggő triptofán emisszió mérés

20 μM *Tm*-MreB fehérjét két féle puffer körülmény között 2 mM ATP jelenlétében vagy a nélkül vizsgáltunk. Sómentes puffert (4 mM TRIS-HCl, 0,1 mM CaCl_2 , pH 7,5) vagy magas sótartalmú puffert (20 mM TRIS-HCl, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7,5) alkalmazva, a fehérjét) 20-95 °C-ra melegítettük, és a triptofán fluoreszcencia-intenzitását folyamatosan mértük 310-450 nm között. A gerjesztési hullámhossz 295 nm volt. A méréseket Quantum Northwest TLC50 kontrollálható hőmérsékletű kivetta tartóval felszerelt Jobin Yvon Horiba fluoriméteren végeztük.

3.2.5 Kémiai denaturáció

20 μM *Tm*-MreB triptofán intenzitását Horiba Jobin Yvon fluoriméterrel mértünk. A kémiai denaturálást guanidin-hidroklorid oldattal végeztük (6 M Gu-HCl-ot sómentes vagy magas sótartalmú pufferben oldottunk fel). A guanidin-hidrokloridot növekvő koncentrációban, 0,2 M-os lépésekben adtuk a fehérjéhez. A gerjesztést 295 nm-re állítottuk, és a triptofán emissziót minden lépésben detektáltuk 310 nm és 450 nm között, szobahőmérsékleten.

3.2.6 Nukleotid kötés, leszorítás vizsgálata TNP-ATP-vel

Az ATP kötését egy nem hidrolizáló ATP-analóggal, TNP-ATP-vel vizsgáltuk *Tm*-MreB-n. A kötés hatására a TNP-ATP fluoreszcencia intenzitás sokszorosára nő. Az ATP mentes pufferben dializált fix koncentrációjú (20 μM) MreB-t egy éjszakán át sómentes (4 mM TRIS-HCl, 0,1 mM CaCl_2 , pH 7,5) vagy magas sótartalmú (20 mM TRIS-HCl, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7,5) környezetben 1 μM TNP-ATP-vel inkubáltunk. 50 μM A22 hiányában vagy jelenlétében. Másnap megmértük a TNP-ATP fluoreszcencia intenzitását. A gerjesztést 400 nm-re állítottuk, és az emissziót 420 nm és 650 nm között mértük Jobin Yvon Horiba fluoriméterrel. A spektrumok maximális intenzitását (540 nm-rel) alkalmaztuk a kötési arány kiszámításához, és a kötött frakciót 0-ra állítottuk be kötés nélkül és 1-re telítéssel. A görbékre az alábbi Hill-egyenletet illesztettük, ahol V_{max} az y adatsor maximuma; k x féltelítésnél, n pedig a Hill-együttható. A TNP-ATP kötési állandója (K_d)-ja a *Tm*-MreB-hez a k érték volt (*1. egyenlet*).

$$y = V_{max} * \frac{x^n}{k^n + x^n} \quad (1.)$$

Az ATP kompetíció vizsgálatához 20 μ M *Tm*-MreB-t egy éjszakán át sómentes (4 mM TRIS-HCl, 0,1 mM CaCl₂, pH 7,5) környezetben 1 μ M TNP-ATP-vel inkubáltunk. A következő napon nem fluoreszcens ATP-t (pH 7,5) adtunk a mintákhoz, és megmértük a TNP-ATP fluoreszcens jelét.

Az ATP *Tm*-MreB-hez való affinitását a Langmuir egyhelyes kötési egyenlet segítségével számítottuk ki görbeillesztésre a korábbi publikációk alapján [89].

3.2.7 Steady-state anizotrópia

A méréseket Jobin Yvon Horiba fluoriméteren végeztük. A kötődés vizsgálatához 1 μ M fluoreszcensen jelölt vankomicint (Invitrogen) (BODIPYTM FL Vancomycin = FLV) használtunk, a fehérje koncentrációját pedig fokozatosan növeltük. A vizsgálatunkat ATP, vagy polimerizáló só, vagy mindkettő jelenlétében végeztük. Az affinitás meghatározásához a következő egyenletet használtuk:

$$y = \frac{y_{min} + (y_{max} - y_{min}) * \left(\frac{((KD + FLV + x) - (((KD + FLV + x)^2) - (4 * FLV * x))^{0,5})}{(2 * FLV)} \right)}{(2 * FLV)} \quad (2.)$$

ahol

y_{min} : a legalacsonyabb fluoreszcencia anizotrópiai érték

y_{max} : a legmagasabb (telítési) fluoreszcencia anizotrópiai érték

FLV: a fluoreszcens vankomicin koncentrációja

KD: a disszociációs állandó

3.3 Mikroszkópai mérések

MreB filamentumok vizsgálata

20 μM *Tm*-MreB fehérjét polimerizáltunk magas sós pufferben, 100 μM A22 jelenlétében, vagy a nélkül. A filamentumokat 2 óra elteltével Alexa-488-falloidinnel jelöltük, és Zeiss Elyra SIM S.1 mikroszkópban vizsgáltuk.

Élő sejtek vizsgálata

E. coli sejteket növesztettünk LB tápoldatban, éjszakán át 37 °C-on rázatva. Másnap vankomicin, A22, vagy mindkettő szer jelenléte mellett 1 ml friss tápoldatban növesztettünk a baktériumokat 1 órán keresztül. Ezt követően a sejtuszuspenziókat lecentrifugáltuk (9400xg, 1 perc), PBS-ben (*foszfáttal pufferelt sóoldat*) kétszer átmostuk, közte megint centrifugáltuk. Végül 1ml PBS-ben vettük fel a sejteket, majd az antibiotikumokat is tartalmazó agar pad-re cseppentettük őket a mikroszkópos megfigyelésekhez (Olympus IX 81). A sejtek hosszát Image J 1.50i programmal határoztuk meg.

Az A22 *in vivo* MreB-re kifejtett hatását GFP-vel konjugált MreB segítségével vizsgáltuk *E. coli*-ban. A GFP-MreB plazmiddal transzformált *E. coli* sejteket 2% arabinózzal indukáltuk, 50 $\mu\text{g/ml}$ A22 jelenlétében, illetve hiányában. Egy óra elteltével a mintákat 1%-os agaróz padra csöppentettük, majd SIM mikroszkópban vizsgáltuk. (Zeiss Elyra S.1 SIM mikroszkóp, PTE, Szentágothai János Kutatóközpont)

3.4 Baktériumpopuláción végzett mikrobiológiai tesztek

3.4.1 Szaporodási görbe és sejtparaméterek vizsgálata

E. coli sejt kultúrát Luria Broth (0,5% élesztő kivonat, 1% NaCl, 1% pepton) tápoldatban növesztettünk 37 °C-on, rázóinkubátorban. A sejtek optikai denzitását 600nm-en detektáltuk Perkin Elmer Lambda XLS+ spektrofotométeren. Az egyes sejtek hosszát Olympus IX81 mikroszkóp segítségével vizsgáltuk, és ImageJ 1.50i programmal határoztuk meg. A statisztikához egyutas ANOVA tesztet futtattunk, a szignifikanciaszintet ANOVA után végzett Bonferroni-féle korrigált valószínűségi teszttel határoztuk meg, OriginPro 2020 programban.

3.4.2 Minimális gátlókoncentráció és szinergizmus meghatározása

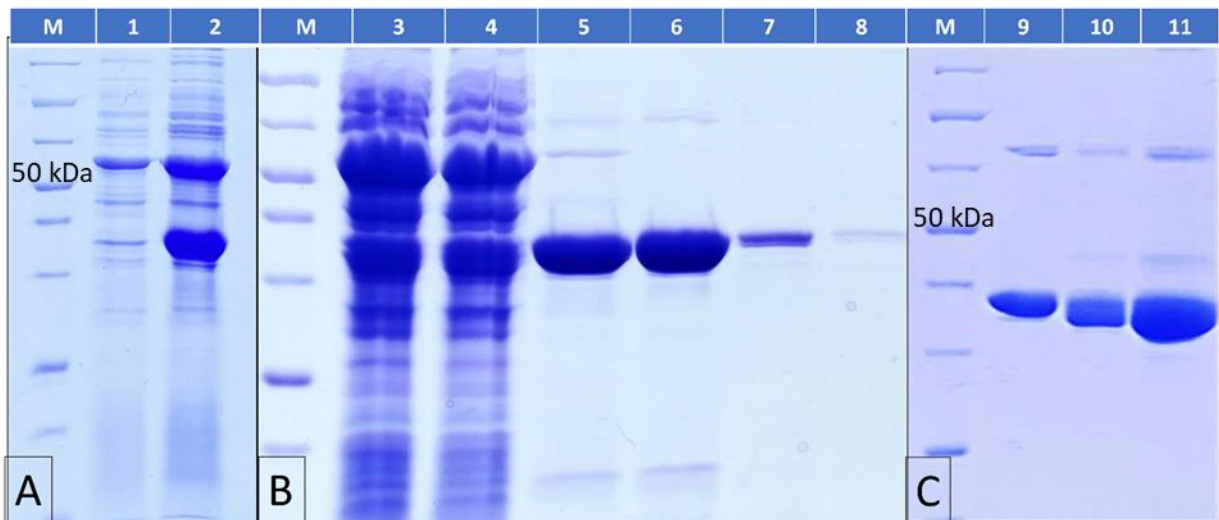
E.coli K-12 sejt vonalat (Sigma-Aldrich) használtunk a mérésekhez. A minimális gátlókoncentrációt mikrodilúciós módszerrel határoztuk meg. 96-Well Plate-en az A22 és vankomicin esetén 10 különböző koncentráció értéket állítottunk be, felező hígítással, mindegyik 3-szor szerepelt. 24 óra 37 °C-on történt inkubáció után értékeltük a kapott eredményeket. A szinergista hatást mikrodilúciós checkerboard esszé segítségével határoztuk meg. A baktériumszuszpenzió optikai denzitását 0,12-re (OD₆₀₀, McFarland standard 0,5) állítottuk, majd 500-szoros LB tápoldattal történő hígítást alkalmazva 2*10⁵ sejt/ml koncentrációt kaptunk. 50 µl kétszeres sorozathígítású vankomicint adtunk vízszintesen a 96 lyukú lemezre, és további 50 µl sorozathígítású A22-t függőlegesen adtunk a lyukakba. Mindegyik lyukba 100 µl baktériumkultúra került, így felére hígult végül a sejt kultúra és az antimikrobiális szerek pedig negyedükre (ezt a hígítási sor mérésénél figyelembe vettük). Az első oszlopba csak tápoldat került, vaknak, a másodikba pedig csak *E. coli*, felére hígítva LB tápoldatban kontrollként. 37 °C-on 24 órás inkubálás után az eredményeket mikroplate spektrofotométerrel (Thermo Electron Corporation, Multiskan EX) mértük, az optikai denzitást 535 nm-en határoztuk meg. Az antimikrobiális szerek legkisebb MIC értékét felhasználva a frakcionált gátló koncentráció index, azaz ΣFICI (fractional inhibitory concentration index) értékét az alábbi képlettel számoltuk ki. (3. egyenlet) Amennyiben ΣFICI ≤ 0,5, szinergizmusról beszélhetünk, tehát a két antibakteriális szer támogatja egymás hatását.

$$\Sigma FICI = \frac{FICI_{A,együtt}}{FICI_{A,önmaga}} + \frac{FICI_{B,együtt}}{FICI_{B,önmaga}}$$

(3.)

4. Eredmények

4.1 *Thermotoga maritima* MreB preparálási protokoll kidolgozása



13. ábra: *Thermotoga maritima* MreB fehérje expresszálása, tisztítása. **A:** Fehérjesúly marker (M)(Thermo Scientific, #26630), sejtlizátum indukció előtt (1) és utána (2). **B:** Tm-MreB tisztítása, ultracentrifugálás előtt (3), után (4), és elúció emelkedő koncentrációjú imidazollal (5-8). **C:** Tm-MreB a His-tag eltávolítás előtt (9), His-tag levágása után (10); végül a koncentrált Tm-MreB His-tag nélkül (11).

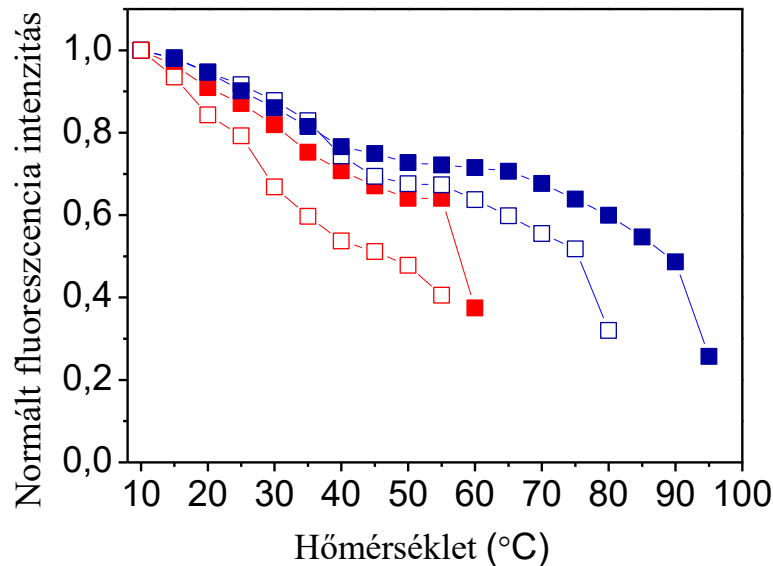
Megfigyelésünk szerint az ArcticExpress (DE3) kompetens sejt használatával magas a MreB expressziós mennyisége (13A. ábra, 2. sor), ezen kívül pedig szinte nincs veszteség ultracentrifugáláskor: a MreB teljes mennyisége megtalálható a felülúszóban. (13B. ábra, 3. és 4. sor).

A van den Ent és munkatársai által leírt protokollt követve [5] a Tm-MreB növekvő imidazol koncentrációval eluálható a nikkel-gyantáról (13B. ábra, 5., 6. és 7. sáv). A hisztidin tag eltávolítható (13C. ábra, 9. és 10. sáv), és a fehérje további koncentrációja akár aggregáció nélkül is lehetséges (13C. ábra, 11. sáv).

Viszont a tisztítás során két különböző pufferkörülményt is alkalmaznunk kellett, mert a cikkben leírt puffer (magas sós puffer: 20 mM TRIS-HCl, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7,5) a fehérje hosszú távú tárolására nem volt alkalmas. Az imidazolt pedig el kellett vonni a fehérje mellől. Amennyiben az imidazollal eluált mintát A pufferbe (sómentes puffer: 4 mM TRIS, 0,1 mM CaCl₂, 2 mM ATP jelenlétében, vagy anélkül, pH 7,5) próbáltuk átdializálni, kicsapódott a MreB. Ezért kellett beiktatnunk a magas sós pufferben történő imidazol elvonást a sómentes pufferbe történő dializálás előtt. A MreB tehát só nélküli környezetben és ATP jelenléte mellett stabilabbnak bizonyult, míg a magas sós pufferben oldható maradt.

4.2 *Thermotoga maritima* MreB stabilitásának vizsgálata

4.2.1 Hőstabilitás vizsgálata



14. ábra: A *Tm*-MreB denaturációja különböző pufferkörülmények között. Sómentes pufferben (kék), magas sós pufferben (piros), 2mM ATP jelenlétében (teli szimbólum) vagy ATP nélkül (üres szimbólum).

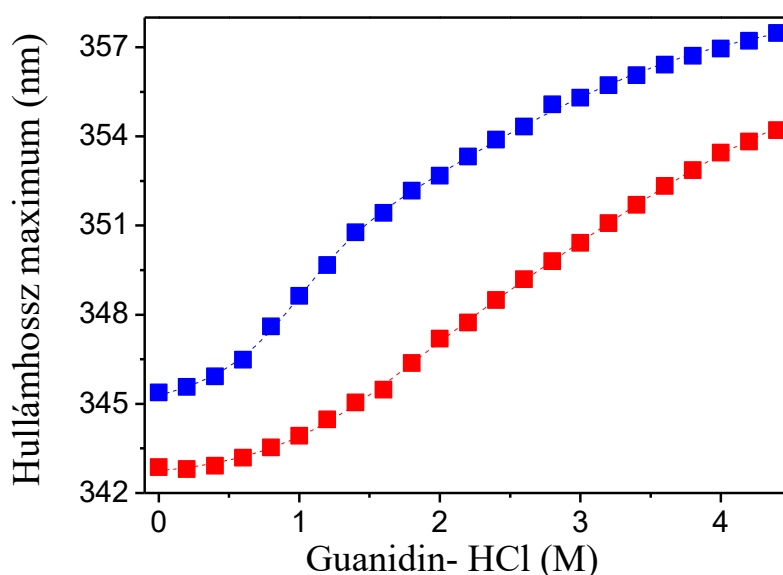
A fehérje hőstabilitását a triptofán fluoreszcencia intenzitásán keresztül követtük. A triptofán emissziót 350 nm-en mértük, miközben 20 °C-ról indulva 5 °C-os lépésekben növeltük a hőmérsékletet (14. ábra). A méréseket ATP jelenlétében (teli szimbólum), vagy anélkül (üres szimbólum) végeztük, magas sós (piros) és sómentes (kék) pufferben. 2mM ATP jelenlétében a denaturáció 90 °C felett történt, magasabb hőmérséklet értéken, mint nukleotid nélkül. Az ATP tehát stabilizálja a MreB szerkezetét. Ezen kívül a 40-60 °C közt minden esetben megfigyelhető egy strukturális változás, szerkezeti átrendeződés. Összehasonlítva a sós és sómentes környezetet, a só jelenlétében a hődenaturáció korábban következett be. Sómentes környezetben a *Tm*-MreB 75 °C-ig stabil maradt. Olvadási hőmérsékleten 90-95 °C között egy jelentős intenzitáscsökkenés volt megfigyelhető (1. számú melléklet). Azonban nem tapasztaltunk eltolódást a hullámhosszak maximumában a vörös tartomány felé, ahogy aktin esetében jellemző (2. számú melléklet).

Az alábbi táblázat összefoglalja az általunk mért denaturációs hőmérséklet értékeket, amiket összehasonlítottunk egy korábbi cikkben CD-spektroszkópiás mérésekkel kapott adatokkal [40]. Ezek a mérések összhangban voltak az általunk mért értékekkel.

2. táblázat: Az olvadási hőmérsékletek összehasonlítása különböző pufferkörülmények hatására.

Olvadási hőmérséklet		
Puffer	Előzetes értékek (CD)	Saját munka (Triptofán jel)
Sómentes	n.a.	75°C
Sómentes + ATP	70°C	90°C ≤
Magas sós	53°C	~50°C
Magas só + ATP	n.a.	55°C

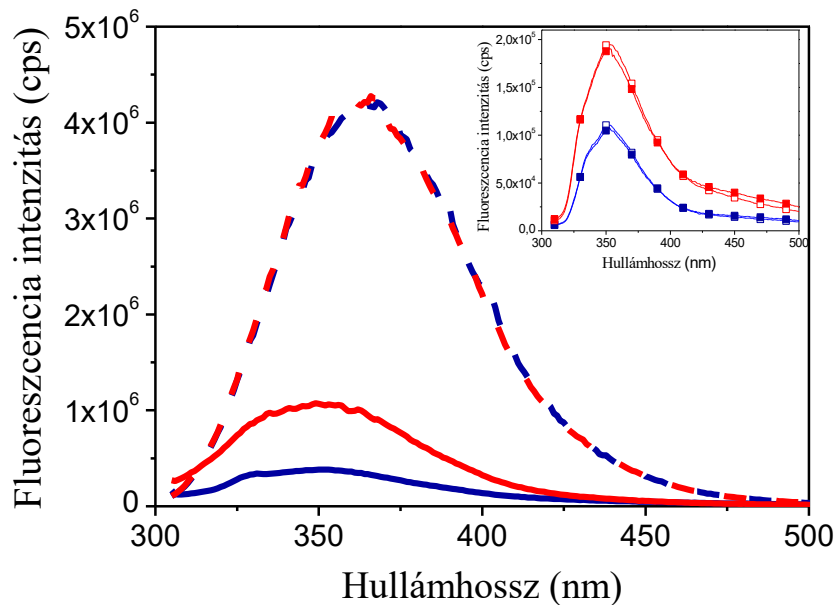
4.2.2 A *Thermotoga maritima* MreB kémiai denaturációja



15. ábra: A *Tm-MreB* kémiai denaturációja. Kékkel a sómentes környezetet, pirossal a magas sós környezetet jelöltük.

A hődenaturációs vizsgálatok alátámasztására kémiai denaturációs kísérleteket végeztünk. Guanidin-hidrokloridot növekvő koncentrációban adtuk a fehérje mellé, miközben folyamatosan mértük a triptofán fluoreszcencia intenzitását (3. számú melléklet). Tapasztalataink szerint a kémiai denaturáció során is intenzitás csökkenés volt megfigyelhető, ahogyan a termális denaturáció folyamatában már láttuk. Ezen kívül a hullámhossz maximumának eltolódását figyeltük meg a magasabb hullámhosszak irányába, mind a sós (piros) és só nélküli (kék) pufferkörülmények esetén (15. ábra). Ez adódhat abból, hogy a fehérje más konformációváltozást szenved a kémia hatásokra, mint hő hatására.

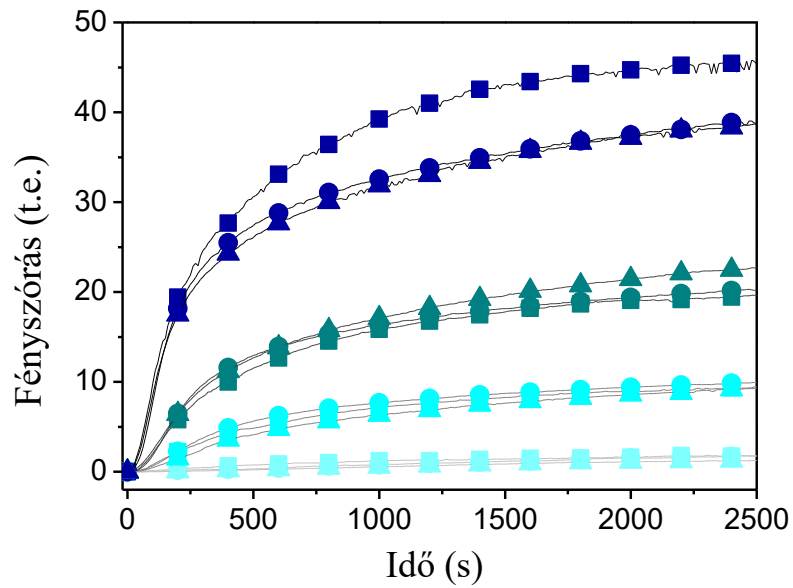
4.2.3 Só és nukleotid hatása a triptofán emisszióra



16. ábra: A MreB triptofánjának fluoreszcencia intenzitása sós (piros) és sómentes környezetben (kék), ATP-vel (betét: teli szimbólum), vagy ATP nélkül (betét: üres szimbólum). A triptofánt pufferben, önmagában mérve szaggatott vonalak jelölik.

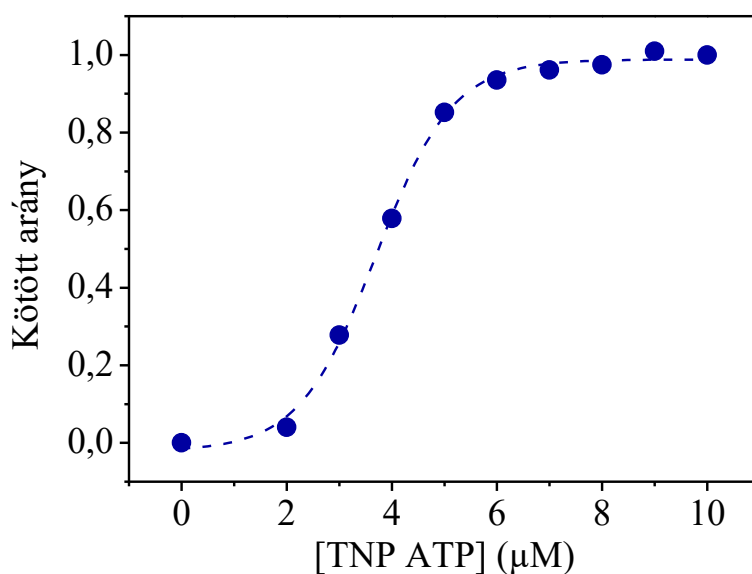
Kíváncsiak voltunk arra is, hogy milyen paraméterek befolyásolják a triptofán intenzitását. Ezért a triptofánt önmagában is vizsgáltuk, különböző pufferekben (16. ábra). Méréseink alapján a triptofán intenzitása független a nukleotid jelenlététől. A beillesztett ábrán látható, hogy a sómentes környezetben a MreB triptofánjának intenzitása jóval alacsonyabb, mint magas sós pufferben, és hogy az ATP jelenléte nem befolyásolta a triptofán intenzitását. Másfelől, ahogy a fő ábrán látható, a triptofán 4-10-szer alacsonyabb intenzitást mutatott a fehérjével mért értékeknél (folytonos vonal), mint önmagában a pufferben (szaggatott vonal). Ez feltehetően a fehérjeszerkezet árnyékoló hatásának köszönhető. Az, hogy sómentes környezetben a triptofán fluoreszcencia intenzitása sokkal alacsonyabb, mint sós jelenlétében, azzal magyarázható, hogy a sómentes környezetben a fehérje zártabb konformációt vesz fel, mint sós jelenlétében.

4.3 Nukleotidok szerepe a MreB polimerizációjában



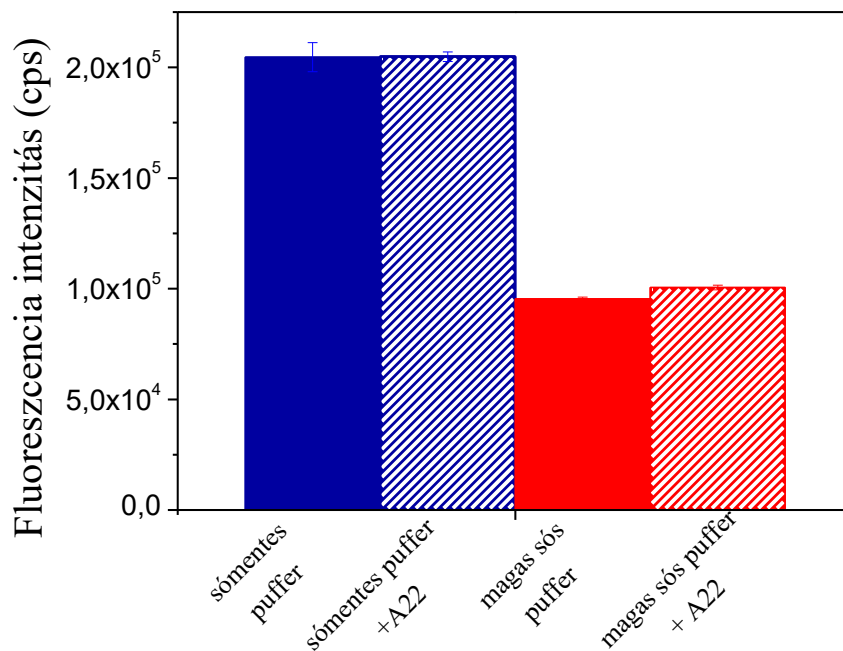
17. ábra: A MreB polimerizációjának nukleotid-függése, ATP (négyzet), ADP (kör) vagy GTP (háromszög) mellett (halvány türkiz: 1 μ M MreB, türkiz: 5 μ M, zöld: 10 μ M, kék: 21 μ M) (t. e.: tetszőleges egység)

Különböző koncentrációjú MreB fehérjét polimerizáltunk ATP, ADP, vagy GTP jelenlétében. A MreB polimerizációját szórás alapú tesztekkel követtük (400 nm-en gerjesztettük, és 400 nm- en mértük az emissziót). Kísérleteinkben azt találtuk, hogy a polimerizáció sebessége a növekvő MreB koncentráció függvényében nő, viszont a nukleotid típusa nem befolyásolta a polimerizációt. Magasabb MreB koncentráción azonban több filamentum keletkezett (17. ábra).



18. ábra: A TNP-ATP kötése *Tm-MreB*-hez.

Az *MreB* ATP kötését TNP-ATP-vel tudtuk mérni. Ez egy nem hidrolizáló fluoreszcens ATP-analóg, aminek a kötés hatására a fluoreszcenciaintenzitása szignifikánsan megnő. Állandó koncentrációjú *MreB* fehérjéhez növekvő koncentrációban TNP-ATP-t adtunk, és mértük a fluoreszcencia intenzitását. Ahogy a fenti ábrán is látható, a TNP-ATP intenzitása fokozatosan növekedett a koncentráció emelkedésével, de egy bizonyos érték után már nem volt képes a fehérje több ATP-t beépíteni, és az intenzitás nem változott (18. ábra). A fluoreszcencia intenzitás maximumokat a TNP-ATP koncentráció függvényében detektáltuk, majd a kötött ATP arányát a TNP-ATP koncentráció függvényében ábrázoltuk. A görbére Hill-egyenletet (1. egyenlet) illesztve megkapjuk, hogy a fehérje milyen arányban van ATP-kötött állapotban a teljes fehérje koncentrációhoz képest. Eredményeink alapján a *Tm-MreB* 3,7 μM affinitással köti a TNP-ATP nukleotid analógot. Ez nem jelez erős kötődést, amit azzal magyarázunk, hogy más *MreB*-kötő faktoroktól is függhet a kötési állandó.

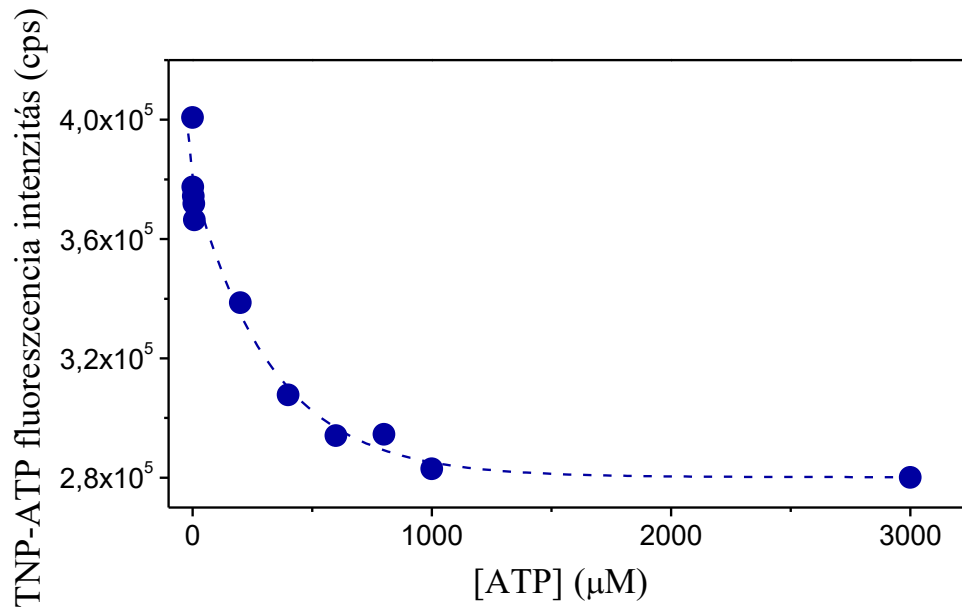


19. ábra: A TNP-ATP MreB-hez való kötődésének vizsgálata fluoreszcencia intenzitás mérésével különböző pufferkörnyezetben. A hiba a standard hibát (SD) jelöli.

Érdekes módon, bár a TNP-ATP mindkét pufferkörülmeny között kötődik a *Tm*-MreB-hez, a kötődés erősebb a sómentes pufferben, mint só jelenlétében. A TNP-ATP fluoreszcencia intenzitása megközelítőleg kétszeres sómentes pufferben, ha a *Tm*-MreB azonos koncentrációját alkalmaztuk (19. ábra). Azt is megvizsgáltuk, hogy a MreB specifikus inhibitor A22 képes-e blokkolni az ATP kötődését a *Tm*-MreB-hez. Spektroszkópai adataink egyértelműen azt mutatják, hogy az A22 nincs hatással a TNP-ATP kötésre semmilyen alkalmazott puffer körülmeny között.

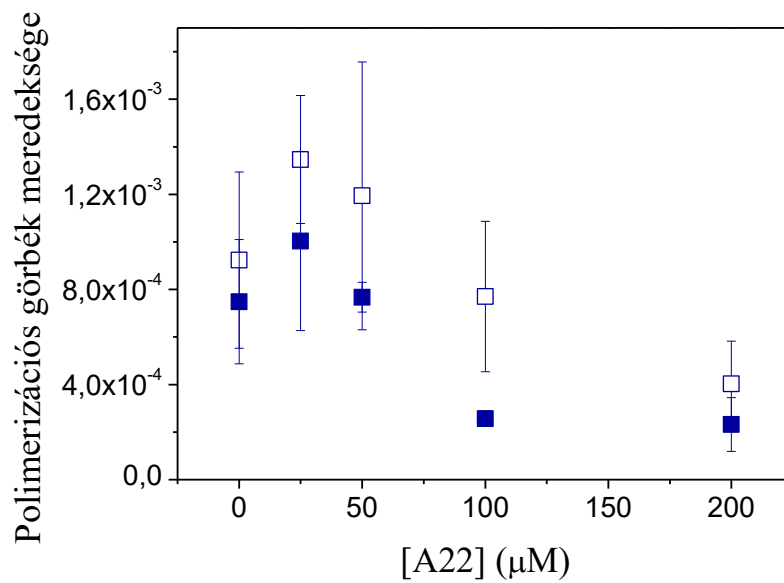
Kompetitív kötődési vizsgálattal bizonyítottuk, hogy az ATP ugyanahhoz a régióhoz kötődik, mint a TNP-ATP (20. ábra). Kísérletünkben azt találtuk, hogy a megkötött TNP-ATP csak körülbelül 35-40%-a szorítható le ATP-vel. A görbe alapján az ATP disszociációs állandója 3,7 μ M.

Eredményeink azt mutatják, hogy az ATP kötési affinitása körülbelül 2 μ M a *Tm*-MreB -hez. Ez az érték jól összhangban van korábbi mérések eredményeivel, ahol azt találták, hogy az ATP szubmikromoláros, vagy alacsony mikromoláros affinitással köt a MreB-hez [44, 76].



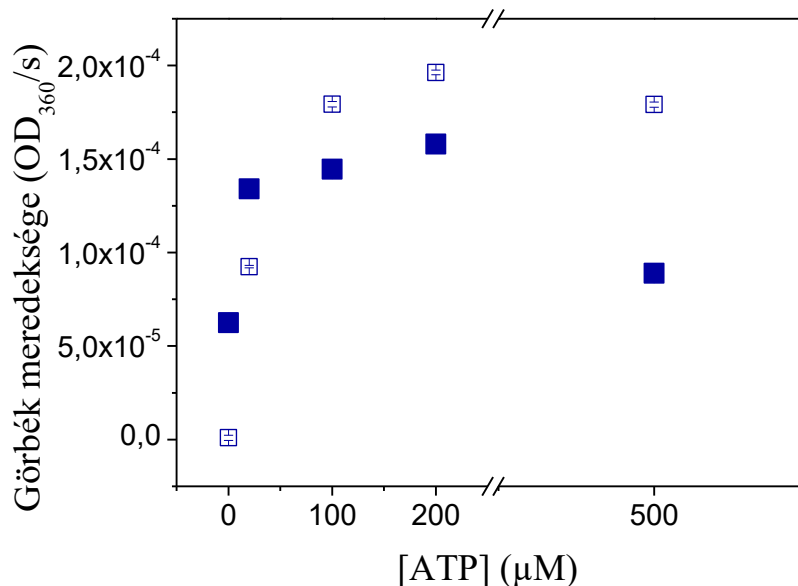
20. ábra: A TNP-ATP fluoreszcencia intenzitás változása növekvő ATP koncentráció hatására.

4.4 Az A22 és vankomicin hatásának leírása



21 ábra: A polimerizációs görbék meredekségét az alkalmazott A22 koncentrációk függvényében ábrázoltuk. (üres szimbólum: 0,2 mM ATP, teli szimbólum: 0,2 mM GTP). A hibásán az átlag szórása.

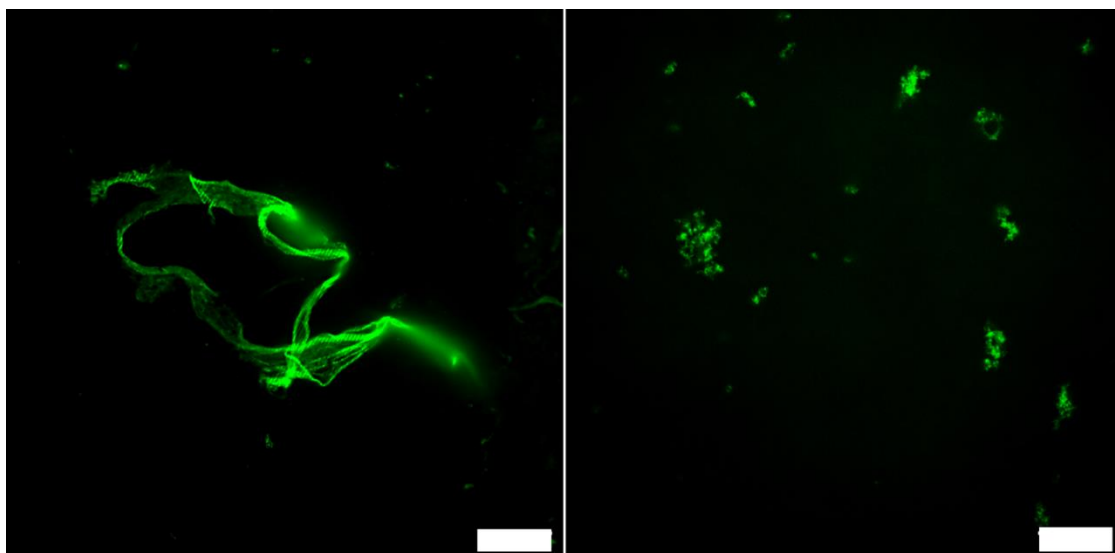
Az A22-nek kétfázisú hatása van a MreB polimerizációjára (21. ábra). 50 μM alatti koncentráción gyorsítja a polimerizáció sebességét, míg e felett gátló hatása érvényesül. A szakirodalom szerint ez az 50 μM ($\sim 10\mu\text{g/ml}$) körülbelül a háromszoros minimális gátlókoncentrációnak felel meg *E. coli* baktériumokra [80]. Viszont A22 kezelések esetén gyakran alkalmazzák ezt a koncentráció értéket [90]. Mivel az A22 baktériumkultúrán végzett kezelések esetén ezt a 3-szoros gátlókoncentrációt találtuk vizsgálatainkban hatásosnak, ezért *in vitro* kísérleteinkben is ezt az 50 μM koncentrációt alkalmaztuk. GTP jelenlétében az A22 gátló hatása még kifejezettebb volt, a polimerizációs görbék meredeksége csökkent.



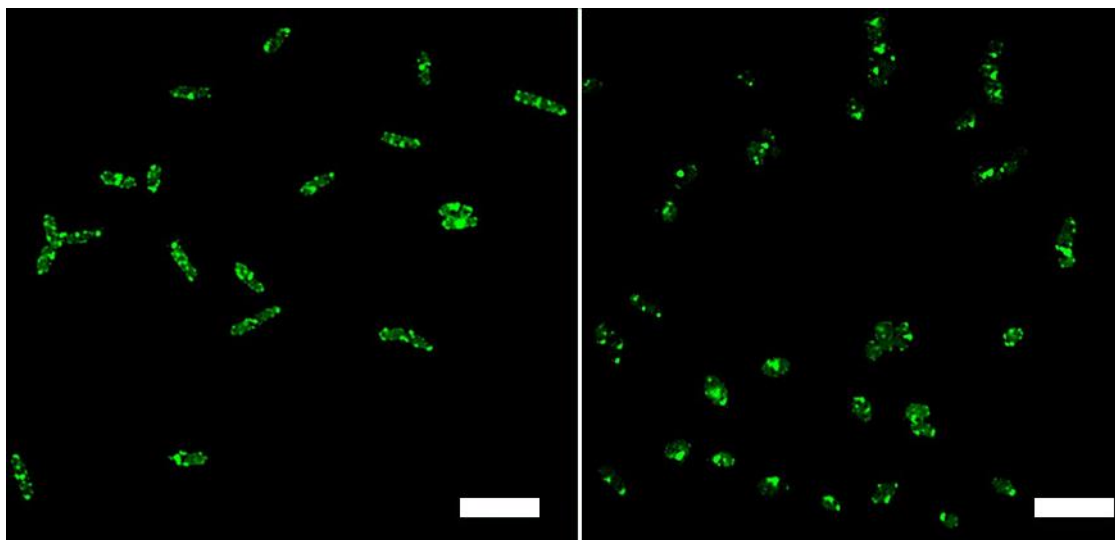
22. ábra: A22 jelenlétében kevesebb foszfát keletkezett. (üres szimbólum: kontroll, teli szimbólum: 50 μM A22)

A szabad foszfát mennyisége a 360 nm-en mért abszorbancia növekedésével arányos. Eredményeink azt mutatják, hogy az OD nőtt az alkalmazott ATP koncentráció emelkedésével, azaz több foszfát hidrolizált (22. ábra). Azonban 200 μM ATP koncentrációnál MreB elért egy maximális értéket és telítésbe került. Hiába alkalmaztunk ennél nagyobb ATP koncentrációt, az inorganikus foszfát mennyisége már nem változott. Az A22 kezelés azonban hatással volt a MreB hidrolizációjára. 50 μM A22 jelenlétében a polimerizációs görbék meredeksége csökkent a kontrollhoz képest, az A22 tehát lassította a MreB-ről az inorganikus foszfát lehasadását.

A MreB-t polimerizáltuk A22-vel, vagy a nélkül. A polimerizációt polimerizáló só (P100) hozzáadásával kezdeményeztük. Polimerizáció után a fehérjét minimális gátlókoncentráció alatti koncentrációban hozzáadott fluoreszcens vankomicinnel jelöltük. A22 nélkül a só hatására hosszú filamentumok keletkeztek, míg A22 kezelés hatására oligomereket, vagy kicsapódott filamentum-szerű képződményeket láttunk a mikroszkópban (23. ábra).

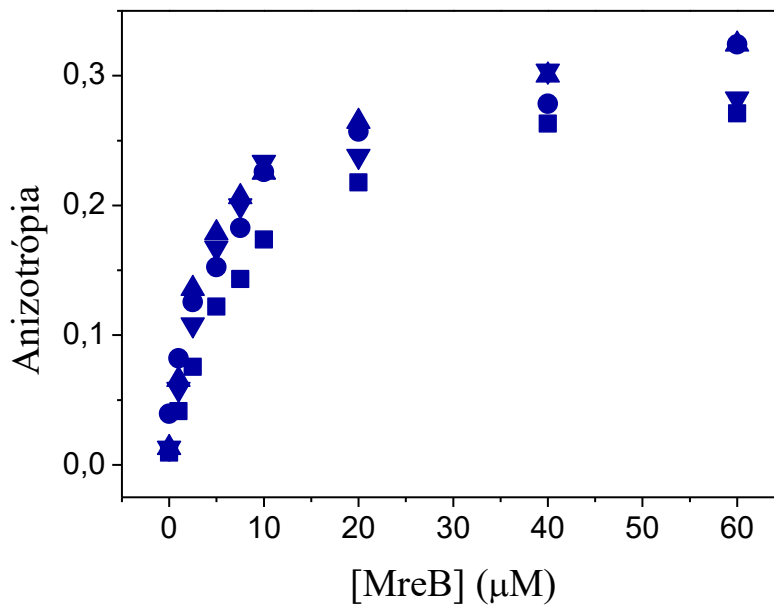


23. ábra: 1 μM fluoreszcens vankomicinnel jelölt MreB. Kontroll (bal) és 100 μM A22 mellett (jobb). Lépték: 10 μm.



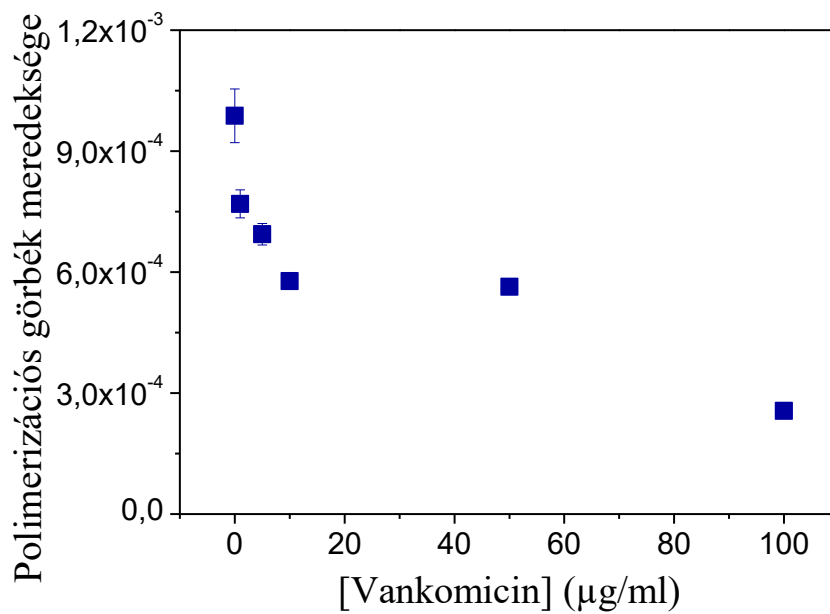
24. ábra: GFP-MreB-t expresszáló E-coli sejtek A22 kezelés hatására, SIM mikroszkóp alatt. Lépték: 10 μm.

E. coli sejtek GFP-MreB expresszióját arabinózzal indukáltuk, majd A22 jelenlétében, vagy a nélkül növesztettük őket 1 órán keresztül, 37 °C-on rázatva. A sejteket ezután agaróz lemezre tettük, hogy megakadályozzuk a mozgásukat, és SIM mikroszkópban néztük. A 24. ábra jobb oldali képén jól látható, hogy a baktériumok az A22 kezelés hatására lekerekedtek, viszont a GFP jel nem delokalizálódott. Tehát nem következett be a MreB depolimerizációja, szétesése, és a GFP-MreB továbbra is a membrán mentén helyezkedett el.



25. ábra: Vankomicin kötődésének vizsgálata steady-state anizotrópia mérésel. (négyzet: kontroll; kör: 0.2 mM ATP; háromszög: só (P100: 4 mM TRIS, 100 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1mM EGTA); fordított háromszög: ATP+só)

Fontos kísérleti eredményünk, hogy a BODIPY-vankomicin képes kötődni a *Tm*-MreB-hez (25. ábra). Fluoreszcencia anizotrópia mérésekben bizonyítottuk, hogy a vankomicin köt a MreB fehérjéhez. A görbék alapján a kötési állandókat is meghatároztuk az alkalmazott pufferkörülmények esetén. A kötési állandó nukleotid mentes MreB esetén $8,329 \pm 0,571 \mu\text{M}$ -nak adódott, ATP kötött MreB esetén $6,894 \pm 0,509 \mu\text{M}$. Ugyanez a paraméter P100 polimerizáló só jelenlétében $5,59 \pm 1,21 \mu\text{M}$, ATP és só együttes alkalmazása mellett $4,048 \pm 0,723 \mu\text{M}$ -nak adódott. Mindez arra utal, hogy a fiziológias körülményekhez legközelebb álló paraméterek esetén a legerősebb a kötés.

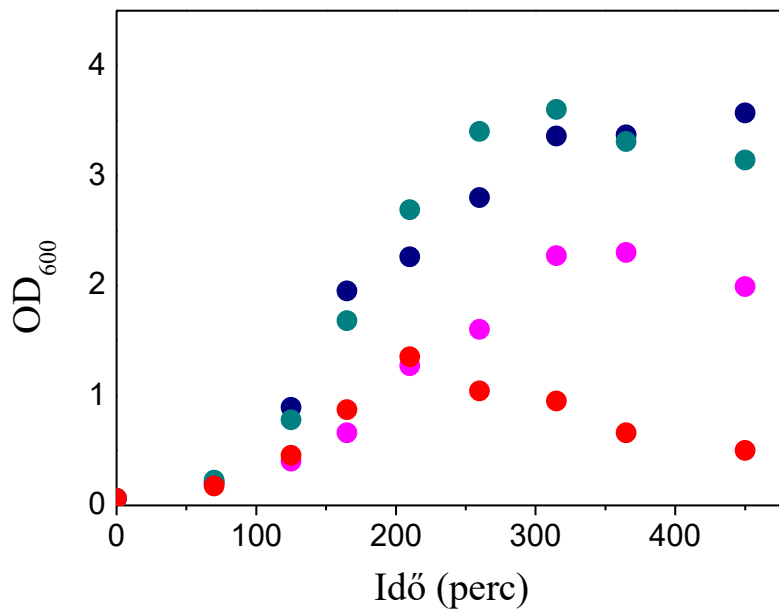


26. ábra: A MreB polimerizációjának alakulása az alkalmazott vankomicin koncentráció hatására.

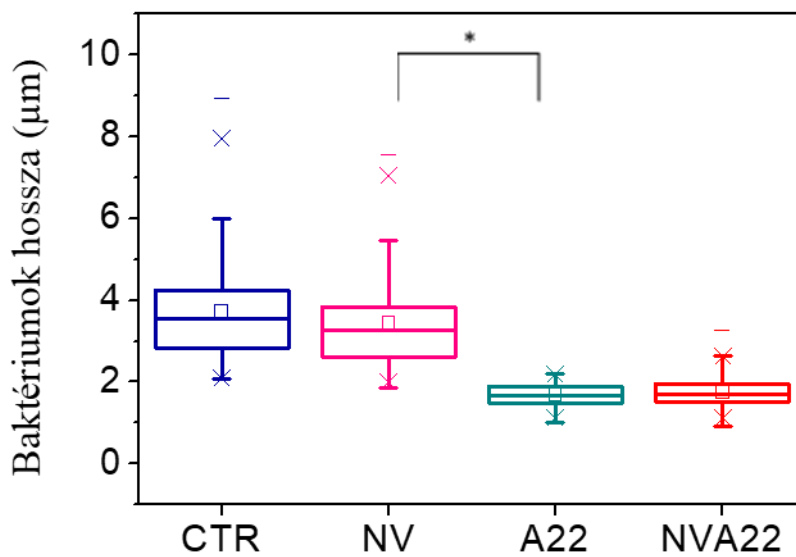
A MreB fehérjét (10 µM) különböző koncentrációjú vankomicin jelenlétében polimerizáltuk, majd a görbék meredekségét a koncentráció függvényében ábrázoltuk. Látható, hogy növekvő vankomicin koncentrációval csökken a polimerizáció sebessége (26. ábra). Az A22-höz hasonlóan a vankomicin lassítja a MreB polimerizációját, jelenlétében a fehérje összeépülése gátolt. 100 µg/ml alkalmazott vankomicin koncentráció már jelentősen befolyásolta a MreB polimerizációját.

Mivel a Gram-negatív baktériumok sejt falán a vankomicin nem képes átjutni, ezért a sejtes mérések során magasabb antibiotikum koncentrációkat kellett alkalmaznunk a kívánt hatás elérése érdekében, mint az *in vitro* mérésekben.

A

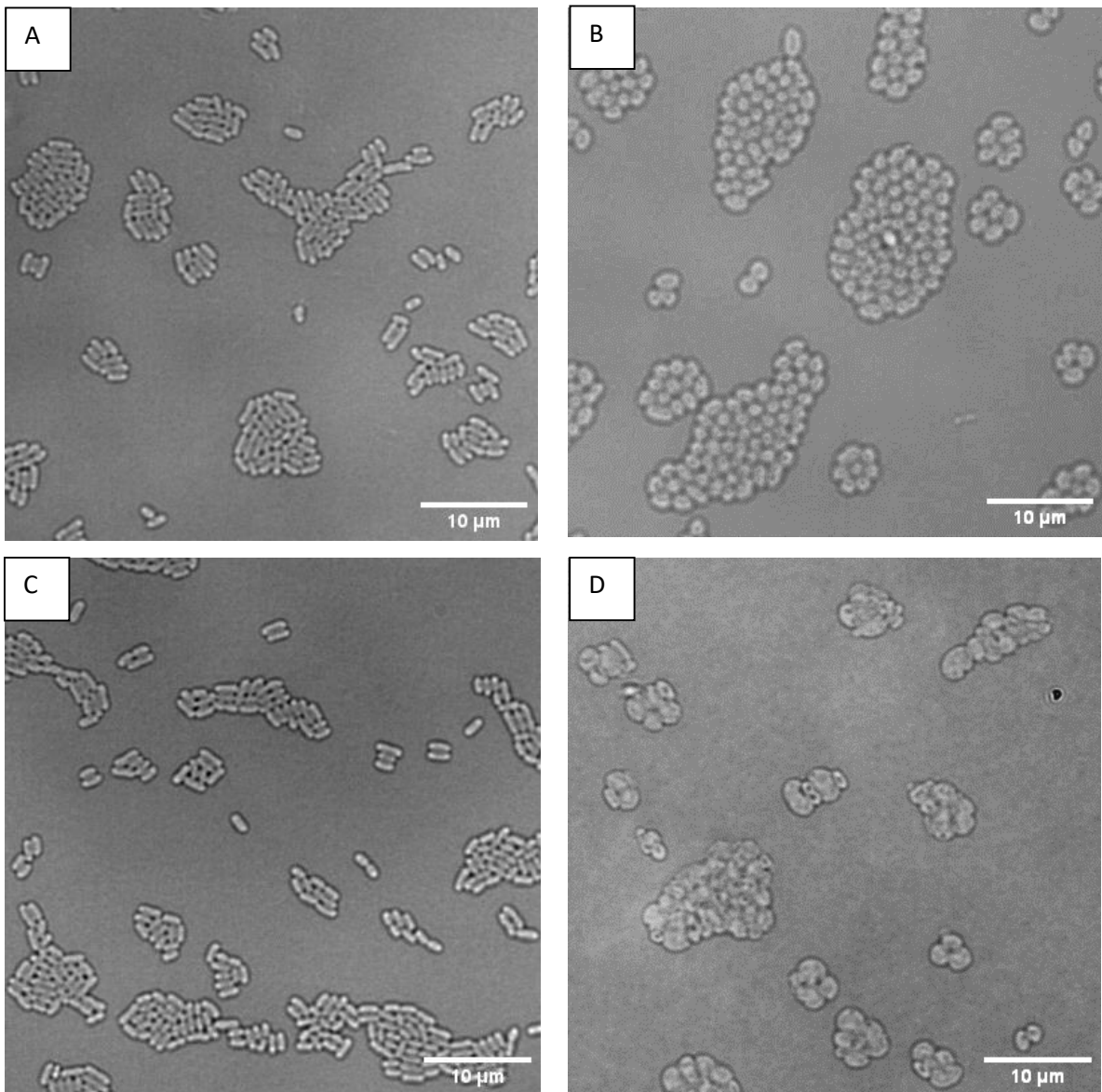


B



27. ábra: *E.coli* sejtek szaporodása A22 és vankomicin kezelés hatására (kék: kontroll, rózsaszín: natív vankomicin, zöld: A22, piros: vankomicin+A22) (CTR: kontroll, NV: natív vankomicin). A: szaporodási görbék a különböző kezelések alkalmazásával. B: Baktériumok sejt hosszának változása az antimikrobiális szerek jelenlétében. $n = 104$. A kis négyzetek az átlagot jelölik, a rövid vonalak a minimum és maximum értékeket. A hibavonal a szórást mutatja.

A két antimikrobiális ágens együttes hatását is vizsgáltuk élő *E. coli* baktériumokon. *E. coli* K-12 sejteket LB tápoldatban 37 °C-on rázattunk. A baktériumokat 100 µg/ml (69 µM) vankomicinnel (NV) vagy 27 µg/ml (100 µM) A22-vel vagy mindkettővel kezeltük. Az A22 a kontroll mintához képest kevésbé gátolta a szaporodást, mint a vankomicin. A vankomicin az alkalmazott koncentráció mellett lassította a sejtek szaporodását, de a két szer együttes kezelésével, egymás hatását felerősítve az antimikrobiális hatás erőteljesebb volt. A baktériumsejteket vankomicin, A22 vagy mindkettő jelenlétében növesztettük. A sejteket ezután mikroszkóp alatt vizsgáltuk, fotókat készítettünk, majd a sejthosszakot ImageJ programmal mértük. Vankomicin hatására a sejtek rövidebbek lettek, de nem szignifikáns a változás. A22 hatására lekerekednek a baktériumok. A két antimikrobiális anyag együttes használata esetén az A22 hatás érvényesült inkább, tehát a sejtek jóval rövidebbek lettek a kontrollhoz képest. Az A22-t tartalmazó populációk szignifikánsan rövidebbek lettek a kontroll, és a csak vankomicint tartalmazó mintákhoz képest. A statisztikához egyutas ANOVA tesztet futtattunk, a szignifikanciaszint ANOVA után végzett Bonferroni-féle korrigált valószínűségi teszt alapján $1,069 \cdot 10^{-38}$ (* $p < 0,001$; $n = 104$).



28. ábra: *E. coli* baktériumok sejthosszának és alakjának változása vankomicin és A22 kezelés hatására. A: kontroll, B: 27 µg/ml A22, C: 100 µg/ml vankomicin, D: mindkettő jelenlétében.

A sejthosszak meghatározásához mikroszkópos méréseinket áteső fényben végeztük, melynek eredményeit a 28. ábra mutatja. Az „A” képen a kontroll minta látható, amelyben a kezeletlen sejtek a várható 3-4 µm-es sejthosszakot érték el. A „B” képen az A22 kezelés hatására a sejtek lekerekedtek, ennél fogva rövidült a hosszanti tengelyük is. A „C” ábrán a vankomicin kezelés eredményeképpen a sejtek rövidebbek lettek, de nem számottevő a változás. A „D” ábrán a sejtek rövidebbnek és kereknek is látszanak. Ebben az esetben az A22 hatása volt a kifejezettebb. Az A22 hatását a vankomicin nem tudta ellensúlyozni, de nem is súlyosbította.

A két vegyület szinergista hatását is szeretnénk volna megvizsgálni, azaz, hogy egymás gátló hatását erősíthetik-e, ahogy a szaporodási tesztekkel erre következtethetünk. Mikrobiológiai tesztekkel megállapítottuk a két antimikrobiális szer MIC₈₀ értékét, tehát azt a legkisebb koncentrációt, ahol több mint 80%-os növekedési gátlást tapasztaltunk (A22: 50 µg/ml, vankomicin: 25 µg/ml). Checkerboard mikrodilúciós esszé segítségével kimutattuk a szinergista hatást a két szer között (3. táblázat).

3. táblázat: Az A22 és vankomicin frakcionális gátló koncentráció értékei különböző kombinációkban. A táblázat középső oszlopában lévő számok mutatják, hogy a két antibiotikumot milyen koncentrációban kell alkalmazni, hogy a szinergista hatás érvényesüljön. A bal oldali számok az A22 koncentrációra vonatkoznak, míg a jobb oldali számok mutatják a vankomicin alkalmazott koncentrációját, µg/ml mennyiségben. A jobb oldali oszlopban ezeknek a kombinációknak a FICI (frakcionális gátló koncentráció) értékei láthatóak.

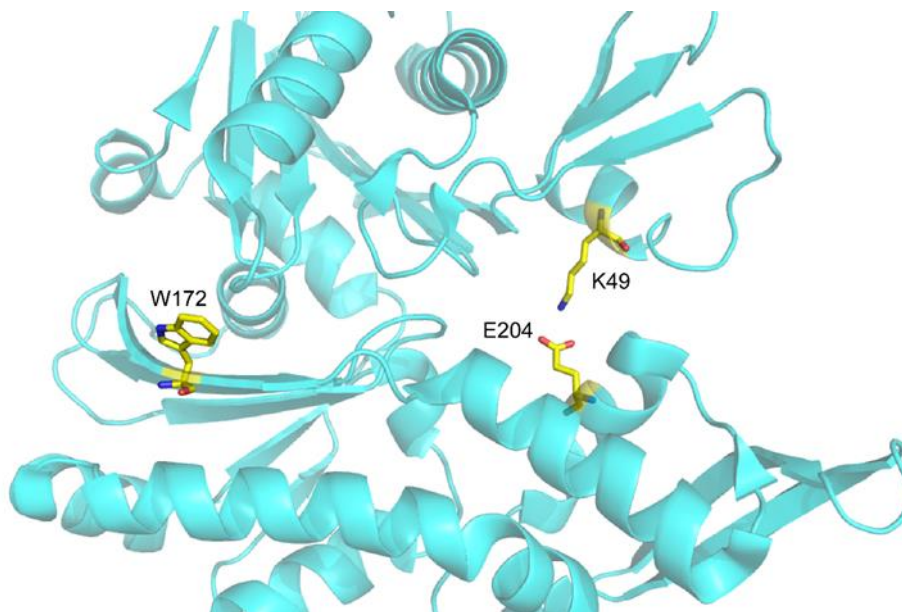
MIC ₈₀ magában (µg/ml)		MIC kombinációban (µg/ml)	FICI
A22 [50]	Van [25]	12,5 + 6,25	0,5
		6,25 + 6,25	0,375
		3,125 + 6,25	0,31
		6,25 + 3,125	0,25
		6,25 + 1,56	0,1875

Összefoglalva, ez az egymást erősítő antimikrobiális hatás öt féle módon létrejöhet a két gátlószer kombinációjában, ami erős szinergizmust feltételez, a két szer egymás növekedésgátló hatását felerősíti.

Érdekes megfigyelés, hogy az A22 Gram- negatív gátlószer, míg a vankomicin Gram-pozitív baktériumokra hat, mert nem tud átjutni a Gram-negatív baktériumok külső membrán rétegén. Viszont az A22 érzékenyebbé teheti a Gram-negatív baktériumokat, úgy, mint az *E. coli* sejtfalát, és így lehetővé teszi a vankomicin bejutását a sejtekbe. Tehát az A22 MreB gátló mechanizmusán alapuló származékai és a vankomicin együttes alkalmazása antibiotikum spektrumbővítéssel egy jó megoldás lehet az antibiotikumrezisztencia megfékezésére.

5. Eredmények megvitatása

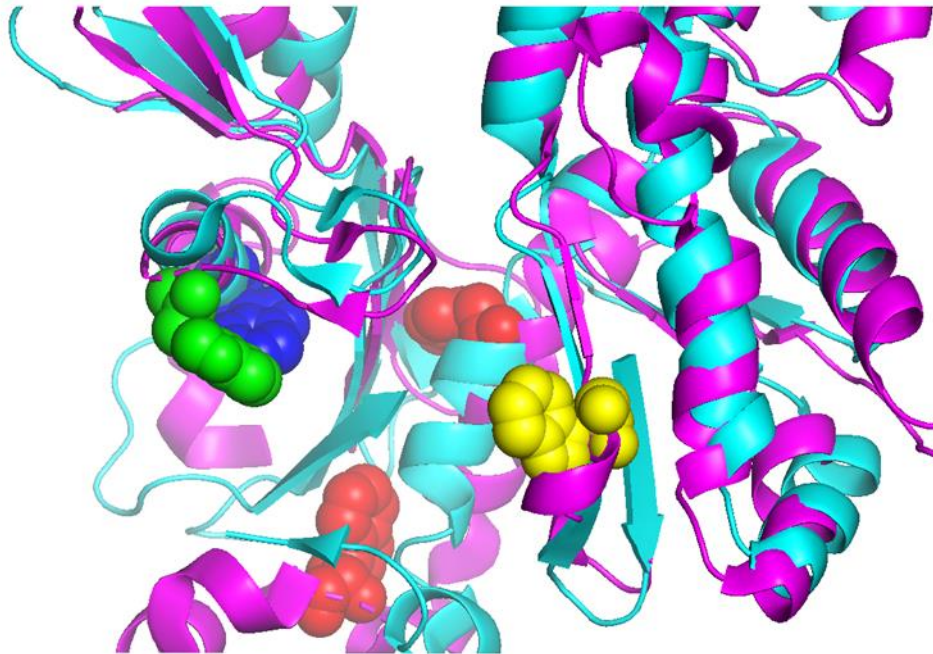
A *Thermotoga maritima* MreB preparálása során egy új módszert alkalmaztunk, amely lehetővé teszi a MreB fehérje natív konformációjának előállítását, és nagy mennyiségű, oldható, tiszta fehérjét eredményez. *E. coli* BL21 ArcticExpress (DE3) rendszerben dolgoztunk. Ez a sejtvonal a natív feltáráshoz előnyös, mivel alacsony hőmérsékleten történik az expresszió (10- 13 °C), így a zárványtestek, azaz a fehérje aggregátumok kialakulásának kisebb az esélye, mint ahogyan azt más, korábban alkalmazott BL21 sejtípusok (DE3; DE3 pLysS, Rosetta) esetén tapasztaltuk. Érdeemes kiemelni, hogy endogéne expresszált chaperon fehérjéket tartalmaz a rendszer, ami biztosítja a fehérje normál feltekeredését, azaz elősegíti a natív konformáció kialakulását az expresszió során.



29. ábra: A *Tm*-MreB (PDB: 1JCG) szerkezeti ábrája, jelölve a K49 lizin és E204 glutaminsavak, amelyek különböző aldoméneken helyezkednek el és közöttük sóhíd jön létre. A W172 triptofán a *Tm*-MreB D-hurokján található.

A sós és sómentes pufferkörnyezetben mért eltérő hőstabilitás oka lehet egy sóhíd kialakulása a molekulán belül. Korábbi megfigyelés, hogy az ellentétes töltésű aminosavak között kialakuló sóhíd stabilizálhatja, vagy akár destabilizálhatja a fehérje szerkezetét [91]. *Thermotoga maritima* esetén sóhíd alakul ki a K49-es és E204-es aminosavak között [5] (29. ábra). Mivel az egyik aminosav ezek közül a *Tm* - MreB D-hurokján található, fontos szerepe lehet a polimerizáció során bekövetkező konformációváltozásban. Véleményünk szerint a sejtlízis és a kezdeti tisztítási lépések során a NaCl-nak *Tm*-MreB szerkezet stabilizáló szerepe van, azonban a sóhíd kialakulását meggátolja. A NaCl eltávolításával a sóhidak

kialakulása lehetővé válik, ami megnöveli a szerkezeti stabilitást, oldhatóvá teszi a fehérjét, és növeli a termikus stabilitást. Ezt a sóhid által kiváltott termikus stabilitás növekedést más hőmérséklettűrő fehérjék esetén is leírták [60]. Másrészt a MreB-nek is vélhetően más kötőpartnerei is vannak, amik stabilizálják a fehérjét a citoplazmán belül.



30. ábra: A triptofán elhelyezkedése a *Tm-MreB*-n és a vázizom aktinon belül. A nyúl vázizom alfa-aktin monomerje (PDB: 1NWK) lila, a *Tm-MreB* (PDB: 1JCG) türkiz színnel. (zöld: aktin Trp-79, kék: aktin Trp-86, pirosak: aktin belső triptofánjai, sárga: *Tm-MreB* triptofán aminosava.)

A *Tm-MreB* termális denaturációja során nem figyelhető meg az aktin esetében spektrális eltolódás a triptofán fluoreszcencia emissziós hullámhosszában a vörös hullámhosszak irányába. Ennek magyarázata lehet, hogy a *Tm-MreB* egyetlen triptofán aminosava az aktin négy triptofánjától eltérő helyen lokalizálódik a molekulában, az oldószer számára jobban kitett. Emiatt a *Thermotoga maritima* MreB esetében a hődenaturáció által kiváltott konformáció változás nem okoz spektrális eltolódást, csak fluoreszcencia intenzitás csökkenést. Érdekes megfigyelés, hogy kémiai denaturáció során ugyanez a fehérje, illetve ugyanennek az aminosavnak a lokális környezete máshogyan változik meg, mint hő hatására. Ebben az esetben ugyanis megfigyelhető volt a vörös eltolódás. Ebből arra következtethetünk, hogy a kémiai denaturáció és a termális denaturáció másfajta konformációváltozást okoz a *Tm-MreB* fehérjén. A kémiai kezelés hatására a fehérje triptofánjának környezete nagyobb mértékben változik meg.

Korábban leírták, hogy az eukarióta aktin négy triptofánja eltérően járul hozzá az aktin belső fluoreszcencia intenzitásához [92]. Az aktin Trp-79 triptofán aminosava zöld színnel látható a

30. ábrán, ez a leginkább hozzáférhető az oldószer számára az aktin másik három triptofán aminosavához képest. Az aktin Trp-86-ja, amelyet többnyire cisztein és metionin árnyékolja, kék színű, a többi belső triptofán pedig piros. A *Tm*-MreB egyetlen triptofánjának helyzete sárga színnel van jelölve az ábrán, látható, hogy az aktin triptofán aminosavaitól elkülönülten helyezkedik el.

A nem hidrolizáló ATP analóg, a TNP-ATP alkalmasnak bizonyult a *Tm*-MreB nukleotid kötődésének leírására. Termikus denaturálási vizsgálatainkat alátámasztva, ahol a sómentes környezetben a *Tm*-MreB stabilabb konformációját találtuk, azt is megállapítottuk, hogy sómentes körülmények között a *Tm*-MreB erősebben köti meg a TNP-ATP-t, mint magas koncentrációjú egyértékű ionok jelenlétében. Másrészt azt találtuk, hogy a MreB-specifikus gátlószer, az A22 semmilyen körülmények között nem gátolja a TNP-ATP kötődését a MreB-hez. Végül arra a következtetésre jutottunk, hogy az ATP és a TNP-ATP versengenek egymással. Az ATP 2 μ M-os affinitása a *Tm*-MreB-hez viszonylag gyenge kötést jelent, feltételezhető, hogy a citoplazmában más faktorok vagy kötőpartnerek javíthatják ezt.

Mikroszkópos vizsgálataink azt mutatták, hogy A22 jelenlétében a monomereknél nagyobb egységek keletkeznek, aggregálódhat, vagy kicsapódhat a fehérje. Ezek a struktúrák nem mondhatók filamentumoknak, mint a polimerizáló só jelenlétében képződő fehérjeszálak esetén.

Megvizsgálva az A22 polimerizációra gyakorolt hatását, kijelenthetjük, hogy az A22 alacsony koncentrációját alkalmazva gyorsítja a fehérje összeépülést, elősegíti azt, 50 μ M felett azonban gátló hatása érvényesül, és lassítja a polimerizációt. Meggátolja az inorganikus foszfát lehasadást az ATP hidrolizációja után. Véleményünk szerint az A22 egy ADP kötött állapotot tarthat fenn a MreB-n, ezzel a fehérje nem tudja elvégezni a sejtalakmegtartó funkcióját a sejten belül. A fehérje tehát elkezd összeépülni, oligomereket alkotni, ahogy a mikroszkópos és szedimentációs tesztek is alátámasztották. Azonban ez nem a MreB megfelelő, natív állapota a sejten belül. Ennek következtében a baktériumsejtek lekerekednek, elvesztik a pálcika alakjukat, végső soron pedig lizálnak, elpusztulnak.

Vankomicin tekintetében megállapítottuk, hogy a fluoreszcens vankomicin képes kötődni a fehérjéhez, *in vitro*. Fluoreszcens vankomicint korábban csak élő sejteknél alkalmazták. Leírtuk, hogy különböző körülmények között milyen affinitással köt a BODIPY-vankomicin a *Tm*-MreB-hez. Ezek a kötési arányok (4-8 μ M) szintén gyengének mondhatók, ahogy TNP-ATP esetén is. További vizsgálatok vannak folyamatban annak megállapításra, hogy ez a kötés specifikus lehet-e. A vankomicin az A22-höz hasonlóan két fázisban befolyásolja a MreB polimerizációját: minimális gátló koncentráció alatt gyorsítja, felette lassítja azt.

A két antimikrobiális hatóanyag együttes használata esetén az *E. coli* baktériumok szaporodása jobban gátolt, mint amikor külön alkalmaztuk csak az egyik, vagy másik vegyületet. Vankomicin kezelés hatására a sejtek valamivel rövidebbek lettek a kontrollhoz képest, A22 kezelés hatására azonban a sejtek lekerekedtek, és szignifikánsan rövidültek. A két vegyületet együtt alkalmazva az A22 hatása volt a kiemelkedőbb, nagyságrendileg az A22 kezeléssel egyező sejtméreteket találtunk. Ezekből az eredményeinkből arra következtettünk, hogy a vankomicin és A22 közt egy szinergista hatás állhat fent, azaz egymás antimikrobiális hatását erősíthetik. A checkerboard esszé pedig egy igen erőteljes szinergizmust mutatott a két vegyület között. Az A22-nek csak a Gram-negatív baktériumokra van antimikrobiális hatása, a Gram-pozitívokra nagyon magas, vagy egyáltalán nem meghatározható a MIC értéke. Ezzel szemben a vankomicin egy Gram-pozitív baktériumokra ható antibiotikum. Kísérleteinkben mégis sikerült a Gram-negatív *E. coli*-ra jelentős hatást kifejtenie a vankomicinnek. Vélhetően az A22 kezelés hatására a MreB fehérje funkciójának gátlása révén a Gram-negatív baktérium sejtfa meggyengül, így be tud jutni a sejtbe a Gram-pozitív baktériumokra ható antibiotikum is. Ez tehát egy új útja lehet a baktériumrezisztencia megakadályozásának, a baktériumok már meglévő antibiotikumokra való érzékenyítésének.

6. Következtetések

A MreB kutatása kulcsfontosságú lehet az antibiotikumrezisztencia megfékezésében. Mivel ez a fehérje a baktériumokban létfontosságú, hiányában a sejtek életképtelenek. A MreB kromozómán kódolt, tehát a sejtek nem tudják az esetlegesen kifejllesztett rezisztenciát átadni egymásnak, mint a plazmidon kódolt gének esetén, azonban más módon is kifejeződhet rezisztencia, mondjuk inaktiváló enzim formájában. Ezeket figyelembe véve fontos, hogy megértsük a fehérje molekuláris, biokémiai szintű működését, hogy megtaláljuk a gyenge pontjait. A baktériumok nagyon gyorsan képesek a rezisztenciát új antibiotikummal szemben kialakítani, ezért is érdemes az eddig ismertektől eltérő megküzdési útvonalakat találni, és például a MreB-re közvetlenül ható antimikrobiális vegyületet vizsgálni. Egy másik megküzdési mód lehet, ha az antibiotikumokat kombináltan alkalmazzuk. A Gram-negatív baktériumok komplexebb sejtfa nagyon ellenálló a külső behatásokkal szemben, gátolja a molekulák bejutását. Irodalmi adatok azt mutatják, hogy a különböző vegyületek meglévő antibiotikumokkal történő szinergista hatása lehetővé teheti a rezisztencia csökkentését, kialakulásának megakadályozását. A Gram-negatív baktériumok külső membránját roncsoló, megzavaró vegyületek hozzájárulnak ahhoz, hogy a Gram-pozitívokra ható antibiotikum bejuthasson a sejtbe [93]. Kutatásunkban egy olyan megközelítési módot tártunk fel, ahol egy bakteriosztatikus vegyület képes lehet annyira meggyengíteni a Gram-negatív baktérium sejtfaát, hogy ezáltal egy új, eddig csak Gram-pozitívokra hatásosnak vélt szer is képes legyen bejutni, és a baktériumon belül az antibakteriális útvonalakat elindítsa, végül elpusztítsa.

Munkánk eredményeit a következőkben foglalom össze:

- Sikerült egy olyan tisztítási protokollt kidolgozni, ami nagy mennyiségű, tiszta és oldható natív konformációjú *Tm*-MreB fehérjét eredményezett, ami funkcionálisnak bizonyult.
- Meghatároztuk a fehérje hődenaturációs értékeit sós és sómentes környezetben, ATP jelenlétében, vagy anélkül.
- Megállapítottuk, hogy a *Tm*-MreB ATP jelenlétében, illetve sómentes pufferben stabilabb. Viszont az imidazol elvonás miatt szükséges egy magas sós pufferben történő tisztítási lépést beiktatni.
- A K49-es és E204-es aminosav között kialakuló sóhid stabilizálja a *Tm*-MreB-t. Kémiai denaturáció során megfigyeltük a MreB triptofánja emissziós maximumának hosszabb hullámhossz tartományba történő eltolódását. Ez arra utal, hogy kémiai denaturáció

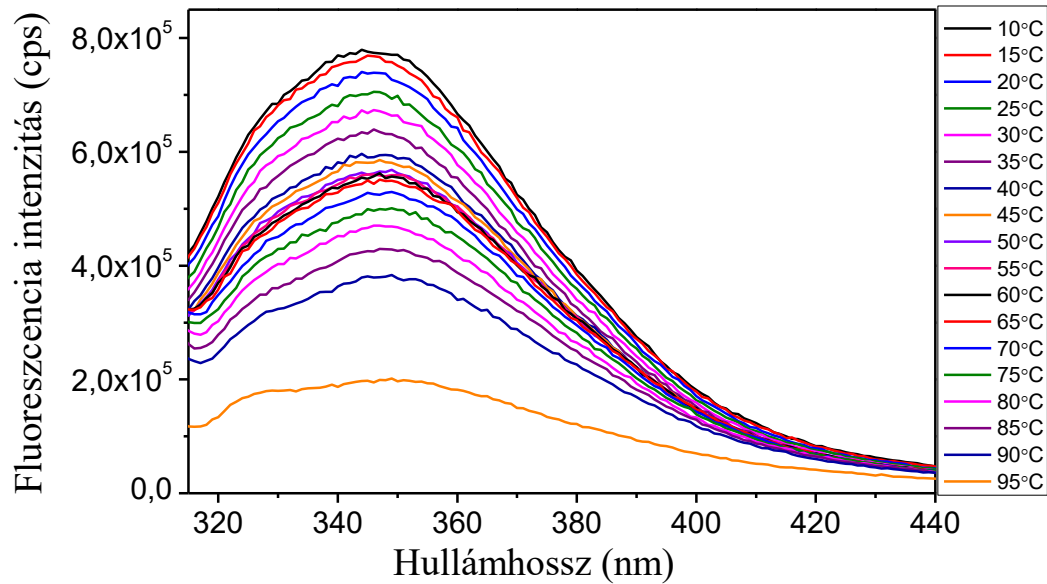
során a triptofán környezete polárosabbá válik, feltételezhetően a víz számára jobban hozzáférhetőbb, kitettebb lesz.

- Hődenaturáció esetén nem figyeltük meg ezt a jelenséget, amiből arra következtetünk, hogy a *Tm*-MreB konformációváltozása eltérő a kémiai és a hődenaturáció során.
- Meghatároztuk a TNP-ATP és az ATP kötési affinitását *Tm*-MreB-hez, ami 3,7, illetve 2 μM -nak adódott. Ezek jól illeszkednek a korábban, más MreB fehérjék esetében leírtakhoz [44, 76]. Megállapítottuk, hogy a TNP-ATP-t a *Tm*-MreB sómentes környezetben nagyobb affinitással köti.
- Fényszóráson alapuló vizsgálataink szerint a nukleotidok nem befolyásolják a polimerizáció sebességét.
- Az A22 nem befolyásolja a nukleotidkötést, a TNP-ATP kötődését sem. Alacsony koncentráción gyorsítja a fehérje polimerizációját, magas koncentráción gátolja azt. Meggátolja az inorganikus foszfát lehasadását.
- Az A22 polimerizáló só mellett oligomereket, vagy aggregátumokat hoz létre, ennek tisztázása még előttünk áll. Azonban biztos, hogy megzavarja a MreB természetes összeépülésének folyamatát. Kísérleteink alapján úgy gondoljuk, hogy az A22 egy ADP-kötött állapotot hoz létre, ami miatt a MreB nem képes ellátni a sejtalakmegtartó funkcióját a sejtekben.
- Munkánk újabb megállapítása, hogy a fluoreszcens vankomicin képes kötődni a MreB-hez, a kötési állandókat különböző só- és nukleotid környezetben is meghatároztuk. A vankomicin $8,329 \pm 0,571 \mu\text{M}$ affinitással köt a MreB-hez, ATP kötött MreB esetén $6,894 \pm 0,509 \mu\text{M}$ -nak adódott a kötési állandó. Polimerizáló só jelenlétében $5,59 \pm 1,21 \mu\text{M}$, ATP és só mellett pedig $4,048 \pm 0,723 \mu\text{M}$ volt a vankomicin kötési állandója. A MreB polimerizációját az A22-höz hasonlóan kétfázisos módon befolyásolja.
- Az *E. coli* baktériumok szaporodását a vankomicin jobban gátolta, mint az A22, viszont a két antibiotikumot együtt alkalmazva a gátló hatás erőteljesebb volt. Mindkét vegyület hatással volt a sejtek hosszára is, azonban az A22 jelenlétében szignifikánsan rövidebbek, kerekesebbek lettek a sejtek.
- Mikrobiológiai esszéekkel bizonyítottuk, hogy a két antimikrobiális vegyület közt szinergista hatás van, ennek mértékét a FICI értékekkel jellemeztük. A két antimikrobiális ágens különböző kombinációit alkalmazva a következő koncentráció értéket kaptuk: $0,5 \mu\text{g/ml}$; $0,375 \mu\text{g/ml}$; $0,31 \mu\text{g/ml}$; $0,25 \mu\text{g/ml}$ és $0,1875 \mu\text{g/ml}$. Ezek

alapján egy erős szinergista hatásra következtethetünk, az antimikrobiális szerek egymás hatását felerősítik.

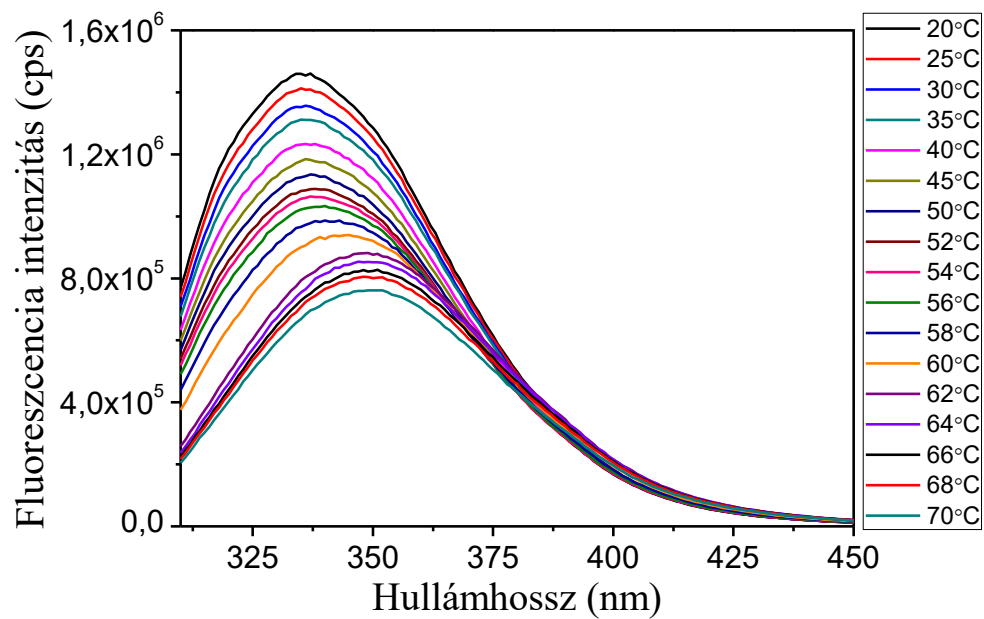
7. Mellékletek

1. számú melléklet



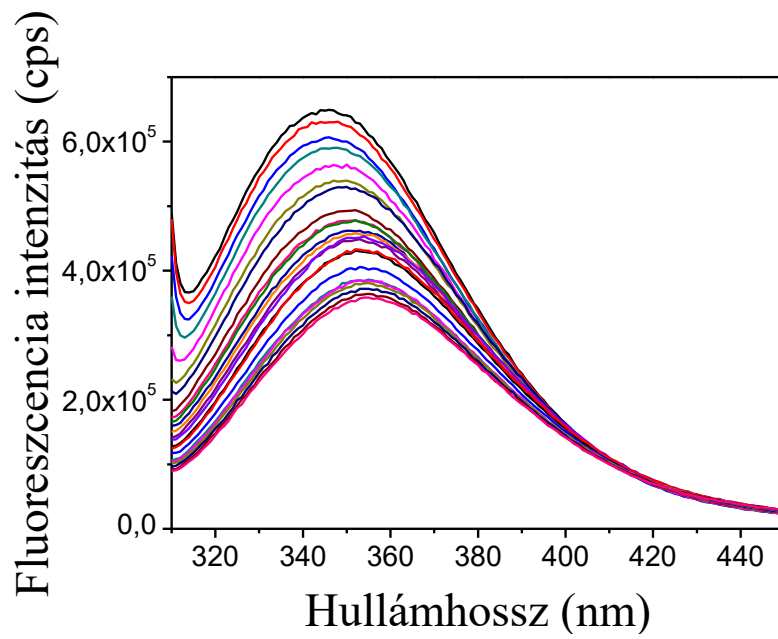
31. ábra: A *Tm-MreB* termikus denaturálása. A triptofán fluoreszcencia intenzitása csökken a hőmérséklet emelkedésével. Az olvadásponton a fluoreszcencia intenzitásváltozása csökken. Sómentes körülmények esetén 2 mM ATP jelenlétében magas hőmérsékleten, 90-95 °C között figyelhető meg ez az intenzitás csökkenés.

2. számú melléklet



32. ábra: A nyúl csontváz alfa-aktinjának termikus denaturálása. Az aktint ugyanabban a pufferben vizsgáltuk, mint a *Tm-MreB*-t. A fluoreszcencia intenzitás csökkenése mellett olvadáskor vöröselölődés is megfigyelhető.

3. számú melléklet



33. ábra: A Tm-MreB kémiai denaturálása. A triptofán fluoreszcencia intenzitása a guanidin-hidroklorid koncentrációjának növekedésével csökken, és erős vöröseltolódás figyelhető meg.

8. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, *Prof. Dr. Nyitrai Miklós* egyetemi tanárnak, a PTE ÁOK dékánjának, hogy lehetővé tette számomra, hogy intézetében végezzem a kutatásaimat, és szakmailag támogatott.

Hálásan köszönöm *Dr. Huberné Dr. Barkó Szilvia* egyetemi adjunktusnak, aki a mindennapokban irányította a kutatásomat, lelkiismeretesen egyengette doktori tanulmányaimat. Témavezetésével kutatói példamutatásából tanulhattam és emberileg is sokat köszönhetek neki.

Külön köszönetemet szeretném kifejezni *Dr. Lukács Andrásnak*, a Biofizikai Intézet igazgatójának, aki a fluoreszcencia mérésekben nyújtott nagy segítséget, és tudományos ötleteivel támogatta doktori értekezésem elkészültét.

Dr. Bódis Emőkének, Dr. Szatmári Dávidnak és Dr. Ujfalusi Zoltánnak szeretném köszönetemet kifejezni, amiért tudományos tanácsaikkal és a kísérletek gyakorlati megvalósításában segítették Ph.D. munkám elkészültét.

Köszönetet mondok *Dr. Gazdag Zoltánnak*, a PTE TTK egyetemi docensének a mikrobiológiai mérésekben nyújtott szakmai segítségéért.

Brunner Jánosnének, Garajszkyné Papp Erzsébetnek és Hoffmanné Simon Évának a laborban nyújtott mindennapi segítségüket szeretném megköszönni, továbbá köszönetet mondok a *Biofizikai Intézet minden munkatársának*, akikhez kérdéseimmel bármikor bátran fordulhattam.

Végül, de nem utolsó sorban, szeretném hálámat kifejezni *férjemnek, családomnak, és barátaimnak*, akik végig mellettem álltak, és türelemmel, szeretettel támogattak.

9. Irodalomjegyzék

- [1] G. Fink, A. Szewczak-Harris, and J. Löwe, “SnapShot: The Bacterial Cytoskeleton,” *Cell*, vol. 166, no. 2, pp. 522-522.e1, 2016.
- [2] R. Carballido-López, “The bacterial actin-like cytoskeleton,” *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 70, no. 4, pp. 888–909, 2006.
- [3] P. De Boer, R. Crossley, and L. Rothfield, “The essential bacterial cell-division protein FtsZ is a GTPase,” *Nature*, vol. 359, no. 6392, pp. 254–256, 1992.
- [4] L. J. F. Jones, R. Carballido-López, and J. Errington, “Control of cell shape in bacteria: Helical, actin-like filaments in *Bacillus subtilis*,” *Cell*, 2001.
- [5] F. van den Ent, L. a Amos, and J. Löwe, “Prokaryotic origin of the actin cytoskeleton.,” *Nature*, vol. 413, no. 6851, pp. 39–44, Sep. 2001.
- [6] R. B. Jensen and K. Gerdes, “Partitioning of plasmid R1. The ParM protein exhibits ATPase activity and interacts with the centromere-like ParR-parC complex,” *J. Mol. Biol.*, vol. 269, no. 4, 1997.
- [7] A. Komeili, Z. Li, D. K. Newman, and G. J. Jensen, “Magnetosomes Are Cell Membrane Invaginations Organized by the Actin-Like Protein MamK,” *Science (80-.),*, vol. 311, no. 5758, pp. 242–246, 2006.
- [8] J. W. Shaevitz and Z. Gitai, “The structure and function of bacterial actin homologs.,” *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2010.
- [9] N. Ausmees, J. R. Kuhn, and C. Jacobs-Wagner, “The bacterial cytoskeleton: An intermediate filament-like function in cell shape,” *Cell*, vol. 115, no. 6, pp. 705–713, Dec. 2003.
- [10] K. Emami *et al.*, “RodA as the missing glycosyltransferase in *Bacillus subtilis* and antibiotic discovery for the peptidoglycan polymerase pathway,” *Nat. Microbiol.*, vol. 2, 2017.
- [11] S. W. Chiu, S. Y. Chen, and H. C. Wong, “Dynamic localization of MreB in *Vibrio parahaemolyticus* and in the ectopic host bacterium *Escherichia coli*,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 74, no. 21, pp. 6739–6745, 2008.
- [12] K. K. Busiek and W. Margolin, “Bacterial actin and tubulin homologs in cell growth

- and division,” *Curr. Biol.*, vol. 25, no. 6, pp. R243–R254, 2015.
- [13] J. Dominguez-Escobar, A. Chastanet, A. H. Crevenna, V. Fromion, R. Wedlich-Soldner, and R. Carballido-Lopez, “Processive Movement of MreB-Associated Cell Wall Biosynthetic Complexes in Bacteria,” *Science (80-.)*, vol. 333, no. July, pp. 225–228, 2011.
- [14] M. T. Swulius and G. J. Jensen, “The helical mreB cytoskeleton in *Escherichia coli* MC1000/pLE7 is an artifact of the N-terminal yellow fluorescent protein tag,” *J. Bacteriol.*, 2012.
- [15] A. Chastanet and R. Carballido-Lopez, “The actin-like MreB proteins in *Bacillus subtilis*: A new turn,” *Front. Biosci. - Sch.*, vol. 4 S, no. 4, 2012.
- [16] A. Formstone and J. Errington, “A magnesium-dependent mreB null mutant: Implications for the role of mreB in *Bacillus subtilis*,” *Mol. Microbiol.*, vol. 55, no. 6, pp. 1646–1657, 2005.
- [17] R. Carballido-López and J. Errington, “The bacterial cytoskeleton: In vivo dynamics of the actin-like protein Mbl of *Bacillus subtilis*,” *Dev. Cell*, vol. 4, no. 1, 2003.
- [18] Y. Kawai, K. Asai, and J. Errington, “Partial functional redundancy of MreB isoforms , MreB , Mbl and MreBH , in cell morphogenesis of *Bacillus subtilis*,” vol. 73, no. July, pp. 719–731, 2009.
- [19] M. Doi *et al.*, “Determinations of the DNA sequence of the mreB gene and of the gene products of the mre region that function in formation of the rod shape of *Escherichia coli* cells,” *J. Bacteriol.*, vol. 170, no. 10, pp. 4619–4624, 1988.
- [20] M. Wachi, M. Doi, Y. Okada, and M. Matsushashi, “New mre genes mreC and mreD, responsible for formation of the rod shape of *Escherichia coli* cells,” *J. Bacteriol.*, vol. 171, no. 12, pp. 6511–6516, 1989.
- [21] F. Ishino *et al.*, “Peptidoglycan synthetic activities in membranes of *Escherichia coli* caused by overproduction of penicillin-binding protein 2 and RodA protein,” *J. Biol. Chem.*, vol. 261, no. 15, 1986.
- [22] W. Vollmer, D. Blanot, and M. A. De Pedro, “Peptidoglycan structure and architecture,” *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 32, no. 2. 2008.

- [23] F. Van Den Ent, C. M. Johnson, L. Persons, P. De Boer, and J. Löwe, “Bacterial actin MreB assembles in complex with cell shape protein RodZ,” *EMBO J.*, vol. 29, no. 6, 2010.
- [24] R. M. Morgenstein, B. P. Bratton, J. P. Nguyen, N. Ouzounov, J. W. Shaevitz, and Z. Gitai, “RodZ links MreB to cell wall synthesis to mediate MreB rotation and robust morphogenesis,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 112, no. 40, 2015.
- [25] D. T. Kysela, A. M. Randich, P. D. Caccamo, and Y. V. Brun, “Diversity Takes Shape: Understanding the Mechanistic and Adaptive Basis of Bacterial Morphology,” *PLoS Biol.*, vol. 14, no. 10, 2016.
- [26] T. Kruse, J. Bork-Jensen, and K. Gerdes, “The morphogenetic MreBCD proteins of *Escherichia coli* form an essential membrane-bound complex,” *Mol. Microbiol.*, vol. 55, no. 1, 2005.
- [27] S. van Teeffelen *et al.*, “The bacterial actin MreB rotates, and rotation depends on cell-wall assembly,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 108, no. 38, pp. 15822–15827, 2011.
- [28] P. V. Olshausen, H. J. Defeu Soufo, K. Wicker, R. Heintzmann, P. L. Graumann, and A. Rohrbach, “Superresolution imaging of dynamic MreB filaments in *B. subtilis* - A multiple-motor-driven transport?,” *Biophys. J.*, vol. 105, no. 5, 2013.
- [29] Z. Gitai, N. A. Dye, A. Reisenauer, M. Wachi, and L. Shapiro, “MreB actin-mediated segregation of a specific region of a bacterial chromosome,” *Cell*, 2005.
- [30] Y. Li, K. Sergueev, and S. Austin, “The segregation of the *Escherichia coli* origin and terminus of replication,” *Mol. Microbiol.*, vol. 46, no. 4, 2002.
- [31] C. D. Webb *et al.*, “Bipolar localization of the replication origin regions of chromosomes in vegetative and sporulating cells of *B. subtilis*,” *Cell*, vol. 88, no. 5, 1997.
- [32] J. Lutkenhaus and S. G. Addinall, “Bacterial cell division and the Z ring,” *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 66, 1997.
- [33] E. Quardokus, N. Din, and Y. V. Brun, “Cell cycle regulation and cell type-specific localization of the FtsZ division initiation protein in *Caulobacter*,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 93, no. 13, 1996.

- [34] Z. Gitai, N. Dye, and L. Shapiro, “An actin-like gene can determine cell polarity in bacteria,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 101, no. 23, 2004.
- [35] T. Kruse, J. Møeller-Jensen, A. Løbner-Olesen, and K. Gerdes, “Dysfunctional MreB inhibits chromosome segregation in *Escherichia coli*,” *EMBO J.*, vol. 22, no. 19, 2003.
- [36] H. J. Defeu Soufo and P. L. Graumann, “Actin-like Proteins MreB and Mbl from *Bacillus subtilis* Are Required for Bipolar Positioning of Replication Origins,” *Curr. Biol.*, vol. 13, no. 21, 2003.
- [37] R. M. Figge, A. V Divakaruni, and J. W. Gober, “MreB, the cell-shape determining bacterial actin homolog, coordinates cell wall morphogenesis in *Caulobacter crescentus*,” *Genomics*, vol. 51, pp. 1–47, 2004.
- [38] Y.-L. Shih, T. Le, and L. Rothfield, “Division site selection in *Escherichia coli* involves dynamic redistribution of Min proteins within coiled structures that extend between the two cell poles,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 100, no. 13, pp. 7865–7870, 2003.
- [39] D. Szatmári *et al.*, “Intracellular ion concentrations and cation-dependent remodelling of bacterial MreB assemblies,” *Sci. Rep.*, vol. 10, no. 1, 2020.
- [40] G. J. . Bean and K. J. Amann, “Polymerization properties of the *T. Maritima* actin, MreB: Roles of temperature, nucleotides and ions,” *Biochemistry*, vol. 47, no. 2, pp. 826–835, 2009.
- [41] P. Nurse and K. J. Marians, “Purification and characterization of *Escherichia coli* MreB protein,” *J. Biol. Chem.*, vol. 288, no. 5, 2013.
- [42] J. A. Mayer and K. J. Amann, “Assembly properties of the *Bacillus subtilis* actin, MreB,” *Cell Motil. Cytoskeleton*, vol. 66, no. 2, pp. 109–118, Feb. 2009.
- [43] A. Gaballah, A. Kloeckner, C. Otten, H. G. Sahl, and B. Henrichfreise, “Functional analysis of the cytoskeleton protein MreB from *Chlamydomonas reinhardtii*,” *PLoS One*, vol. 6, no. 10, 2011.
- [44] F. van den Ent, T. Izoré, T. A. M. Bharat, C. M. Johnson, and J. Löwe, “Bacterial actin MreB forms antiparallel double filaments,” *Elife*, vol. 2014, no. 3, pp. 1–22, 2014.
- [45] O. Esue, M. Cordero, D. Wirtz, and Y. Tseng, “The assembly of MreB, a prokaryotic

- homolog of actin,” *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 4, pp. 2628–2635, 2005.
- [46] D. Popp *et al.*, “Filament structure, organization, and dynamics in MreB sheets,” *J. Biol. Chem.*, vol. 285, no. 21, pp. 15858–15865, 2010.
- [47] A. Colavin, J. Hsin, and K. C. Huang, “Effects of polymerization and nucleotide identity on the conformational dynamics of the bacterial actin homolog MreB,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 111, no. 9, pp. 3585–3590, 2014.
- [48] D. Takahashi, I. Fujiwara, Y. Sasajima, A. Narita, K. Imada, and M. Miyata, “ATP-dependent polymerization dynamics of bacterial actin proteins involved in *Spiroplasma* swimming,” *Open Biol.*, vol. 12, no. 10, 2022.
- [49] H. Strahl, F. Bürmann, and L. W. Hamoen, “The actin homologue MreB organizes the bacterial cell membrane,” *Nat. Commun.*, vol. 5, 2014.
- [50] R. J. Auchus *et al.*, “Guidelines for the Development of Comprehensive Care Centers for Congenital Adrenal Hyperplasia: Guidance from the CARES Foundation Initiative,” *Int. J. Pediatr. Endocrinol.*, vol. 2010, 2010.
- [51] R. Madabhushi and K. J. Mariani, “Actin Homolog MreB Affects Chromosome Segregation by Regulating Topoisomerase IV in *Escherichia coli*,” *Mol. Cell*, vol. 33, no. 2, 2009.
- [52] I. B. Holland, H. E. Jones, A. K. Campbell, and A. Jacq, “An assessment of the role of intracellular free Ca²⁺ in *E. coli*,” in *Biochimie*, 1999, vol. 81, no. 8–9.
- [53] S. Z. Chou and T. D. Pollard, “Mechanism of actin polymerization revealed by cryo-EM structures of actin filaments with three different bound nucleotides,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 116, no. 10, 2019.
- [54] E. P. Sablin, J. F. Dawson, M. S. VanLoock, J. A. Spudich, E. H. Egelman, and R. J. Fletterick, “How does ATP hydrolysis control actin’s associations?,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 99, no. 17, 2002.
- [55] H. Schüler, “ATPase activity and conformational changes in the regulation of actin,” *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*, vol. 1549, no. 2, 2001.

- [56] T. Splettstoesser, F. Noé, T. Oda, and J. C. Smith, “Nucleotide-dependence of G-actin conformation from multiple molecular dynamics simulations and observation of a putatively polymerization-competent superclosed state.,” *Proteins*, vol. 76, no. 2, 2009.
- [57] S. Barkó *et al.*, “Large-scale purification and in vitro characterization of the assembly of MreB from *Leptospira interrogans*,” *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, 2016.
- [58] S. Wang, L. Furchtgott, K. C. Huang, and J. W. Shaevitz, “Helical insertion of peptidoglycan produces chiral ordering of the bacterial cell wall,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 109, no. 10, 2012.
- [59] C. G. Dos Remedios *et al.*, “Actin binding proteins: Regulation of cytoskeletal microfilaments,” *Physiological Reviews*, vol. 83, no. 2, 2003.
- [60] S. Kumar, C. J. Tsai, B. Ma, and R. Nussinov, “Contribution of salt bridges toward protein thermostability,” *J. Biomol. Struct. Dyn.*, vol. 17, no. SUPPL. 1, 2000.
- [61] E. A. Permyakov and E. A. Burstein, “Some aspects of studies of thermal transitions in proteins by means of their intrinsic fluorescence,” *Biophys. Chem.*, vol. 19, no. 3, 1984.
- [62] T. J. Silhavy, D. Kahne, and S. Walker, “The bacterial cell envelope.,” *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, vol. 2, no. 5, 2010.
- [63] S. Kırmusaoğlu, *Antimicrobials, Antibiotic Resistance, Antibiofilm Strategies and Activity Methods*. 2019.
- [64] R. Spohn, “A bakteriális antibiotikum rezisztencia de novo evolúciója és járulékos következményei,” *Ph.D. értekezés, Biológia Doktori Iskola, MTA Szegedi Biológiai Kut. Biokémiai Intézet*, 2018.
- [65] O. P. Olademehin, S. J. Kim, and K. L. Shuford, “Molecular Dynamics Simulation of Atomic Interactions in the Vancomycin Binding Site,” *ACS Omega*, vol. 6, no. 1, 2021.
- [66] Z. Jia, M. L. O’Mara, J. Zuegg, M. A. Cooper, and A. E. Mark, “The effect of environment on the recognition and binding of vancomycin to native and resistant forms of lipid II,” *Biophys. J.*, vol. 101, no. 11, 2011.
- [67] L. Cegelski *et al.*, “Rotational-echo double resonance characterization of the effects of vancomycin on cell wall synthesis in *Staphylococcus aureus*,” *Biochemistry*, vol. 41, no. 43, 2002.

- [68] H. Nikaido, "Preventing drug access to targets: Cell surface permeability barriers and active efflux in bacteria," *Semin. Cell Dev. Biol.*, vol. 12, no. 3, 2001.
- [69] L. F. Neville *et al.*, "In vivo targeting of escherichia coli with vancomycin-arginine," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 65, no. 4, 2021.
- [70] A. Antonoplis, X. Zang, T. Wegner, P. A. Wender, and L. Cegelski, "Vancomycin-Arginine Conjugate Inhibits Growth of Carbapenem-Resistant E. coli and Targets Cell-Wall Synthesis," *ACS Chem. Biol.*, vol. 14, no. 9, 2019.
- [71] J. M. Stokes, S. French, O. G. Ovchinnikova, C. Bouwman, C. Whitfield, and E. D. Brown, "Cold Stress Makes Escherichia coli Susceptible to Glycopeptide Antibiotics by Altering Outer Membrane Integrity," *Cell Chem. Biol.*, vol. 23, no. 2, 2016.
- [72] S. Feng *et al.*, "Real-Time In Vivo Detection and Monitoring of Bacterial Infection Based on NIR-II Imaging," *Front. Chem.*, vol. 9, 2021.
- [73] M. R. L. Stone, M. S. Butler, W. Phetsang, M. A. Cooper, and M. A. T. Blaskovich, "Fluorescent Antibiotics: New Research Tools to Fight Antibiotic Resistance," *Trends in Biotechnology*, vol. 36, no. 5, 2018.
- [74] K. Tiyanont, T. Doan, M. B. Lazarus, X. Fang, D. Z. Rudner, and S. Walker, "Imaging peptidoglycan biosynthesis in Bacillus subtilis with fluorescent antibiotics," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 103, no. 29, 2006.
- [75] N. Iwai, T. Fujii, H. Nagura, M. Wachi, and T. Kitazume, "Structure-activity relationship study of the bacterial actin-like protein MreB inhibitors: Effects of substitution of benzyl group in S-benzylisothiourea," *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, vol. 71, no. 1, pp. 246–248, 2007.
- [76] G. J. Bean *et al.*, "A22 disrupts the bacterial actin cytoskeleton by directly binding and inducing a low-affinity state in MreB," *Biochemistry*, 2009.
- [77] P. C. Bonez *et al.*, "Anti-biofilm activity of A22 ((S-3,4-dichlorobenzyl) isothiourea hydrochloride) against Pseudomonas aeruginosa: Influence on biofilm formation, motility and bioadhesion," *Microb. Pathog.*, vol. 111, pp. 6–13, 2017.
- [78] E. Awuni, "Status of Targeting MreB for the Development of Antibiotics," *Frontiers in Chemistry*, vol. 7, 2020.

- [79] E. J. Bryan *et al.*, “TXH11106: A Third-Generation MreB Inhibitor with Enhanced Activity against a Broad Range of Gram-Negative Bacterial Pathogens,” *Antibiotics*, vol. 11, no. 5, p. 693, 2022.
- [80] N. Iwai, K. Nagai, and M. Wachi, “Novel S-benzylisothiourea compound that induces spherical cells in *Escherichia coli* probably by acting on a rod-shape-determining protein(s) other than penicillin-binding protein 2.,” *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, vol. 66, no. 12, pp. 2658–62, 2002.
- [81] Y. Awuni, S. Jiang, R. C. Robinson, and Y. Mu, “Exploring the A22-Bacterial Actin MreB Interaction through Molecular Dynamics Simulations,” *J. Phys. Chem. B*, vol. 120, no. 37, pp. 9867–9874, 2016.
- [82] C. W. Shebelut, R. B. Jensen, and Z. Gitai, “Growth conditions regulate the requirements for *Caulobacter* chromosome segregation,” *J. Bacteriol.*, vol. 191, no. 3, 2009.
- [83] H. Ceri, M. E. Olson, C. Stremick, R. R. Read, D. Morck, and A. Buret, “The Calgary Biofilm Device: New technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms,” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 37, no. 6, 1999.
- [84] I. Williams, W. A. Venables, D. Lloyd, F. Paul, and I. Critchley, “The effects of adherence to silicone surfaces on antibiotic susceptibility in *Staphylococcus aureus*,” *Microbiology*, vol. 143, no. 7, 1997.
- [85] P. C. Bonez *et al.*, “Antibacterial, cyto and genotoxic activities of A22 compound ((S-3, 4 -dichlorobenzyl) isothiourea hydrochloride),” *Microb. Pathog.*, vol. 99, pp. 14–18, 2016.
- [86] O. Esue, D. Wirtz, and Y. Tseng, “GTPase Activity , Structure , and Mechanical Properties of Filaments Assembled from Bacterial Cytoskeleton Protein MreB,” vol. 188, no. 3, pp. 968–976, 2006.
- [87] A. Zhou *et al.*, “Synergistic interactions of vancomycin with different antibiotics against *Escherichia coli*: Trimethoprim and nitrofurantoin display strong synergies with vancomycin against wild-type *E. coli*,” *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 59, no. 1, pp. 276–281, 2015.
- [88] A. Kotzialampou, E. Protonotariou, L. Skoura, and A. Sivropoulou, “Synergistic

- Antibacterial and Antibiofilm Activity of the MreB Inhibitor A22 Hydrochloride in Combination with Conventional Antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* Clinical Isolates,” *Int. J. Microbiol.*, vol. 2021, 2021.
- [89] M. T. Guarnieri, B. S. J. Blagg, and R. Zhao, “A high-throughput TNP-ATP displacement assay for screening inhibitors of ATP-binding in bacterial histidine kinases,” *Assay Drug Dev. Technol.*, vol. 9, no. 2, 2011.
- [90] C. N. Takacs, S. Poggio, G. Charbon, M. Pucheault, W. Vollmer, and C. Jacobs-Wagner, “MreB drives de novo rod morphogenesis in *Caulobacter crescentus* via remodeling of the cell wall,” *J. Bacteriol.*, vol. 192, no. 6, 2010.
- [91] H. Kang, M. J. Bradley, W. A. Elam, and E. M. De La Cruz, “Regulation of actin by ion-linked equilibria,” *Biophysical Journal*, vol. 105, no. 12. 2013.
- [92] I. M. Kuznetsova, T. A. Yakusheva, and K. K. Turoverov, “Contribution of separate tryptophan residues to intrinsic fluorescence of actin. Analysis of 3D structure,” *FEBS Lett.*, vol. 452, no. 3, 1999.
- [93] C. M. J. Wesseling and N. I. Martin, “Synergy by Perturbing the Gram-Negative Outer Membrane: Opening the Door for Gram-Positive Specific Antibiotics,” *ACS Infect. Dis.*, vol. 8, no. 9, pp. 1731–1757, 2022.

10. Publikációs lista

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

Longauer, Beáta, Bódis, Emőke, Lukács, András, Barkó, Szilvia, Nyitrai, Miklós: Solubility and Thermal Stability of Thermotoga maritima MreB.

Int. J. Mol. Sci., 23(24), 16044; (2022)

Impakt faktor: 6.208

Nyilvános idézők összesen: 0, Független: 0

Szatmári, Dávid; Sárkány, Péter; Kocsis, Béla; Nagy, Tamás; Miseta, Attila; Barkó, Szilvia; **Longauer, Beáta**; Robinson, Robert C; Nyitrai, Miklós: Intracellular ion concentrations and cation-dependent remodelling of bacterial MreB assemblies.

SCIENTIFIC REPORTS 10 : 1 Paper: 12002 , 13 p. (2020)

Impakt faktor: 4.379

Nyilvános idézők összesen: 28, Független: 25

Az értekezéshez kapcsolódó előadások:

Longauer Beáta, Lukács András, Bódis Emőke, Szatmári Dávid, Barkó Szilvia, Nyitrai Miklós: Eltérő hatásmechanizmusú antibakteriális vegyületek hatása a bakteriális citoszkeletonra.

Intézményi ÚNKP Konferencia, Előadás, Pécs, 2022. június 02.

Beata Longauer, Miklós Nyitrai, Szilvia Barko: Application of fluorescence vancomycin as a novel bacterial cytoskeleton marker.

Second Symposium on Super-resolution and Advanced Fluorescence Microscopy and István Ábrahám Memorial Workshop, Előadás, Pécs, 2022. április 01-02.

Beáta Longauer, Szilvia Barkó, Dávid Szatmári, Miklós Nyitrai: Effect of A22 and nucleotides on MreB polymerisation.

Hungarian Molecular Life Science Conference 2021, Előadás, Eger, 2021. november 05-07.

Longauer Beáta, Barkó Szilvia, Nyitrai Miklós: Az A22 hatása a MreB fehérje polimerizációjára.

DOSZ Science and Innovation Conference, Előadás, Online, 2021. január 29-30.

Beáta Longauer: The effect of A22 on the organization of the bacterial actin-like MreB.

Medical Conference for PhD Students and Experts of Clinical Sciences, Előadás, Pécs, 2018. október 27.

Az értekezéshez szorosan nem kapcsolódó előadás:

Longauer Beáta: A prokarióta és eukarióta aktin hasonlósága és különbözőségei: a MreB falloidin kötése.

Tudományos Diákköri Konferencia, előadás, Pécs, 2016. április 14-16.

Az értekezéshez kapcsolódó posztterek:

Beáta Longauer; Dávid Szatmári; András Lukács; Emőke Bódis; Miklós Nyitrai; Szilvia Barkó: Mode of action of a novel, MreB-specific antibiotic A22.

EMBO Workshop: New approaches to combat antibiotic-resistant bacteria, Poszter, Ascona, 2022. június 12-16.

Beáta Longauer, Szilvia Barkó, Dávid Szatmári, Zoltán Ujfalusi, Miklós Nyitrai: A22 alters the polymerization properties of the bacterial actin-like MreB.

A Magyar Biofizikai Társaság XXVII. Kongresszusa, Poszter, Debrecen, 2019. augusztus 26-29.

Longauer Beáta, Barkó Szilvia, Bódis Emőke, Szatmári Dávid, Nyitrai Miklós: A baktériumok sejtvázának vizsgálata biofizikai módszerekkel.

47. Membrán-Transzport Konferencia, Poszter, Sümeg, 2017. május 16-19.

Longauer Beáta, Barkó Szilvia, Bódis Emőke, Szatmári Dávid, Nyitrai Miklós: A baktériumok sejtvázának vizsgálata biofizikai módszerekkel.

5. Interdiszciplináris Doktorandusz Konferencia, Poszter, Pécs, 2016. május 27-29.

Az értekezéshez szorosan nem kapcsolódó posztterek:

Szilvia Barkó, Beáta Longauer, Emőke Bódis, Dávid Szatmári, Zoltán Ujfalusi, Robert C. Robinson, Miklós Nyitrai: Phalloidin as a bacterial actin-labeling agent.

A Magyar Biofizikai Társaság XXVII. Kongresszusa, Poszter, Debrecen, 2019. augusztus 26-29.

Beata Longauer, Szilvia Barko, Eموke Bodis, David Szatmari and Miklos Nyitrai: Phalloidin binds to MreB from *Leptospira interrogans*.

16th International ELMI Meeting, Poszter, Debrecen, 2016. május 24-27th



Article

Solubility and Thermal Stability of *Thermotoga maritima* MreB

Beáta Longauer¹, Emőke Bódis¹, András Lukács¹ , Szilvia Barkó^{1,2,3,*} and Miklós Nyitrai^{1,2,3}

¹ Department of Biophysics, Medical School, University of Pécs, Szigeti Str. 12, H-7624 Pécs, Hungary

² MTA-PTE Nuclear-Mitochondrial Interactions Research Group, Szigeti Str. 12, H-7624 Pécs, Hungary

³ Szentágotthai Research Center, University of Pécs, H-7622 Pécs, Hungary

* Correspondence: szilvia.barko@aok.pte.hu

Abstract: The basis of MreB research is the study of the MreB protein from the *Thermotoga maritima* species, since it was the first one whose crystal structure was described. Since MreB proteins from different bacterial species show different polymerisation properties in terms of nucleotide and salt dependence, we conducted our research in this direction. For this, we performed measurements based on tryptophan emission, which were supplemented with temperature-dependent and chemical denaturation experiments. The role of nucleotide binding was studied through the fluorescent analogue TNP-ATP. These experiments show that *Thermotoga maritima* MreB is stabilised in the presence of low salt buffer and ATP. In the course of our work, we developed a new expression and purification procedure that allows us to obtain a large amount of pure, functional protein.

Keywords: MreB; solubility; heat stability; spectroscopy; salt bridge; nucleotide



Citation: Longauer, B.; Bódis, E.; Lukács, A.; Barkó, S.; Nyitrai, M. Solubility and Thermal Stability of *Thermotoga maritima* MreB. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 16044. <https://doi.org/10.3390/ijms232416044>

Academic Editor: Csaba Magyar

Received: 25 November 2022

Accepted: 14 December 2022

Published: 16 December 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Eukaryotic actin, and its distant bacterial homolog MreB, are important for the maintenance of cell shape and functionality. MreB plays a critical role in the assembly and organisation of the bacterial cell wall. Therefore, it is a potential drug target to combat multidrug resistance in bacteria. MreBs have been studied in several bacteria. MreB from the hyperthermophilic *Thermotoga maritima* (*Tm*-MreB) has been particularly intensively studied [1,2] including the elucidation of the first 3D structures of the monomers and filaments [3]. MreBs of other species studied include those of *Bacillus subtilis* (*Bs*-MreB) [3,4] *Chlamydomonas reinhardtii* (*Cr*-MreB) [5], *Escherichia coli* (*Ec*-MreB) [6], and *Leptospira interrogans* (*Li*-MreB) [7].

These studies have shown that there are differences in filament dynamics between MreB homologs in vitro, including polymerisation propensity upon addition of nucleotides and/or salt, timing of nucleotide hydrolysis before, during, or after the polymerisation, or whether there are discrete actin-like nucleation and elongation steps of polymerisation. MreBs can form a variety of supramolecular structures in vitro when assembled under different conditions [3,4,8].

There is a contradiction in the MreB literature regarding the role of nucleotides in the polymerisation of MreBs from different species [3–5,7]. It has been described that MreB proteins from different species are able to polymerize in the presence but also in the absence of nucleotides [3,6,8]. Therefore, it is still debatable whether MreB proteins require nucleotides to maintain normal function or not. On the other hand, since ATP is present in millimolar concentrations in cell cytoplasm [9], it can be assumed that MreB binds nucleotides under cellular conditions. Moreover, it was recently described that ATP binding increases the melting temperature of *Sc*-MreB5 [10].

The optimal purification method and storage conditions for MreB protein are also questionable. The MreB laboratories are divided into two groups, namely the salt-free [4,5,11] and high-salt preferring [6,8,12]. The presence of ATP also plays a central role in these

experiments. In salt-free, ATP containing methods a monovalent salt is used to initiate polymerisation, while the high-salt buffer requires ATP to induce the assembly of monomers.

Our aim was to describe the thermal stability of *Tm*-MreB in relation to the presence of nucleotide and salt [11]. To this end we took advantage the spectroscopic signal from a single tryptophan of *Tm*-MreB. As described previously, the local conformational changes of the tryptophan residue can be used to detect thermal denaturation [13,14]. On this basis, we found that conformation and stability of *Tm*-MreB strongly depend on the buffer conditions. The absence of monovalent ions and the binding of ATP favour the most thermostable form, although the solubility is increased in a salt-rich environment.

In our previous studies, we found that millimolar magnesium and one hundred millimoles of potassium or sodium are required for efficient MreB polymerisation. The addition of calcium causes arrangement in ribbon-like structures and large bundles, and we hypothesise that calcium binding may alter the filaments [15]. We assume that the polymerisation inhibiting effect of salt (NaCl or KCl) can be explained by the less stable conformation of MreB, which affects the salt bridge between two subdomains of *Tm*-MreB.

We also described the ATP binding ability of *Tm*-MreB and found that it is higher under salt-free conditions. It was also described that the widely used, potential antibiotic MreB-specific inhibitor A22 [16] does not affect ATP binding under any conditions.

2. Results

In this paper, we describe a novel native purification method that enables the production of soluble, functional MreB protein in high purity and quantity.

The first and probably most important point is that, in our recent work, we have used for the first time a cell line containing endogenously expressed chaperone proteins. These help to maintain a native conformation of the expressed protein during expression. Our previous experience, and also other publications, have shown that MreB proteins can be produced in good quantity in recombinant expression systems, but the yield is poor. This is because most of expressed protein is lost in the first step of ultracentrifugation and subsequent cell lysis. This can probably be explained by the formation of “inclusion bodies”, i.e., unfolded protein aggregates.

When using ArcticExpress (DE3) competent cells, the expression of MreB is high (Figure 1A, line 2) and, furthermore, there is almost no loss upon ultracentrifugation; the full amount of MreB is found in the supernatant (Figure 1B, lines 3 and 4).

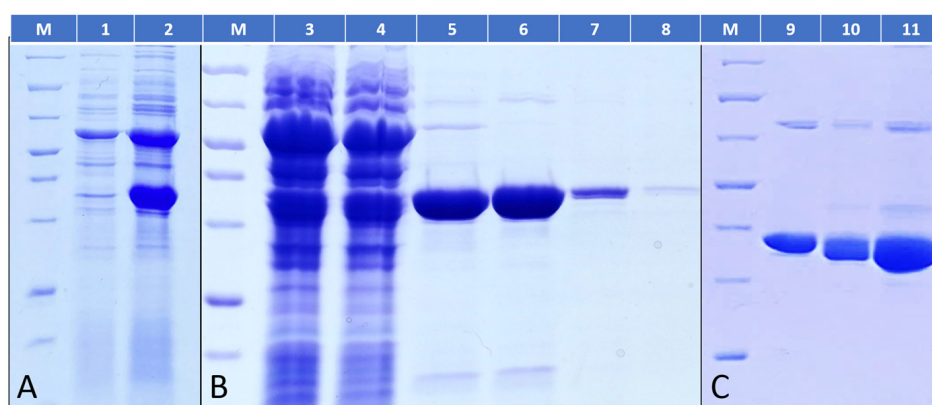


Figure 1. Purification of *Tm*-MreB using BL21 DE3 Arctic express cell line. (A) Molecular weight marker (M) followed by the cell lysates before (lane 1) and after induction with IPTG (lane 2). (B) Purification of *Tm*-MreB using high-salt purification buffers: lane 3: cell lysate before ultracentrifugation; lane 4: supernatant after ultracentrifugation; lanes 5–8: elution of protein with increasing imidazole concentration. (C) Last steps of the *Tm*-MreB purification: lane 9: *Tm*-MreB fraction before His-tag removal; lane 10: His-tag cleaved *Tm*-MreB; lane 11: concentrated, His-tag-free *Tm*-MreB.

Following the protocol described by van den Ent et al. in 2000 [3], the *Tm*-MreB can be eluted using an increased imidazole concentration of Ni resin (Figure 1B, lanes 5, 6 and 7). The histidine tag can be removed (Figure 1C, lanes 9 and 10), and further concentration of the protein is even possible without aggregation (Figure 1C, lane 11).

It is worth noting that this step has been found to be crucial for the purification of MreB, i.e., the buffer conditions play a crucial role in determining the structure and solubility of MreB. In our experiments, we used two different buffer conditions that are most popular in the MreB literature. The first was originally described in the publication mentioned above [3] (20 mM TRIS-HCl, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.5) The second is the one which is referred to in the “actin literature” [4] (4 mM TRIS, 0.1 mM CaCl₂, with or without 2 mM ATP, pH 7.5) and is commonly referred as buffer A. For better understanding, the first buffer is indicated as high-salt, and the second as salt-free in this paper.

It seems that a high-salt buffer is more suitable for MreB. At high-salt concentration, imidazole subtraction can be performed without aggregation using the PD10 desalting column. In buffer A hard, visible precipitation of MreB was observed in the absence of ATP, but some aggregation of MreB was also seen in the presence of ATP.

Interestingly, *Tm*-MreB does not precipitate when buffer conditions change from high-salt to salt-free. Therefore, to study MreB in a salt-free environment, a fraction of *Tm*-MreB was dialyzed in buffer A.

To describe the difference in stability in different buffer conditions, MreB was investigated by a spectroscopic method. *Tm*-MreB contains a tryptophan residue that allows us to describe conformational changes under different conditions.

We used a temperature-controlled cuvette holder that allowed fine tuning of the temperature in the cuvette and simultaneous observation of the tryptophan signal with a spectrofluorometer. Our aim was to determine the thermal unfolding of *Tm*-MreB and subsequently measure the decrease in tryptophan fluorescence, as has been described for other proteins [17,18].

First, it is worth noting that the tryptophan residue of *Tm*-MreB is probably accessible to the solvent since the maximum of fluorescence emission is by 350 nm [19]. In our experiments, the fluorescence emission of *Tm*-MreB decreased with increasing temperature (Figure S1). Interestingly, the fluorescence emission decreased significantly upon thermal denaturation (Figure S1, lowest, orange line).

At high-salt conditions *Tm*-MreB does not appear to be stable, as tryptophan fluorescence intensity decreases with increasing temperature, up to the point of final denaturation at 50 °C (Figure 2). This is in good agreement with previous data described by CD spectroscopy (Table 1) [11]. Our data show that the presence of ATP at high concentration (2 mM) can stabilise *Tm*-MreB, the denaturation is shifted to 55–60 °C.

Surprisingly, our data showed that *Tm*-MreB in buffer A exhibits higher thermal stability than in a salt-containing environment. In a salt-free environment, *Tm*-MreB shows much higher heat stability: it is evident from the spectroscopic data (and visually) that it remains stable until 75 °C (Figure 2). The most surprising data, however, is that *Tm*-MreB does not denature in the presence of 2 mM ATP, at least to 90 °C (Table 1).

Table 1. Results of thermal denaturation of *Tm*-MreB. Second-order differentiation was performed using the data in Figure 2 to obtain the decay of the fluorescence signal, i.e., melting temperature.

Buffer Conditions	Melting Temperature	
	Previous Data (CD)	This Work (Tryptophan Signal)
Salt-free	N/A	75 °C
Salt-free + ATP	70 °C [11]	90 °C ≤
High-salt	53 °C [11]	~50 °C
High-salt + ATP	N/A	55 °C

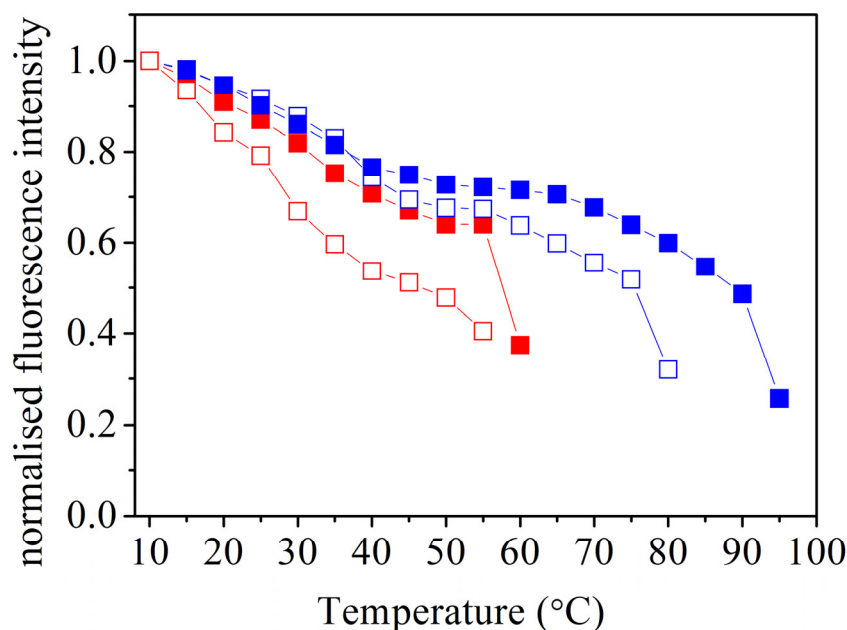


Figure 2. Thermal denaturation of *Tm*-MreB at different buffer conditions. The tryptophan fluorescence intensity of *Tm*-MreB was examined in high-salt (red) or salt-free (blue) environments. In one group of experiments, 2 mM ATP was added to MreB (closed symbols).

It can be concluded that the preferred method is a two-step purification of MreB; imidazole removal should be done in a buffer with high-salt content, but the desirable storage buffer is a salt-free buffer such as buffer A. With this purification method, high protein purification efficiency can be achieved: about 30–40 mg of purified MreB can be obtained from 3 g of cell pellet.

It is worth mentioning that we did not observe any wavelength shift of the tryptophan residue when heated, but that the fluorescence intensity decreased with increasing temperature (Figure S1). This observation is fundamentally different from that of actin (Figure S2).

To describe chemical denaturation characteristic of *Tm*-MreB, denaturation experiments were performed with guanidine hydrochloride. In this case, a decrease in fluorescence emission can also be observed, as previously described [20]. Our data show that in these experiments the emission maximum of the tryptophan residue was shifted towards to higher wavelength (Figure S3). This behaviour was observed in both buffer conditions (Figure 3).

It was also investigated which parameters influence the quantum yield of the tryptophan residue. First, tryptophan residue was investigated as such in different buffer conditions. Our data showed that the fluorescence intensity is independent of the buffer conditions (Figure 4, dashed lines). On the other hand, the tryptophan residue of *Tm*-MreB was found to have about four-to-ten times lower fluorescence intensity as tryptophan residue in solution (Figure 4, straight lines). This can probably be explained by the shadowing effect of the local environment. Furthermore, the fluorescence intensity of the tryptophan residue in a salt-free environment is much lower (blue curve) than in the presence of salt (red curve). This can be explained by the closed conformation near the tryptophan residue compared to a salt-rich environment. Interestingly, the binding of ATP has no influence on the emission of the tryptophan signal (Figure inset).

Based on previous data, we aimed to characterise ATP binding to *Tm*-MreB in this work. In our experiments, we used a fluorescent, non-hydrolysing ATP analogue, TNP-ATP, which shows an increased fluorescence signal upon protein binding [21].

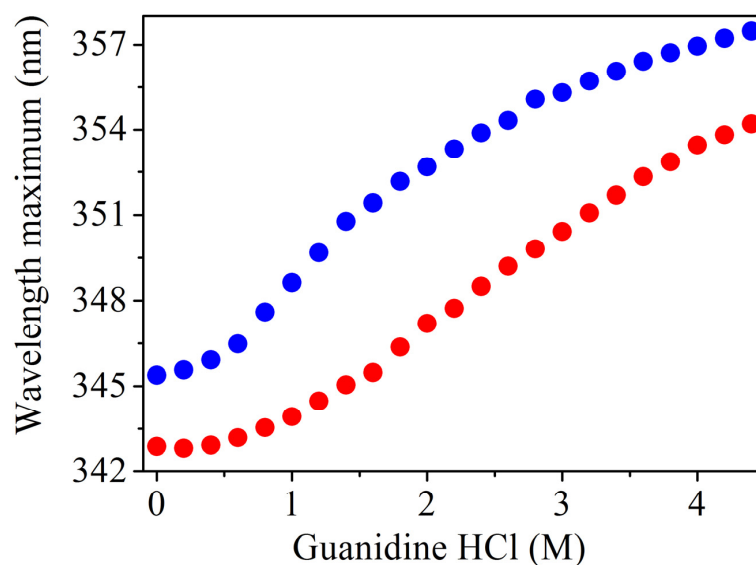


Figure 3. Chemical denaturation of *Tm*-MreB with guanidine hydrochloride. *Tm*-MreB can be denatured in high-salt (red) and even in salt-free (blue) environments. The emission spectra were fitted with the Gaussian function and the centre plotted as a function of the Gu-HCl concentration.

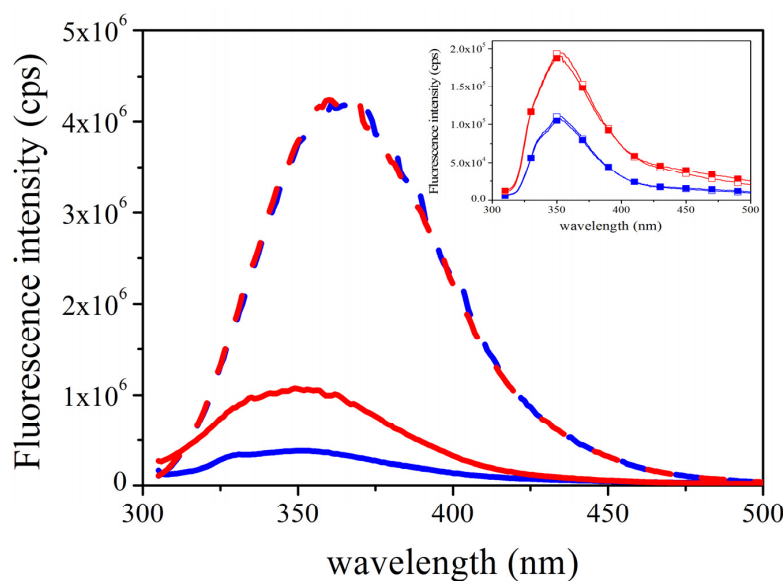


Figure 4. The tryptophan fluorescence intensity of *Tm*-MreB depends on the buffer conditions. The fluorescence intensity of the tryptophan residue was measured in salt-free (blue line) and high-salt (red line) environments. The fluorescence intensity of the tryptophan residue itself is not affected by buffer conditions (dashed lines). The tryptophan residue of *Tm*-MreB shows a lower fluorescence intensity than tryptophan alone at the same concentration, showing the shadowing effect of the surrounding residues in *Tm*-MreB. This effect is more pronounced in salt-free buffer (blue curve), probably due to conformational changes. **Inset:** The presence or binding of ATP has no effect on the fluorescence of tryptophan. In an independent measurement, the fluorescence intensity of *Tm*-MreB was measured in a salt-free environment (blue curves) and in the presence of salt (red curves) in the presence (filled symbols) and absence (empty symbols) of ATP.

When plotting the fluorescence signal of TNP-ATP as a function of *Tm*-MreB concentration in buffer A, saturation can be observed (Figure 5). In the case of saturation, the bound fraction reaches its maximum so that a K_d value can be determined at half saturation.

Our data show that the affinity of TNP-ATP for *Tm*-MreB in salt-free environment is $3.69 \pm 0.04 \mu\text{M}$. This is a relatively weak binding, which is probably higher under in vivo conditions due to the binding of other factors to MreB.

Interestingly, our data showed that, although TNP-ATP binds to *Tm*-MreB in both buffer conditions, the binding in buffer A is stronger than in the presence of salt. The fluorescence intensity of TNP-ATP is about twice as high at the same concentration of *Tm*-MreB (Figure 6). We also investigated whether the MreB-specific inhibitor A22 can block ATP binding to *Tm*-MreB. Our spectroscopic data clearly show that A22 has no effect on TNP-ATP binding at all buffer conditions applied.

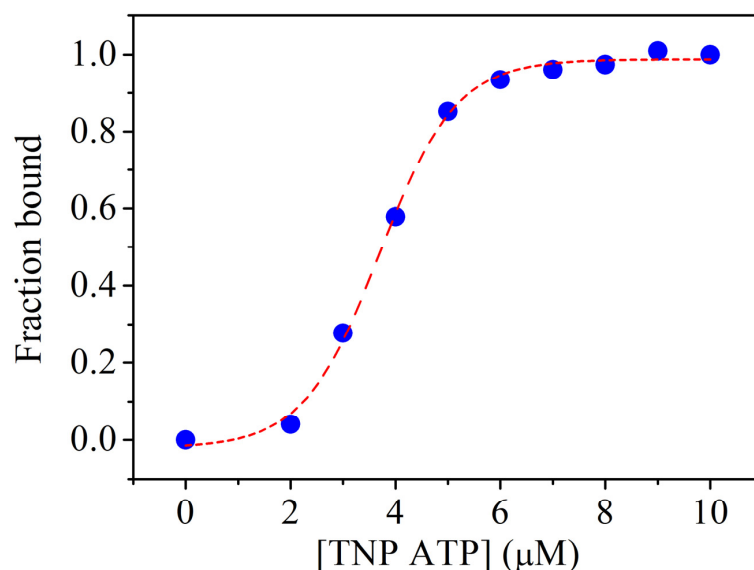


Figure 5. Binding of TNP-ATP to *Tm*-MreB shows saturation. The fluorescence intensity of TNP-ATP was measured in the presence of $20 \mu\text{M}$ *Tm*-MreB at different concentrations. In the case of saturation, no more binding is possible, so it was plotted as the maximum of the bound fraction. The affinity of *Tm*-MreB for TNP-ATP was calculated as half-maximum of saturation and determined to be $3.69 \mu\text{M}$.

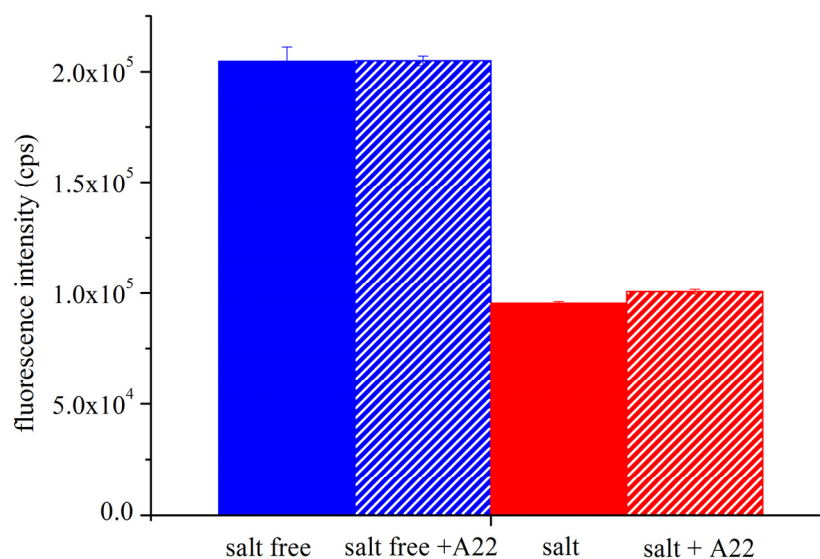


Figure 6. The fluorescent ATP analogue TNP-ATP binds more tightly to *Tm*-MreB in salt-free environment. We incubated $20 \mu\text{M}$ *Tm*-MreB overnight in a salt-free (blue) or high-salt (red) environment with $1 \mu\text{M}$ TNP-ATP, in the absence or presence of $50 \mu\text{M}$ A22 (+A22 indicated). The next day, the fluorescence intensity was measured from TNP-ATP.

To describe whether TNP-ATP binds to the same region of *Tm*-MreB as ATP, competition assays were performed. Our data show that ATP can displace TNP-ATP, i.e., the fluorescence signal of TNP-ATP decreases upon addition of ATP (Figure 7). This suggests that TNP-ATP binds to the nucleotide binding pocket of MreB and is a competitor of ATP. Based on previous publications, we were able to determine the affinity of ATP for *Tm*-MreB [22], which was about 2 μ M.

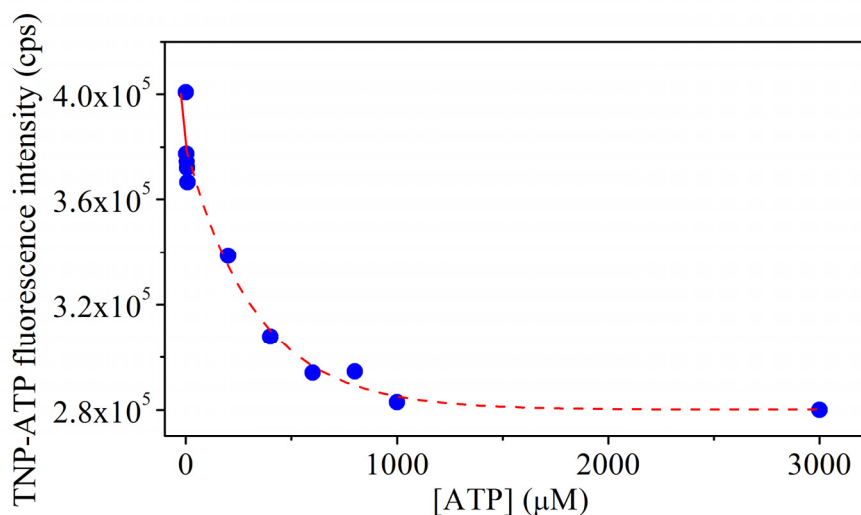


Figure 7. ATP is competitor of TNP-ATP. The fluorescence emission of TNP-ATP was measured in the presence of an increasing concentration of ATP. Based on the curve, the dissociation constant of ATP to *Tm*-MreB is about 3.7 μ M.

3. Discussion

Our data show that *Thermotoga maritima* MreB can be expressed and purified in large quantities using ArcticExpress (DE3) competent cells. The chaperones of this system can help produce native, soluble *Tm*-MreB so that it does not form inclusion bodies. Therefore, native purification can be performed instead of denaturation as previously described [7]. The most sensitive step in purification is the removal of the imidazole, probably because imidazole can stabilise MreB. We have described that this step is crucial and requires a high-salt concentration to obtain a soluble protein, i.e., in case of direct removal of imidazole in buffer, precipitation of MreB can be observed.

Apart from this, these buffer conditions are not particularly suitable for prolonged storage of *Tm*-MreB. We have observed that *Tm*-MreB has a very low melting temperature in a high-salt environment, especially in the absence of ATP. The presence of ATP can increase the stability of *Tm*-MreB, but it is still very low compared to salt-free conditions. It can be concluded that *Tm*-MreB has a significantly increased thermal stability in a salt-free environment, i.e., in presence of TRIS-HCl and the divalent cation CaCl_2 , it is around 75 $^{\circ}\text{C}$. Moreover, the presence of ATP may further stabilise *Tm*-MreB, as it exhibits a stable conformation above 90 $^{\circ}\text{C}$. This is in good agreement with previous observations, even though a much lower ATP concentration was used in these experiments [11]. The extremely high melting temperature can be explained by the habitat of *Thermotoga maritima*, which lives in hot springs, requiring extreme heat stability. In summary, *Tm*-MreB belongs to the group of proteins that require ATP for stable conformation [23].

The possible explanation for the difference in heat stability in salt-free and high-salt conditions is the presence of a salt bridge in the molecule. It has already been described that salt bridges, which can form between oppositely charged residues, such as Arg (ϵ) or Lys (K) and Asp (D) or Glu (E), can stabilise or even destabilise the structure of proteins [24]. The enhancement of thermal stability by salt bridges has already been described for other thermophilic proteins [25], and ATP has been found to have a concentration-dependent effect

on the heat stability of a large number of proteins [23]. Salt bridge abolition by mutation and higher ionic strength weakens the salt bridge and destabilises certain proteins [26].

In the case of *Thermotoga maritima* MreB it is known that there is a salt bridge between K49 and E204 [3] (Figure 8). It is worth noting that the two residues localise on IB and IIB subdomains of *Tm*-MreB (Figure 8). It has already been described that the spatial orientation of these subdomains with respect to each other is closely correlated with the binding of ATP in MreB [27]. Therefore, this “flattening” motion may play a central role in changing the conformation during polymerisation, as is the case with actin [27]. We conclude that salt bridge formation is more favourable in the flattened conformation because the amino acids that form the salt bridge are much closer in this conformation. It has been described that a high-salt concentration can increase the solubility of the protein, which is referred to as “salting in” the process [28]. On the other hand, the presence of monovalent ions weakens the salt bridge [29], and thus affects thermal stability [30]. Our hypothesis is that NaCl stabilises *Tm*-MreB structure during cell lysis and the initial purification steps, but inhibits the formation of the salt bridge. As the stable, soluble structure is evolved, removal of NaCl allows the salt bridge to form and thus increases the thermal stability of *Tm*-MreB, especially when ATP is bound in the nucleotide binding pocket [23].

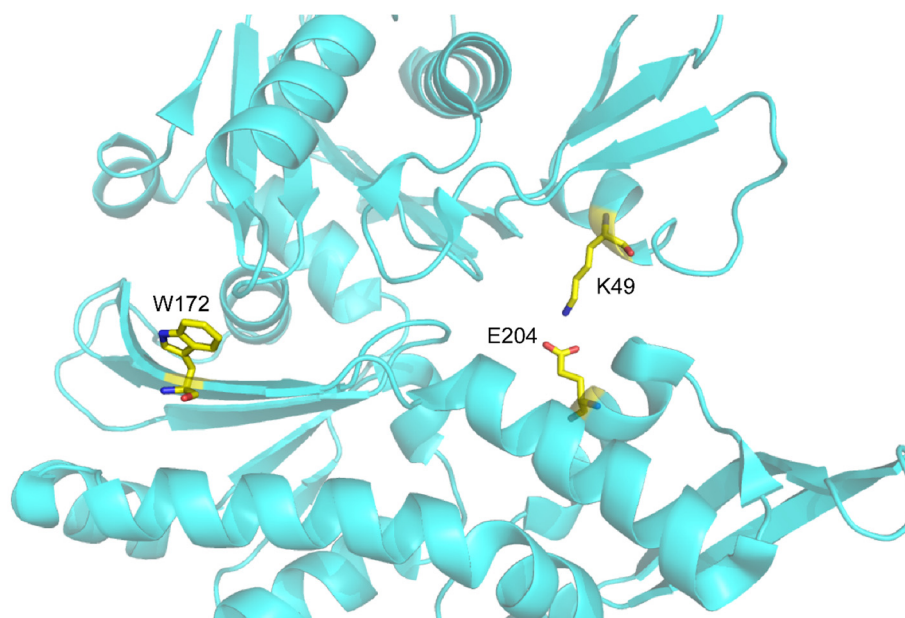


Figure 8. The salt bridge of *Tm*-MreB can affect the conformation of *Tm*-MreB and consequently the fluorescence emission of the tryptophan residue. *Tm*-MreB (PDB: 1JCG) K49 lysine and E204 glutamic acids are located on different subdomains; therefore, the salt bridge between them may affect the local environment of W172.

We have described that the quantum yield of fluorescence of tryptophan residue decreases with increasing temperature, which can be explained by the interaction of chromophores with quenching agents in the solvent or in the protein itself. On the other hand, almost no shift in fluorescence emission from the tryptophan residue was observed during thermal unfolding, although it can be observed in actin (see Supplementary data). Normally, the theory is that the maximum of the fluorescence emission undergoes a red shift when the chromophores are more exposed to the solvent. In our experiment, this was not the case, regardless of the buffer conditions or the nucleotides.

To describe the behaviour of the single tryptophan of *Tm*-MreB upon denaturation, a chemical denaturation assay was performed. Interestingly, a typical red shift was observed in this case. From this, we can conclude that thermal and chemical denaturation induce different conformational changes on *Tm*-MreB and that, in the latter case, the environment of the tryptophan is more exposed to the solvent. On the other hand, it is worth noting that

actin contains four tryptophan amino acids and therefore the fluorescence intensity of actin is determined by the combination of these amino acids (Figure 9).

Our spectroscopic data show that tryptophan is buried in the molecule, and this shadow effect is more pronounced in salt-free environments. In agreement with the thermal denaturation data, this may indicate a more stable conformation.

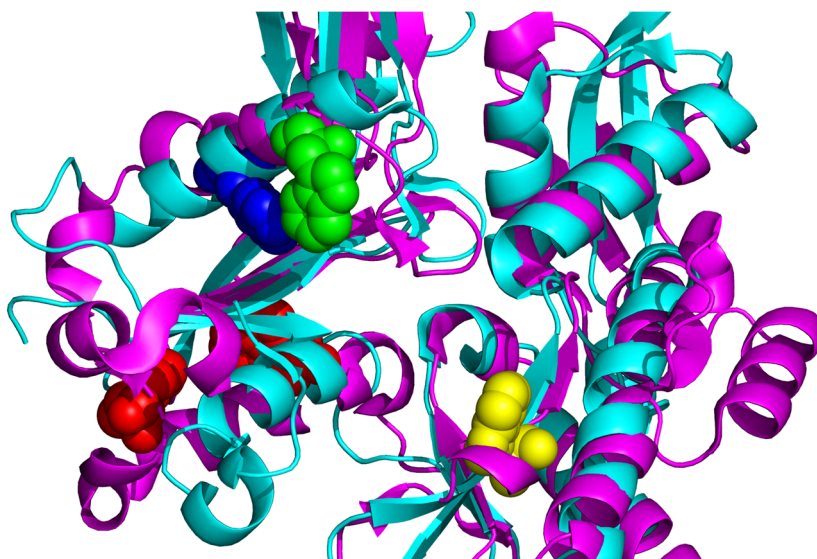


Figure 9. Localization of tryptophan residues in *Tm*-MreB and skeletal alpha-actin. Monomeric rabbit skeletal alpha actin (PDB: 1NWK) is in magenta; *Tm*-MreB (PDB: 1JCG) is in blue. The Trp-79 tryptophan residue of actin can be seen as green spheres; it is the most accessible for the solvent compared with the other three tryptophan residues of actin. The Trp-86 of actin, which is mostly quenched by cysteine and methionine residues, is in blue, and the most intrinsic residues are in red. The position of single tryptophan of *Tm*-MreB is in yellow; it is positioning separately from the tryptophan residues of actin. It does not seem as accessible to solvent as Trp-79 of actin, but it is in the cleft between two subdomains; therefore, it can be sensitive for conformational changes.

It was described earlier that the four tryptophan of eukaryotic actin contributes differently in the intrinsic fluorescence intensity of actin [31]. It was found that Trp-79 is the most accessible for the solvent; therefore, it is the most sensitive to the changing of buffer conditions. As it can be seen on the Figure 9, the only tryptophan residue of *Thermotoga maritima* MreB is in a closed environment; therefore, we understand that it is not easily affected by environmental changes, i.e., ion conditions. This can explain why there was no red shift of tryptophan emission. On the other side, it is under the nucleotide binding cleft, between the two subdomains of *Tm*-MreB; therefore, its quantum yield can be sensitive to conformational changes of the molecule.

The non-hydrolysing ATP analogue TNP-ATP proved a suitable agent to describe nucleotide binding of *Tm*-MreB. Supporting our thermal denaturing assays, where the stable conformation of *Tm*-MreB was found via a salt-free environment, it was also found that, in salt-free circumstances, *Tm*-MreB binds TNP-ATP more tightly than in the presence of monovalent ions at high concentration. On the other side, it was found that the MreB specific inhibitor A22 does not inhibit binding of TNP-ATP to MreB in any circumstances. Finally, we concluded that ATP is a competitor of TNP-ATP, which means that they have the same binding region. It was found that approximately 35–40% of bound TNP-ATP could be removed by ATP; therefore, it can be suggested that there are binding sites with different affinities in MreB. The 2 μ M affinity of ATP to *Tm*-MreB shows a relatively weak binding; it can be concluded that other factors or binding partners in cytoplasm can improve that.

4. Materials and Methods

4.1. Protein Expression and Purification

4.1.1. Expression

The plasmid containing *Thermotoga maritima* MreB was transformed into ArcticExpress (DE3) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) competent cells. We added 2 μ L of β -mercaptoethanol diluted with distilled water at a ratio of 1:10 to 100 μ L of competent cells. The cells were incubated on ice for 10 min, rotating the tubes by hand every 2 min. After 10 min, 5 μ L of plasmid DNA was added to the competent cells. Transformed cells were then incubated on ice for 30 min. After a 20 s heat shock (42 °C water bath), the cells were placed on ice again for 2 min. The transformed bacterial cells were grown in 0.9 mL of pre-warmed Luria broth (LB) nutrient solution at 37 °C for 1 h, shaking at 220–250 rpm. Then 150 μ L of cell culture was spread on a plate containing double resistance (gentamicin: 20 μ g/mL and ampicillin: 100 μ g/mL).

An independent colony was inoculated with 100 mL of LB solution containing the appropriate amount of both antibiotics. The cell culture was grown overnight in a shaking incubator at 37 °C (220–250 rpm). The next day, 20–20 mL of cell culture was added to 1–1 L of LB nutrient solution and were shaken at 30 °C at 220–250 rpm for 3 h. Here, it is no longer necessary to add antibiotics to the cell culture. After the incubation period, the temperature was set to 11.5 °C. As the cells cooled back to 20 °C, 0.8 mM IPTG was added as a final concentration and the cultures were incubated for 24 h. The cells were centrifuged (2900 \times g, 10 min.) and the pellet was stored at –20 °C.

4.1.2. Purification

The *Thermotoga* MreB cell pellet (1–2 g) was homogenized in TRIS-HCl buffer (50 mM TRIS, pH 8.0, 1 g pellet/10 mL buffer). After adding lysozyme, the cells were sonicated on ice (80%, pulse for 1 min, then 1 min break, repeated 6 times). Before centrifugation (328,000 \times g, at 4 °C, 30 min), DNase I was added to the lysate (50 μ g/mL). The Ni-nitrilotriacetic acid (Ni-NTA) (Qiagen, Hilden, Germany) column was eluted with 5% imidazole buffer (1M imidazole, 50 mM TRIS-HCl, pH 6.0) and 95% NaCl buffer (300 mM NaCl, 50 mM TRIS-HCl, pH 6.0), equilibrated and the supernatant was cooled and stirred for 1 h. The column was then washed with 10–20–30–50% imidazole buffer (dissolved in NaCl buffer). The fractions were collected separately and analysed by SDS gel electrophoresis.

Fractions containing MreB were dialysed in high-salt buffer (20 mM TRIS-HCl, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.5). One part of this was further dialysed against salt-free buffer (4 mM TRIS-HCl, 0.1 mM CaCl₂, pH 7.5) with two buffer exchanges. *Tm*-MreB was ultracentrifuged (100,000 \times g, 4 °C, 30 min). The His-tag was removed with PreScission protease (GE Healthcare Life Sciences) (2U/100 μ g protein) overnight at 4 °C. The protease was removed on GST column next day. The final protein concentration was measured with a spectrophotometer.

4.1.3. Tryptophan Measurement

We measured 20 μ M of *Tm*-MreB or 20 μ M of tryptophan in salt-free (4 mM TRIS-HCl, 0.1 mM CaCl₂, pH 7.5) or high-salt (20 mM TRIS-HCl, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.5) conditions, using a Horiba Jobin Yvon spectrofluorometer. The excitation was set to 295 nm. The emission was measured between 310 nm and 450 nm at 22 °C.

4.1.4. Thermal Denaturation

We heated 20 μ M of *Tm*-MreB protein in different buffer conditions (salt-free (4 mM TRIS-HCl, 0.1 mM CaCl₂, pH 7.5) or high-salt (20 mM TRIS-HCl, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.5) in the presence or absence of 2 mM ATP) between 20–95 °C and the fluorescence intensity of tryptophan was continuously measured between 310 nm and 450 nm. The excitation wavelength was 295 nm. The measurements were performed on a Jobin Yvon Horiba fluorimeter equipped with a Quantum Northwest TLC50 temperature-controlled cuvette holder.

4.1.5. Chemical Denaturation

We measured 20 μM of *Tm*-MreB by Horiba Jobin Yvon fluorimeter. The chemical denaturation was performed with guanidine hydrochloride solution (6M Gu-HCl was dissolved in salt-free or high-salt buffer). The guanidine was added to the protein in increasing concentrations in 0.2 M steps. The excitation was set to 295 nm and the tryptophan emission was detected by each step between 310 nm and 450 nm, at room temperature.

4.1.6. TNP-ATP Binding to *Tm*-MreB

We incubated 20 μM of overnight in a salt-free (4 mM TRIS-HCl, 0.1 mM CaCl_2 , pH 7.5) or a high-salt (20 mM TRIS-HCl, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.5) environment with 1 μM TNP-ATP in the absence or presence of 50 μM A22. The next day, the fluorescence intensity of TNP-ATP was measured. The excitation was set to 400 nm and the emission was measured between 420 nm and 650 nm. The maximal intensity of spectra (by 540 nm) was applied to calculate the binding ratio and was set to bound fraction 0 by no binding and 1 by saturation.

The Hill equation was fitted to curve:

$$y = V_{max} * \frac{x^n}{k^n + x^n}$$

where V_{max} is the maximal y data, k is x by half saturation and n is the Hill coefficient.

Kd of TNP-ATP to *Tm*-MreB was obtained k .

4.1.7. ATP Competition Assay

We incubated 20 μM of *Tm*-MreB overnight in a salt-free (4 mM TRIS-HCl, 0.1 mM CaCl_2 , pH 7.5) environment with 1 μM TNP-ATP. On the next day, non-fluorescence ATP (pH 7.5) was added to samples and the fluorescence signal of TNP-ATP was measured.

Affinity of ATP to *Tm*-MreB was calculated using the Langmuir single-site binding equation for a curve fit based on previous publications [29].

5. Conclusions

We have described that *Thermotoga maritima* MreB can be expressed and purified in high amounts using ArcticExpress (DE3) competent cells. The most sensitive step during the purification of *Tm*-MreB is the imidazole removal because *Tm*-MreB remains soluble in the presence of high amounts of NaCl. By further storage and investigation, a salt-free environment and the presence of ATP improves the stability of *Tm*-MreB. Our data showed that MreB binds ATP with micromolar affinity and that MreB specific inhibitor A22 does not block the binding of ATP.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms232416044/s1>.

Author Contributions: Conceptualization, B.L. and S.B.; methodology, S.B.; software, S.B. and A.L.; validation, B.L. and S.B.; formal analysis, B.L., A.L. and S.B.; investigation, B.L., E.B., A.L., S.B. and M.N.; resources, B.L., M.N. and A.L.; data curation, B.L. and S.B.; writing—original draft preparation, B.L. and S.B.; writing—review and editing, B.L., E.B., A.L., S.B. and M.N.; visualization, S.B. and A.L.; supervision, S.B. and M.N.; project administration, S.B., A.L. and M.N.; funding acquisition, B.L. and M.N. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by the ÚNKP-21-4-I-PTE-1136 New National Excellence Program of the Ministry for Innovation and Technology from the source of the National Research, Development and Innovation Fund, and Phd+1 UP MS Research Fund.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: We would like to acknowledge Robert Robinson, Okayama University, Faculty of Science Research Institute for Interdisciplinary Science for providing *Tm*-MreB plasmid.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Strahl, H.; Bürmann, F.; Hamoen, L.W. The actin homologue MreB organizes the bacterial cell membrane. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 3442. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Carballido-López, R. The Bacterial Actin-Like Cytoskeleton. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2006**, *70*, 888. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Ent, F.V.D.; Amos, L.A.; Löwe, J. Prokaryotic origin of the actin cytoskeleton. *Nature* **2001**, *413*, 39–44. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Mayer, J.A.; Amann, K.J. Assembly properties of the *Bacillus subtilis* actin, MreB. *Cell Motil. Cytoskelet.* **2009**, *118*, 109–118. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Gaballah, A.; Kloeckner, A.; Otten, C.; Sahl, H.-G.; Henrichfreise, B. Functional Analysis of the Cytoskeleton Protein MreB from *Chlamydomonas reinhardtii*. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e25129. [[CrossRef](#)]
6. Nurse, P.; Mariani, K.J. Purification and Characterization of *Escherichia coli* MreB Protein. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 3469–3475. [[CrossRef](#)]
7. Barkó, S.; Szatmári, D.; Bódis, E.; Türmer, K.; Ujfalusi, Z.; Popp, D.; Robinson, R.C.; Nyitrai, M. Large-scale purification and in vitro characterization of the assembly of MreB from *Leptospira interrogans*. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) Gen. Subj.* **2016**, *1860*, 1942–1952. [[CrossRef](#)]
8. Esue, O.; Cordero, M.; Wirtz, D.; Tseng, Y. The Assembly of MreB, a Prokaryotic Homolog of Actin. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 2628–2635. [[CrossRef](#)]
9. Yaginuma, H.; Kawai, S.; Tabata, K.; Tomiyama, K.; Kakizuka, A.; Komatsuzaki, T.; Noji, H.; Imamura, H. Diversity in ATP concentrations in a single bacterial cell population revealed by quantitative single-cell imaging. *Sci. Rep.* **2014**, *4*, 6522. [[CrossRef](#)]
10. Pande, V.; Mitra, N.; Bagde, S.R.; Srinivasan, R.; Gayathri, P. Filament organization of the bacterial actin MreB is dependent on the nucleotide state. *J. Cell Biol.* **2022**, *221*. [[CrossRef](#)]
11. Bean, G.J.; Amann, K.J. Polymerization Properties of the *Thermotoga maritima* Actin MreB: Roles of Temperature, Nucleotides, and Ions. *Biochemistry* **2008**, *47*, 826–835. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Popp, D.; Narita, A.; Maeda, K.; Fujisawa, T.; Ghoshdastider, U.; Iwasa, M.; Maeda, Y.; Robinson, R. Filament Structure, Organization, and Dynamics in MreB Sheets. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 15858–15865. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Eftink, M. The use of fluorescence methods to monitor unfolding transitions in proteins. *Biophys. J.* **1994**, *66*, 482–501. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Monsellier, E.; Bedouelle, H. Quantitative measurement of protein stability from unfolding equilibria monitored with the fluorescence maximum wavelength. *Protein Eng. Des. Sel.* **2005**, *18*, 445–456. [[CrossRef](#)]
15. Szatmári, D.; Sárkány, P.; Kocsis, B.; Nagy, T.; Miseta, A.; Barkó, S.; Longauer, B.; Robinson, R.C.; Nyitrai, M. Intracellular ion concentrations and cation-dependent remodelling of bacterial MreB assemblies. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 12002. [[CrossRef](#)]
16. Bean, G.J.; Flickinger, S.T.; Westler, W.M.; McCully, M.E.; Sept, D.; Weibel, D.B.; Amann, K.J. A22 Disrupts the Bacterial Actin Cytoskeleton by Directly Binding and Inducing a Low-Affinity State in MreB. *Biochemistry* **2009**, *48*, 4852–4857. [[CrossRef](#)]
17. Permyakov, E.A.; Burstein, E.A. Some aspects of studies of thermal transitions in proteins by means of their intrinsic fluorescence. *Biophys. Chem.* **1984**, *19*, 265–271. [[CrossRef](#)]
18. Mills, O. Effect of temperature on tryptophan fluorescence of β -lactoglobulin B. *BBA Protein Struct.* **1976**, *434*, 324–332. [[CrossRef](#)]
19. Möller, M.; Denicola, A. Protein tryptophan accessibility studied by fluorescence quenching. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* **2002**, *30*, 175–178. [[CrossRef](#)]
20. Telek, E.; Karádi, K.; Kardos, J.; Kengyel, A.; Fekete, Z.; Halász, H.; Nyitrai, M.; Bugyi, B.; Lukács, A. The C-terminal tail extension of myosin 16 acts as a molten globule, including intrinsically disordered regions, and interacts with the N-terminal ankyrin. *J. Biol. Chem.* **2021**, *297*, 100716. [[CrossRef](#)]
21. Woodbury, D.J.; Whitt, E.C.; Coffman, R.E. A review of TNP-ATP in protein binding studies: Benefits and pitfalls. *Biophys. Rep.* **2021**, *1*, 100012. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Guarnieri, M.T.; Blagg, B.S.J.; Zhao, R. A High-Throughput TNP-ATP Displacement Assay for Screening Inhibitors of ATP-Binding in Bacterial Histidine Kinases. *ASSAY Drug Dev. Technol.* **2011**, *9*, 174–183. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Sridharan, S.; Kurzawa, N.; Werner, T.; Günthner, I.; Helm, D.; Huber, W.; Bantscheff, M.; Savitski, M.M. Proteome-wide solubility and thermal stability profiling reveals distinct regulatory roles for ATP. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 1155. [[CrossRef](#)]
24. Kang, H.; Bradley, M.J.; Elam, W.A.; De La Cruz, E.M. Regulation of Actin by Ion-Linked Equilibria. *Biophys. J.* **2013**, *105*, 2621–2628. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Elcock, A.H. The stability of salt bridges at high temperatures: Implications for hyperthermophilic proteins. *J. Mol. Biol.* **1998**, *284*, 489–502. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Hoersch, D.; Otto, H.; Joshi, C.P.; Borucki, B.; Cusanovich, M.A.; Heyn, M.P. Role of a Conserved Salt Bridge between the PAS Core and the N-Terminal Domain in the Activation of the Photoreceptor Photoactive Yellow Protein. *Biophys. J.* **2007**, *93*, 1687–1699. [[CrossRef](#)]

27. Colavin, A.; Hsin, J.; Huang, K.C. Effects of polymerization and nucleotide identity on the conformational dynamics of the bacterial actin homolog MreB. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 3585–3590. [[CrossRef](#)]
28. Sun, S.F. *Physical Chemistry of Macromolecules*; John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, USA, 2004. [[CrossRef](#)]
29. Dzubiella, J. Salt-Specific Stability and Denaturation of a Short Salt-Bridge-Forming α -Helix. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 14000–14007. [[CrossRef](#)]
30. Kumar, S.; Tsai, C.-J.; Ma, B.; Nussinov, R. Contribution of Salt Bridges Toward Protein Thermostability. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2000**, *17*, 79–85. [[CrossRef](#)]
31. Kuznetsova, I.M.; Yakusheva, T.A.; Turoverov, K.K. Contribution of separate tryptophan residues to intrinsic fluorescence of actin. Analysis of 3D structure. *FEBS Lett.* **1999**, *452*, 205–210. [[CrossRef](#)]



OPEN

Intracellular ion concentrations and cation-dependent remodelling of bacterial MreB assemblies

Dávid Szatmári¹, Péter Sárkány¹, Béla Kocsis³, Tamás Nagy⁴, Attila Miseta^{4,5}, Szilvia Barkó¹, Beáta Longauer¹, Robert C. Robinson^{6,7} & Miklós Nyitrai^{1,2,5✉}

Here, we measured the concentrations of several ions in cultivated Gram-negative and Gram-positive bacteria, and analyzed their effects on polymer formation by the actin homologue MreB. We measured potassium, sodium, chloride, calcium and magnesium ion concentrations in *Leptospira interrogans*, *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. Intracellular ionic strength contributed from these ions varied within the 130–273 mM range. The intracellular sodium ion concentration range was between 122 and 296 mM and the potassium ion concentration range was 5 and 38 mM. However, the levels were significantly influenced by extracellular ion levels. *L. interrogans*, *Rickettsia rickettsii* and *E. coli* MreBs were heterologously expressed and purified from *E. coli* using a novel filtration method to prepare MreB polymers. The structures and stability of Alexa-488 labeled MreB polymers, under varying ionic strength conditions, were investigated by confocal microscopy and MreB polymerization rates were assessed by measuring light scattering. MreB polymerization was fastest in the presence of monovalent cations in the 200–300 mM range. MreB filaments showed high stability in this concentration range and formed large assemblies of tape-like bundles that transformed to extensive sheets at higher ionic strengths. Changing the calcium concentration from 0.2 to 0 mM and then to 2 mM initialized rapid remodelling of MreB polymers.

In bacterial cultures, the survivability of cells is influenced by extracellular salt effects, and cells adapt to changes in osmolarity by changing their intracellular ionic strength¹. During the process of osmoadaptation, bacteria adjust to variant osmotic conditions by sodium/potassium uptake and release from and to the surrounding medium². Many non-halophilic bacteria show a two-phase adaptation reaction to hyperosmotic shock³. In the first phase, the cells take up a large amount of K⁺ via specific ion transport systems. This step is necessary to compensate for the efflux of water that occurs due to the increase in the exterior osmolality⁴. High intracellular concentrations of K⁺ can have negative effects on protein function, protein binding to DNA and protein synthesis^{5,6}. The second phase frequently involves the synthesis or uptake of compatible solutes^{7,8} and the efflux of K⁺^{3,4}. The osmotic shock response of *E. coli* causes an increase of intracellular Na⁺ and K⁺ concentrations up to several hundred millimolar⁹. In *B. subtilis*, the recovery of turgor after moderate osmotic change, by the addition of 0.4 M NaCl, increased intracellular K⁺ levels from a basal value of 350 mM to 650 mM within 1 h¹⁰.

Bacterial cell shape is determined by the structure of the cell wall. The cell wall is a rigid crosslinked meshwork, the shape of which is maintained by the cellular turgor pressure. Bacteria can be subdivided into Gram-negative species that have a thin peptidoglycan layer and both an inner cytoplasmic and outer membrane, and Gram-positive species with only one cytoplasmic membrane and a thick peptidoglycan layer comprised largely of teichoic acids. Both types of bacteria use MreBs to organize peptidoglycan and teichoic acid synthesizing enzymes required for cell-wall assembly, growth and function¹¹. The supramolecular morphology of MreB is known to be complex. Initial immunofluorescence microscopic studies with MreB fused to fluorescent proteins^{12,13} indicated that MreB forms spiral-like patterns under the cell surface. Results from super-resolution microscopy techniques

¹Department of Biophysics, Medical School, University of Pécs, Pécs, Hungary. ²MTA-PTE Nuclear-Mitochondrial Interactions Research Group, Pécs, Hungary. ³Department of Medical Microbiology and Immunology, Medical School, University of Pécs, Pécs, Hungary. ⁴Department of Laboratory Medicine, Medical School, University of Pécs, Pécs, Hungary. ⁵Szentágothai Research Center, University of Pécs, Pécs, Hungary. ⁶School of Biomolecular Science and Engineering (BSE), Vidyasirimedhi Institute of Science and Technology (VISTEC), Rayong, Thailand. ⁷Research Institute for Interdisciplinary Science (RIIS), University of Okayama, Okayama, Japan. ✉email: miklos.nyitrai@aok.pte.hu

increased the level of detail, demonstrating that MreB forms shorter helical segments, seen as patches, that associate with the inner membrane of the bacteria^{14,15}.

Important observations were made in three independent studies showing the coupling of the dynamics of MreB to cell-wall synthesis in two evolutionary different species; Gram-negative *Escherichia coli*¹⁶ and Gram-positive *Bacillus subtilis*^{14,15}. These results established that MreB polymers rotate around the long axis of the cell on a time scale of minutes. Although MreB functions had previously been related to its polymerization, these studies showed that the rotational motion was dependent on cell-wall synthesis activity. If cell-wall precursors were depleted, or cell-wall synthesis enzymes were inhibited with antibiotic drugs, MreB rotation stopped. MreB appears to coordinate the activity of enzymes involved in bacterial growth^{17,18}. *E. coli* rapidly restores its cytoplasmic volume after osmotic shock¹⁹, and short polymers of MreB are required for the recovery of the rod shape²⁰. A minimal degree of rotational motion by MreB polymers is needed to maintain cell shape, however this seems to be independent of the intracellular turgor pressure²¹. MreB is linked to the cell wall via RodZ²⁰ in order to manage peptidoglycan insertion. Cell recovery after osmotic shock initially proceeds at a slow growth rate until the inner membrane, with bound MreB, can reattach to the cell wall, whereupon normal growth rates are restored²². Furthermore, inhibition of MreB polymerization with the drug A22 led to the loss of cell shape²³, indicating an interdependence of MreB polymerization and cell wall synthesis. Kawai and colleagues used a co-immunoprecipitation assay combined with mass spectroscopy to identify proteins that interact with either of the three *B. subtilis* MreB isoforms; MreB, Mbl, and MreBH. More than 100 potential MreB-interacting proteins were identified. They concluded that MreB may provide a scaffold for cell-wall synthesis enzymes and cytoplasmic enzymes required for building cell-wall precursors. By contrast, *Escherichia coli* cells can grow in the complete absence of MreB²⁴, suggesting that while MreB may enhance the efficiency of cell wall synthesis, it is not essential for the process. A possible alternative interpretation is that MreB spatially determines or constrains the potential sites of cell-wall synthesis, as suggested by Furchtgott et al.²⁵ and by van Teeffelen et al.¹⁶. In silico modelling of a growing cell wall showed that helical and stiff arrangements of MreB polymers may stabilize the rod-like cell shape in Gram-negative bacteria by enabling a uniform density of peptidoglycan insertion events in the cell wall. This mechanism assumes stiff MreB filaments that bridge the spatial gaps in the cell wall²⁶. In vitro high salt conditions can cause MreB polymers to stack into stable sheets²⁷. Such morphologies may be related to the in vivo functions, as MreB structures arranged in helical patterns are required for inner membrane and cell shape stability²⁸. However, the roles of the inherent dynamic properties, remodelling and reorganization of MreB in the cell wall maintenance and cell division still need to be clarified.

In vitro solution conditions have significant effects on the organization and function of MreB. Intracellular ion levels can prevent MreB's spontaneous assembly while allowing for site-specific assembly of short polymers^{27,29,30}. MreB polymerization was also shown to be sensitive to the type of bound nucleotide³¹. Polymerization of MreB from *Thermotoga maritima* (*Tm*-MreB) can be initiated by the addition of ATP. The rate of polymerization accelerates with increasing MgCl₂ concentration³², while CaCl₂ does not have a marked influence on the process. However, calcium influx plays an important role in cell cycle and chemotaxis of *E. coli* cells³³. Several important questions remain regarding the roles of ions in the structure and function of MreB filaments. Which ions are essential for the stability for MreB polymers, what conditions can mobilize the MreB cytoskeleton, and how the balance between assembly and disassembly is regulated by ionic changes, all require further investigation.

Due to the characteristic helical morphology of the *Leptospira interrogans* cells, which is remarkably distinct from rod-shaped bacteria, these cells provide an exciting platform to understand the molecular basis of the organization and function of MreB polymers³⁴. The phylum *Spirochaetes* comprises organisms that have distinct cellular morphologies ranging from helical to flat wave-shaped cells. *Leptospira interrogans* has a long (~10 µm) but thin (~0.2 µm) helical cell shape and its motility is driven by the rotation of two periplasmic flagella. These bacteria use the flagella to create corkscrew motility. Currently it is not known whether the formation of the cell wall in these cells relies on a different mechanism of their peptidoglycan synthesis. Also, only limited information is available about the set of proteins participating in the process, though the MreBs of *Leptospira interrogans* is likely to have a role in controlling cell morphology³⁵.

Here we have analyzed the intracellular ionic conditions in *Escherichia coli* and *Leptospira interrogans* as examples Gram-negative bacteria species, and *Bacillus subtilis* as a Gram-positive bacteria species. We have characterized the polymerization of MreBs from different Gram-negative species, *Leptospira interrogans* MreB (*Li*-MreB) and *Rickettsia rickettsii* MreB (*Rr*-MreB) in vitro, under various ionic conditions. We compared the properties of *Li*-MreB and *Rr*-MreB polymers to *Escherichia coli* MreB (*Ec*-MreB) filaments as a reference. Based on these data, we propose a model for the regulation of MreB assembly and remodelling by ion flux.

Results

Intracellular ion concentrations in bacteria. Ion-selective electrode/colorimetry is able to measure concentrations of free ions, while flame photometry measures the total concentrations of ions, including ions bound to proteins and DNA. To compare these two methods, we measured the intracellular concentration of Na⁺, K⁺ and Ca²⁺ in samples extracted from *Escherichia coli* using both ion-selective electrode/colorimetry and flame photometry. The two methods detected similar concentrations of the three ions (Fig. 1A) (with no statistically significant difference, $p > 0.05$), indicating that the ion extraction method used here was effective in releasing the majority of bound ions. Ion-selective electrode/colorimetry is able to measure more types of ions than flame photometry, therefore in subsequent experiments only ion-selective electrode/colorimetry was used to measure ion concentrations (including Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺ and Cl⁻). Our aim was to understand whether a relationship exists between the intracellular ionic conditions and the cell shapes of two Gram-negative species, *Leptospira interrogans* (*Li*), which is a *Spirochaete* with a helical shape, and *Escherichia coli* (*Ec*) with rod-shaped cell morphology. For comparison, we examined a Gram-positive species *Bacillus subtilis* (*Bs*), which also

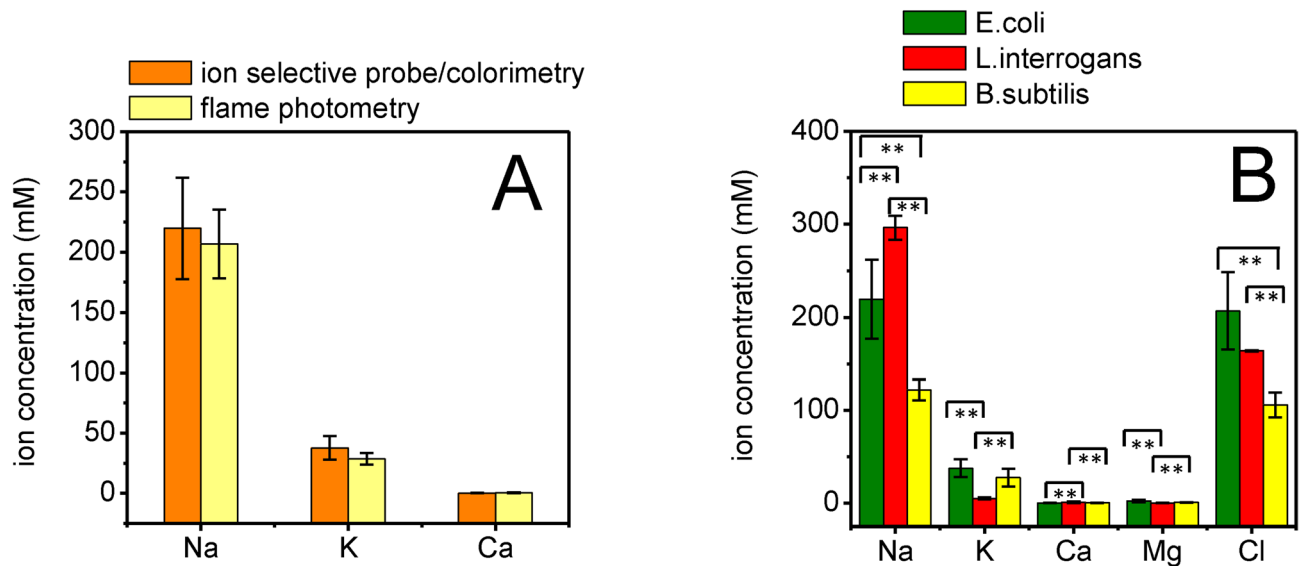


Figure 1. Intracellular ion concentrations in bacteria. (A) Comparison of the intracellular ion concentrations of *Escherichia coli* measured with ion-selective electrode/colorimetry (orange columns) and flame photometry (yellow columns). Error bars refer to mean \pm SD of three independent measurements. There is no statistically significant difference between the data from the two methods, $p > 0.05$. (B) The data obtained using ion-selective electrode/colorimetry to determine the internal ion concentrations of different species. Gram-negative bacteria *Leptospira interrogans* (red columns) and *Escherichia coli* (green columns), Gram-positive *Bacillus subtilis* (yellow columns). Error bars refer to mean \pm SD of six independent measurements. Horizontal bars with two asterisks indicate statistical significances between two values, based on a Student's *t*-test, $p < 0.005$.

has a rod-shaped cell. The ion concentrations determined in all three species are presented in Fig. 1B. Sodium ion concentrations were high in all three species: 296 ± 12 mM in *Li*, 219 ± 42 mM in *Ec* and 122 ± 11 mM in *Bs*, and show statistically significant differences. By contrast, potassium ion concentrations were relatively low: 38 ± 10 mM and 27 ± 10 mM in *Ec* and *Bs*, respectively, and significantly lower 5 ± 1 mM in *Li*. The calcium ion concentration was 1 ± 0.08 mM (significantly higher than for *Ec* and *Bs*) and the magnesium concentration was 0.38 ± 0.2 mM in *Li* (statistically significantly lower than for the other two species). Interestingly, in *Ec* and *Bs* the calcium ion concentrations were sub-millimolar, while the magnesium ion concentration was between 1 and 2 mM. Chloride ions are known to be the major anion composition of bacterial cells. Here, we measured the chloride ion concentrations to be 164 ± 0.7 , 207 ± 41 and 106 ± 13 mM in *Li*, *Ec* and *Bs*, respectively (there is a statistically significant difference only between *Li* and *Ec*). Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{2+} , and Mg^{2+} are the major contributors to intracellular ionic strength^{36–38}. Calculation (Eq. 1) of the intracellular ionic strengths in the differences species, based on these ions, gave values of 235 mM (*Li*), 237 mM (*Ec*) and 130 mM (*Bs*). Despite of the different levels between species, the ratios between various ions in a single species were similar between the three species.

Polymerization of MreB under various salt conditions. To assess the impact of the different ion conditions on MreB polymer formation, we overexpressed MreBs from three Gram-negative species [*E. coli*, *Leptospira interrogans* and *Rickettsia rickettsii* (*Rr*)] in *E. coli*. The MreBs were subsequently purified with a novel polymer filtration method (PF) and a previously published denaturation method³⁹. In the PF method MreBs were polymerized under high salt conditions (50–300 mM KCl, 2 mM MgCl_2 , 0.1 mM CaCl_2) and then filtered (Supp. 1A,B,C). In a previous study, the filament-forming properties of *Li*-MreB were characterized by following polymerization through measuring the increase in light scattering on polymerization³⁹. The optimal salt condition for *Li*-MreB polymerization was determined to be 300 mM KCl, 2 mM MgCl_2 and 0.1 mM CaCl_2 . However, in our present study we determined that *Rr*-MreB required only 200 mM KCl for optimal polymerization (Supp. 2B,C,D) in the presence of MgCl_2 (2 mM) and CaCl_2 (0.1 mM). In the absence of magnesium ions, *Rr*-MreB shows no increase in light scattering indicative of the absence of polymerization, similar to the properties observed for *Li*-MreB (Supp. 2E)³⁹. In the absence of potassium ions, the light scattering level was elevated in response to the addition of millimolar concentrations of divalent cations, which was caused by the precipitation of *Rr*-MreB (Supp. 2E). To enable imaging of MreB polymers, the MreBs were labeled with Alexa488-maleimide. We have previously shown that Alexa-488 labeling had no significant effect on the functional properties of *Li*-MreB³⁹. In 300 mM KCl, 2 mM MgCl_2 and 0.1 mM CaCl_2 , *Li*-MreB formed large bundled assemblies (Fig. 2A) while *Rr*-MreB formed extensive sheets (Fig. 2C). *Li*-MreB formed similar assemblies in 300 mM NaCl as in 300 mM KCl, indicating that sodium and potassium may have similar effects on MreB assembly (Supp. 2F). *Li*-MreB purified with the PF method under the salt composition determined for *Li* cells (296 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.38 mM MgCl_2 , 1 mM CaCl_2) formed similar superstructures based on the interlacement of curved ribbon-like sheets (Fig. 2B) as in the presence of 300 mM KCl, 2 mM MgCl_2 , 0.1 mM CaCl_2 (Fig. 2A) (Supp. Movie 1). The KCl sensitivity of *Rr*-MreB polymerization shows an optimum (Supp. 2C) at 200 mM and formed similar

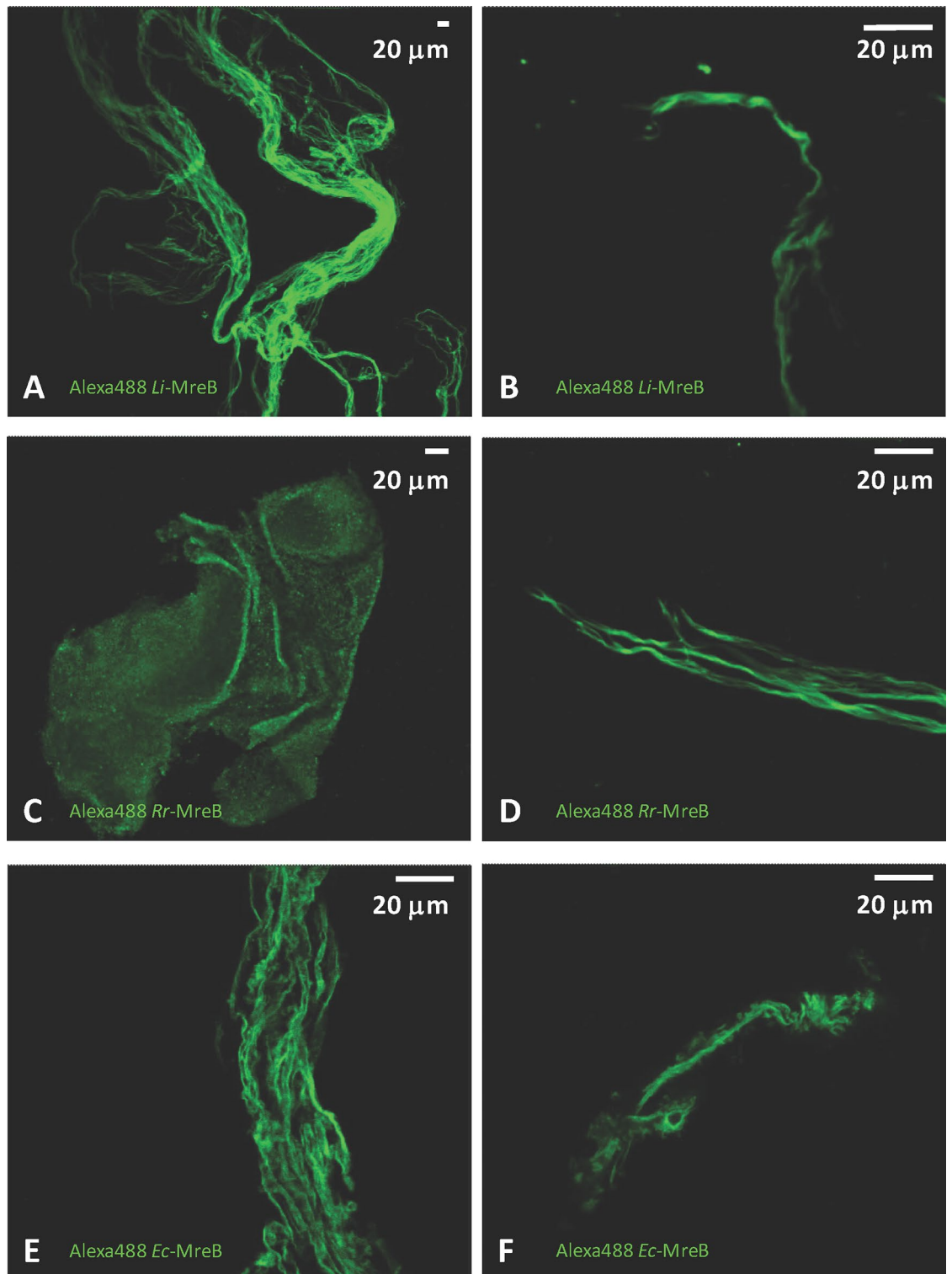


Figure 2. Microscopy imaging of MreB polymers isolated under different ion conditions. (A and B) PF filtered, Alexa488-labeled *Li*-MreB polymers form large superstructures (A) in polymerizing ionic conditions (300 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0.1 mM CaCl₂) (B) in its intracellular ionic conditions determined in this study (296 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.38 mM MgCl₂, 0.99 mM CaCl₂). (C and D) PF filtered, Alexa488-labeled *Rr*-MreB polymers form sheets or assemblies in an ionic strength dependent manner (C) under high ionic conditions (300 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0.1 mM CaCl₂), (D) and under lower KCl conditions (200 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0.1 mM CaCl₂). (E and F) PF filtered, Alexa488-labeled *Ec*-MreB polymers form large superstructures (E) under high ionic conditions (300 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0.1 mM CaCl₂) (*Ec*-MreB polymers form similar assemblies to *Li*-MreB), (F) in its intracellular ionic conditions determined in this study (219 mM NaCl, 38 mM KCl, 2.38 mM MgCl₂, 0.24 mM CaCl₂).

structures (Fig. 2D) as *Li*-MreB in 300 mM KCl (Fig. 2A). *Li*-MreB and *Ec*-MreB formed similar structures in the presence of 300 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0.1 mM CaCl₂ (Fig. 2A and E), which resembled the *Ec*-MreB assemblies purified under the intracellular salt composition (219 mM NaCl, 38 mM KCl, 2.38 mM MgCl₂, 0.24 mM CaCl₂) (Fig. 2F).

Reorganization of MreB polymers by changes in calcium levels. *Li*-MreB shows monovalent cation dependent sensitivity to calcium ion concentrations in the range of 0.1–2 mM. In the absence of KCl and MgCl₂, a fivefold increase in light scattering was observed on the addition of 2 mM CaCl₂ to *Li*-MreB monomers (50 μM). However, in the presence of 300 mM KCl and 2 mM MgCl₂ the signal from the polymers was unchanged on the calcium addition (dashed line in Fig. 3A). Similar effects were observed for *Rr*-MreB (Fig. 3B). To further investigate these effects, we carried out time-lapse microscopy imaging to explore any structural changes of fluorescently labeled *Li*-MreB polymers in response to calcium treatment. The initial large assemblies (gray, Fig. 3C), appeared to shorten and become less flexible after 5 min (cyan, Fig. 3C) and 10 min (green, Fig. 3C) on the addition of 2 mM CaCl₂ (Movie 1). White arrows in Fig. 3C indicate the shortening of the MreB assembly, by the contraction of the whole structure. At the start, the superstructure moves relatively freely. After calcium treatment, the thermal motion of the superstructure slowed and stopped. Both characteristics suggest a calcium-induced structural change in the MreB assembly. However, after 6 mM EDTA treatment in 300 mM KCl, in the absence of divalent cations, the *Li*-MreB and *Rr*-MreB polymers precipitated (Fig. 3D and E). The addition of 6 mM EGTA, rather than EDTA, in the absence of calcium ions, led to the *Li*-MreB superstructures remodelling into a single ribbon-like sheet (Fig. 3F) (Supp. Movie 2), while *Rr*-MreB formed irregular bundled assemblies (Fig. 3G). These data show that calcium influences the formation of MreB polymer superstructures.

To better understand the role of calcium, we carried out experiments in which the responses of polymers were monitored by light scattering on fast changes in calcium ion concentrations. In the presence of 6 mM EGTA, where free calcium was eliminated from the solution, the addition of 2 mM Ca²⁺ led to a jump in light scattering (black line in Fig. 4A), which subsequently decreased slowly, indicating a moderate size change of the *Li*-MreB (50 μM) polymers. Similarly, after extended incubation with 2 mM CaCl₂ followed by a sudden switch to EGTA (6 mM) a fast increase in light scattering was observed (orange line in Fig. 4A) followed by a gradual decrease, indicating that the *Li*-MreB polymers went through a relatively quick supramolecular reorganization. Likewise, a sudden change of calcium level, by consecutive application of EGTA then calcium, had a similar effect on *Rr*-MreB sheets indicated by a rapid increase in light scattering (Fig. 4B). To explore how calcium affects MreB polymers in the presence of EGTA, we followed the change with fluorescence microscopy. Alexa488 labeled *Li*-MreB assemblies in the presence of 2 mM CaCl₂ were dissociated and precipitated after the addition of 6 mM EGTA (Fig. 4C), explaining the quick change of light scattering after this treatment (Fig. 4A, orange line). Surprisingly, in the presence of 6 mM EGTA, *Li*-MreB polymers formed novel web-like structures after 2 mM CaCl₂ addition (Fig. 4D) as was also the case for *Rr*-MreB (Fig. 4E) and *Ec*-MreB (Fig. 4F) polymers. Possibly, magnesium can replace calcium in binding to the MreB polymers to stabilize the assemblies, since the elimination of calcium by EGTA in the presence of magnesium did not affect the MreB assemblies. Subsequent addition of calcium, in excess of the local EGTA concentration, reorganized the MreB filaments. Microscopy images of whole cell lysate from *E. coli* overexpressing *Li*-MreB or *Rr*-MreB (Fig. 4G and H, respectively), in which all cysteines of the entire sample were labeled with Alexa488-maleimide, showed extensive web-like structures after treatment with EGTA (6 mM) followed by CaCl₂ (2 mM excess). This indicates that changes in intracellular calcium levels may play a role in intracellular polymer reorganization.

The persistence length of MreB under various salt conditions. Since ionic conditions have substantial effects on MreB polymerization and superstructure reorganization, we sought to characterize the flexibility of MreB polymers under various salt conditions. We analyzed the microscope images with Easyworm software to estimate the persistence lengths of the MreB structures. Ionic strength was effective in changing the polymerization properties of *Rr*-MreB (Supp. 2B, C, D), therefore the persistence length was examined as the function of the KCl concentration (Fig. 5A). The buffers contained different amounts of KCl (50–300 mM) and 2 mM MgCl₂, 0.1 mM CaCl₂. Persistence lengths were ionic strength dependent and fell in the range of 3.9–35.5 μm (images not shown). Interestingly, the optimal polymerization conditions of *Rr*-MreB (200 mM KCl) resulted the longest persistence length and the lowest flexibility of polymers. However, the persistence lengths of *Li*-MreB and *Rr*-MreB polymers in the presence of 300 mM KCl were similar (14.6 μm), indicating similar flexibilities. For reference, in the case of actin, the persistence length is 12 μm in the activated state of the thin filaments, in the presence of calcium and binding of the tropomyosin-troponin complex⁴⁰. The persistence length of ADP-bound state of the actin filaments is 9 ± 0.5 μm, while the filaments become much stiffer in the absence of calcium (20 ± 1 μm). The persistence lengths estimated here for MreB superstructures varied within a broad range (3.9–35.5 μm), which is similar to the range observed for actin filaments. Interestingly, in the presence of 100 mM KCl the persistence length of *Rr*-MreB (25.73 ± 9.3 μm) polymers was similar to the values of actin thin filaments in the absence of calcium (20 ± 1 μm)⁴⁰.

These data indicate a potential role of calcium in remodeling of MreB superstructures. In the presence of 300 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0.1 mM CaCl₂ the persistence length of *Li*-MreB, *Rr*-MreB and *Ec*-MreB polymers were almost identical (Fig. 5B) around 13 μm. On addition of 2 mM CaCl₂, the persistence lengths of *Li*-MreB and *Rr*-MreB polymers increased to 23–25 μm, the filaments stiffened. In the absence of calcium (6 mM EGTA), both MreBs were more flexible (Lp ~ 6 μm), and subsequent calcium addition (2 mM) caused reorganization of MreBs resulting in slightly stiffer structures and significantly different persistence length *Li*-MreB (Lp = 8.9 μm), *Rr*-MreB (Lp = 15.4 μm) and *Ec*-MreB (Lp = 11.69 μm).

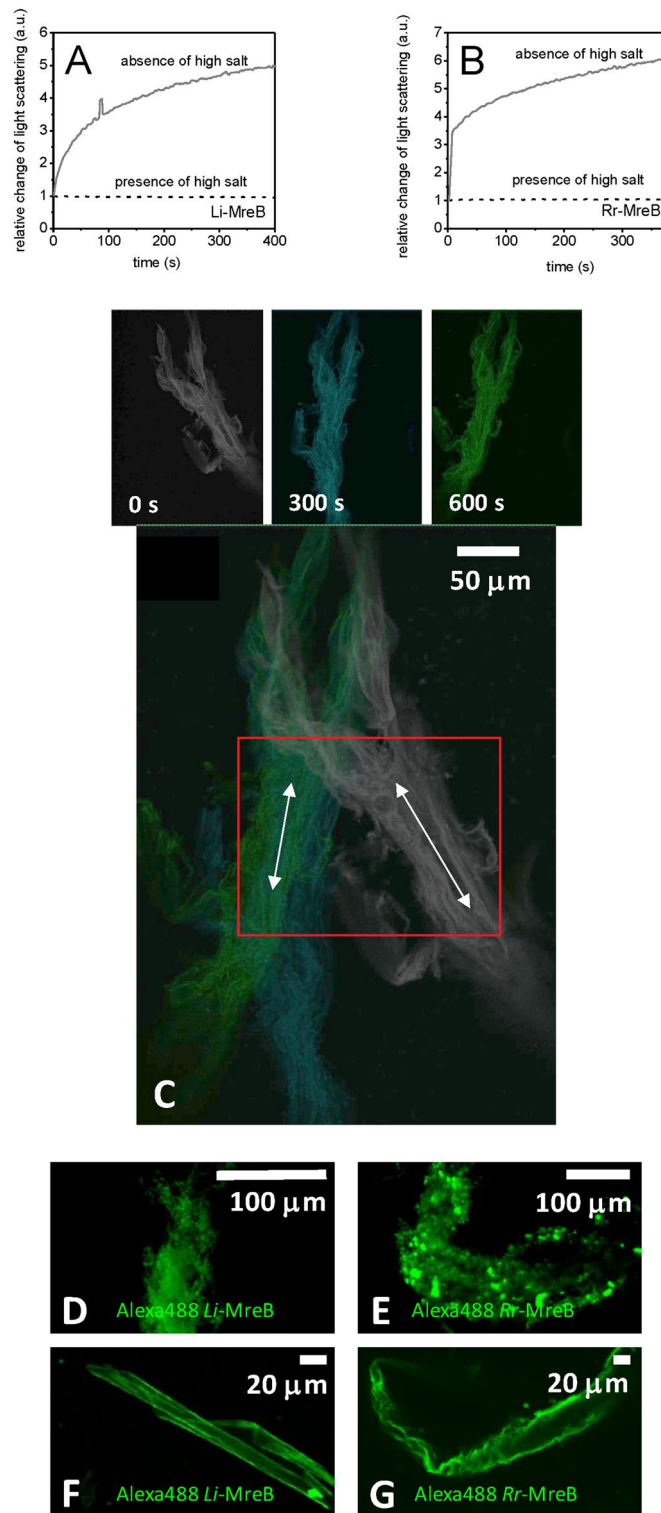


Figure 3. Effect of divalent cations on MreB monomers and polymers. (A and B) Relative light scattering change of 50 μM (A) *Li*-MreB or (B) *Rr*-MreB solutions on adding 2 mM calcium to monomers (purified under denaturing conditions) in the absence of high salt (2 mM TRIS.HCl, 0.1 mM CaCl_2 , 0.2 ATP, 1 mM DTT, pH 8.0) (gray line) or to polymers in the presence of high ionic conditions (300 mM KCl, 2 mM MgCl_2 , 0.1 mM CaCl_2) (dashed line). (C) Microscopy time-lapse snapshots from the entropic motion of Alexa488 labeled *Li*-MreB superstructures under high salt conditions (300 mM KCl, 2 mM MgCl_2 , 0.1 mM CaCl_2). The state of polymer before (gray), 5 min after (cyan) and 10 min after (green) the 2 mM calcium addition. On the overlay image, white arrows indicate that the length change of assemblies contracted by calcium addition (lower panel). (D and E) Microscopy images of Alexa488-labeled (D) *Li*-MreB or (E) *Rr*-MreB polymers after 6 mM EDTA treatment, in the absence of Ca^{2+} and Mg^{2+} . (F and G) Microscopy images of Alexa488 labeled (F) *Li*-MreB or (G) *Rr*-MreB polymers after 6 mM EGTA treatment, in the absence of Ca^{2+} and presence of Mg^{2+} .

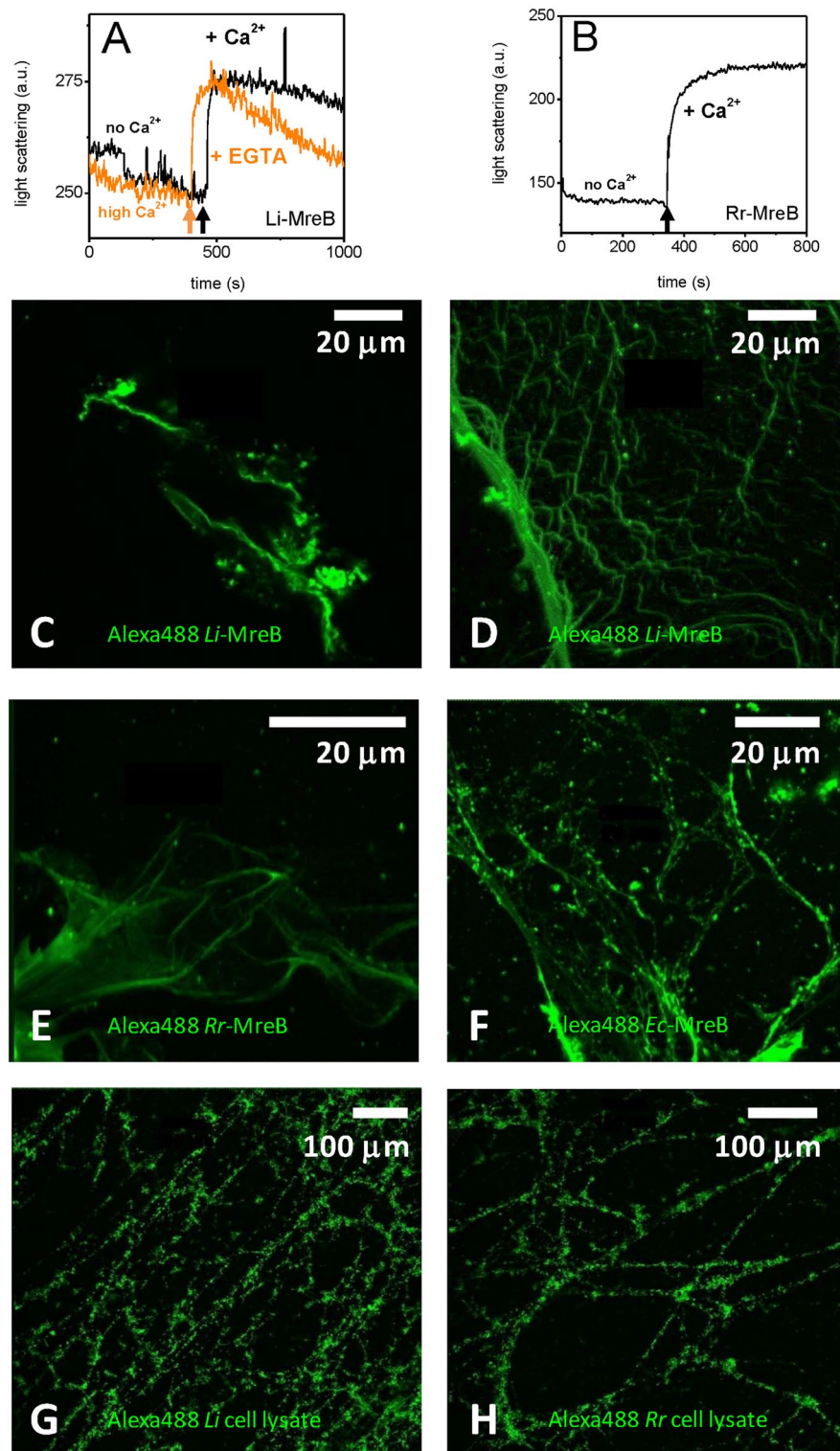


Figure 4. Rapid changes in calcium levels caused structural reorganization of MreB polymers. (A) Under high ionic conditions (300 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0.1 mM CaCl₂), 6 mM EGTA was added to polymerized *Li*-MreB (50 μM) (black line) then a 2 mM calcium addition caused a jump in light scattering. EGTA and Ca²⁺ were added in the opposite order (orange line). (B) Under high ionic conditions (300 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0.1 mM CaCl₂), 6 mM EGTA was added to *Rr*-MreB polymers (50 μM) (black line) then 2 mM Ca²⁺ treatment caused a similar response in light scattering as in case of *Li*-MreB (arrows indicate the addition of Ca²⁺ or EGTA). The initial state of MreB at the beginning of the experiment was similar to that shown in Fig. 2. (C and D) Confocal fluorescent microscope images of Alexa488-labeled *Li*-MreB polymers (C) after the consecutive application of 2 mM Ca²⁺ then 6 mM EGTA or (D) first 6 mM EGTA then 2 mM Ca²⁺. (E and F) Images of Alexa488-labeled (E) *Rr*-MreB, (F) *Ec*-MreB polymers, after consecutive application of 6 mM EGTA then 2 mM Ca²⁺. (G and H) Microscopy images of (G) *Li*-MreB or (H) *Rr*-MreB overexpressing *E. coli* cell lysates (diluted two times with distilled water and spread on glass slides) after 6 mM EGTA then 2 mM calcium addition. All cysteines of the sample were labeled with Alexa488-maleimide.

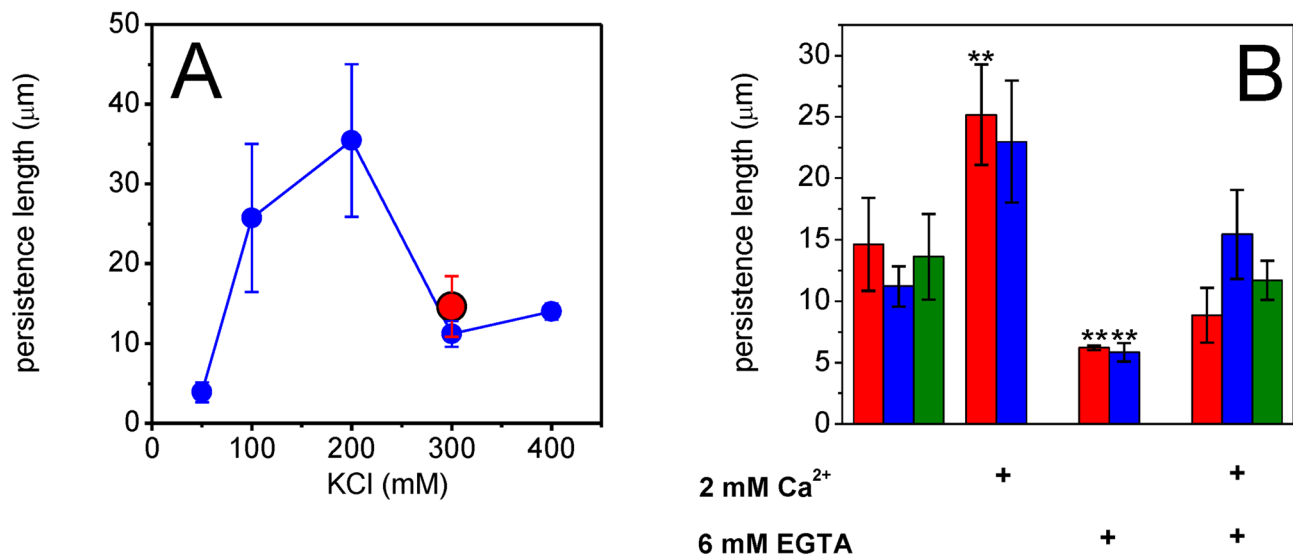


Figure 5. Persistence lengths of different MreB assemblies. (A) Analysis of microscopy images fitting with the WLC model in the Easyworm software. Alexa488-labeled *Rr*-MreB polymers were grown under different KCl conditions (50–400 mM), which reveals the longest persistence length at its polymerization optimum at 200 mM of KCl (blue circles). The persistence length of Alexa488 labeled *Li*-MreB is shorter at its polymerization optimum at 300 mM KCl (red circle). (B) The persistence length of Alexa488-labeled *Li*-MreB assemblies (red columns) changed significantly in the presence of 2 mM calcium, and in the absence of calcium by the treatment with 6 mM EGTA, and *Rr*-MreB assemblies (blue columns) showed a non-significant change in the presence of 2 mM calcium, but a significant change in the presence of 6 mM EGTA. Both assemblies show non-significant differences to the pretreated samples on subsequent addition of 2 mM calcium after EGTA treatment. The persistence length of Alexa488-labeled *Ec*-MreB assemblies (green columns) did not show a large difference on the addition of 6 mM EGTA followed by 2 mM calcium. Error bars refer to mean \pm SD of five independent measurements. Double asterisks indicate statistically significant difference relative to the initial conditions. The analysis was based on a two-sample *t*-test, $p < 0.005$.

Discussion

Here, we used two methods, ion-selective electrodes/colorimetry and flame photometry, to measure the concentrations of Na⁺, K⁺ and Ca²⁺ cell extracts, and used ion-selective electrodes/colorimetry to determine the Mg²⁺ and Cl⁻ concentrations. These methods reveal the average intracellular ion conditions and do not report inhomogeneous distributions in different areas of a cell. Nevertheless, the agreement between the Na⁺, K⁺ and Ca²⁺ levels, measured by the two techniques, suggests that these average values are accurate, and that in general the levels of sodium ions exceed potassium ions in bacteria. Bacterial cells can exchange monovalent cations with the media to adjust intracellular ionic strength during osmoadaptation⁴¹. The types of broth used here in growing bacterial cultures were major source of sodium ions. The conditions for culturing *Leptospira interrogans* (Korthof), *Escherichia coli* (Luria–Bertani) and *Bacillus subtilis* (Mueller–Hinton) contain 54, 85 and 342 mM sodium ions, respectively, which show a different relationship to the measured intracellular sodium ion concentrations, *Leptospira interrogans* (296 mM), *Escherichia coli* (219 mM) and *Bacillus subtilis* (122 mM). We measured almost identical intracellular ion concentration-derived ionic strengths in *Leptospira interrogans* (235 mM) and *Escherichia coli* (237 mM), which mainly resulted from sodium and chloride ions. The intracellular ionic strength in *Bacillus subtilis* was significantly lower (130 mM), suggesting that non-ion osmolytes may have a significant role in maintaining the osmotic balance.

The in vitro polymerization and formation of MreB superstructures is highly dependent on the presence of cations. Millimolar magnesium and hundred millimolar potassium or sodium are necessary for efficient MreB polymerization. Addition of calcium caused the stacking into ribbon-like structures and large assemblies, and we hypothesize that calcium binding may change the strain in filaments. Subsequent calcium depletion, via EGTA treatment, reordered the polymers into extensive sheets in the presence of magnesium, and further treatment with calcium led to fissured monolayer sheets and the dissociation of filaments into web-like structures (Fig. 6). Structural studies have shown that pairs of MreB protofilaments associate together in an antiparallel manner, while molecular dynamics simulations suggest the possibility of curvature in the protofilaments^{42,43}. The in vitro assemblies observed here are likely to be formed by the non-polarized filaments associating side by side. In vivo the assemblies will also be stabilized by membrane binding⁴³. Molecular dynamics simulations have shown that the twist of MreB double protofilaments can be reduced by membrane binding. The moderated dynamics of MreB filaments resulted in shorter filaments, and possibly provides tuning to their flexibility and length⁴⁴. The untwisted antiparallel structure of pairs of protofilaments can allow bending of the MreB filaments, which may stabilize the curvature of a membrane⁴⁴. High calcium concentrations⁴⁵, near a membrane, may induce longer persistence lengths in MreB polymers. Thus, we hypothesize that local calcium concentration changes may lead to the reshaping of membranes. Through calcium-ion induced stiffness, MreB filaments may contribute to

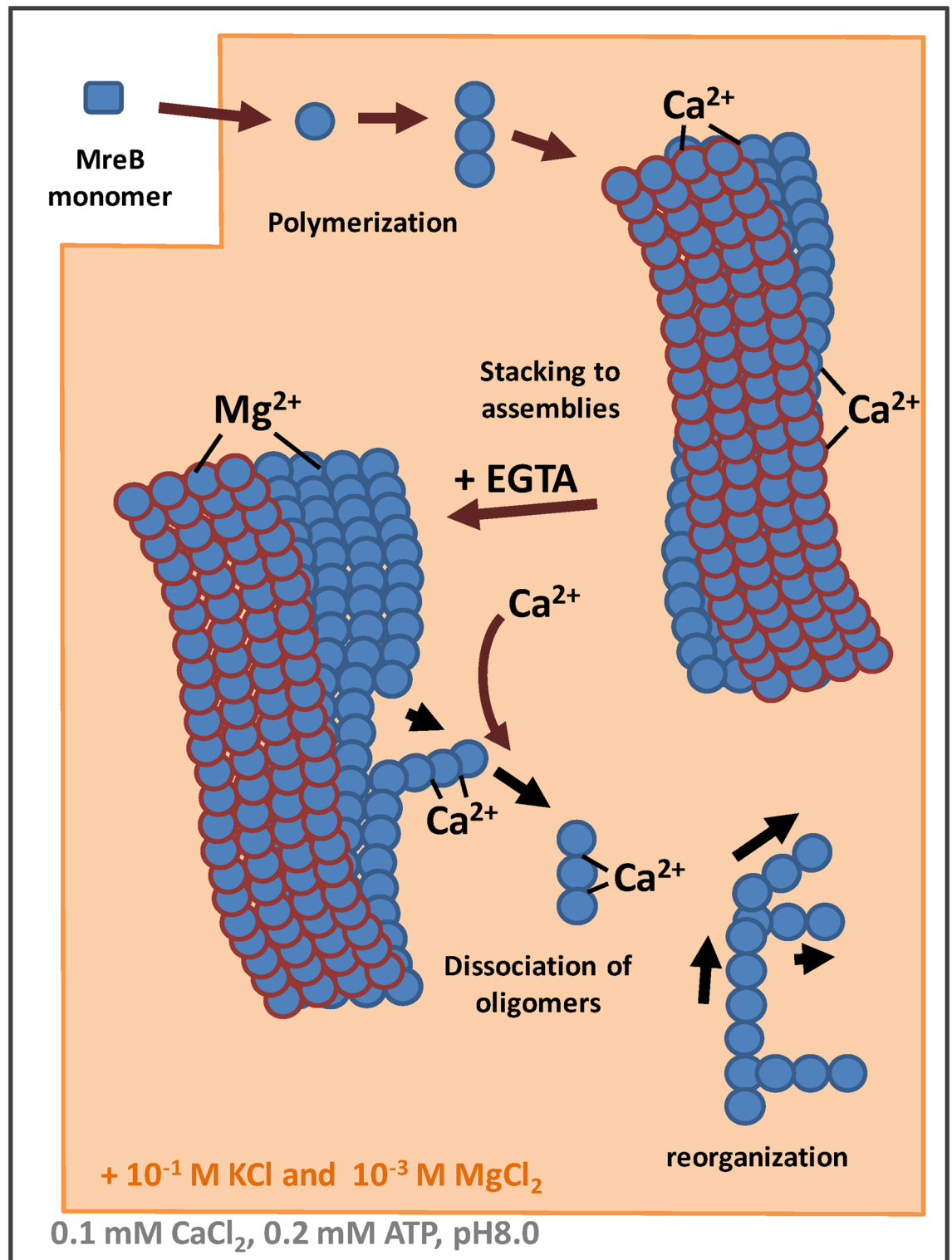


Figure 6. A hypothetical model to interpret the dynamics of MreB polymers.

specifying membrane curvature at points of membrane-MreB interaction (Supp. 4). Presumably, the final cell shape will be a product of the MreB properties and the ionic milieu. Calcium concentration-induced changes of MreB structure may also participate in membrane remodelling during cell division or osmotic adaptation. Rr-MreB polymerization is more sensitive to monovalent cations than Li-MreB, which suggests that the shape and stability of cytoskeletal systems will vary between organisms under similar intracellular conditions. Since, the high salt conditions present in bacteria fluctuate in response to osmotic shock, the influence on the stability of MreB scaffold and its ability to reattach bacterial membranes to cell wall is likely to be affected by divalent cations.

Varying ionic conditions do not in general change cell shape, however they are known to modify membrane stiffness and enzyme activity, which effects the stability of bacterial envelope⁴⁶. However, the effect of calcium levels appears to be more sensitive. It is likely that calcium fluxes may have a role in regulating and remodelling the in vivo MreB cytoskeleton, which in turn may influence the mobility and localization of links between the membrane and cell wall during the cell division.

One of the limitations of our study is that due to the limited number of species analyzed, it is not clear whether the differences seen are species specific or common features of several relative strains. But we highlighted the relevance of intracellular ion conditions influence on MreB polymer formation.

Methods

Determination of intracellular ion concentrations. The *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* and *Leptospira interrogans* cells (gifts from the Department of Medical Microbiology and Immunology) were grown until OD_{600nm} = 1 in suitable media. Luria–Bertani broth for *E. coli*: 10 g/L tryptone, 5 g/L yeast extract, 5 g/L NaCl; Mueller–Hinton broth for *B. subtilis*: 2 g/L meat infusion, 17.5 g/L casein hydrolysate, 1.5 g/L starch; Korthof broth for *L. interrogans*: 1.4 g/L NaCl, 0.88 g/L Na₂HPO₄, 0.8 g/L peptone, 0.24 g/L KH₂PO₄, 0.04 g/L CaCl₂, 0.04 g/L KCl, 0.02 g/L NaHCO₃, added rabbit serum and rabbit hemoglobin (sterile 8 mL inactivated blood serum and 0.8 mL sterile haemoglobin solution were added in 100 mL broth).

Cells were harvested by centrifugation (4500 × g for 10 min), then the extracellular medium was removed by washing. Five times the pellet volume of distilled water was added, incubated for 2 min at RT, and subsequently inverted gently ten times and centrifuged again (4500 × g for 10 min). The pellet volume was measured in a scaled 2 mL Eppendorf tube. Cells killed and the extracellular water was evaporated by heat treatment (100 °C for 20 min). The cell pellets were resuspended in five times the pellet volume of water, frozen and subsequently boiled to generate a homogenous cell lysate. The slurry was centrifuged for 10 min at 100,000 × g. Ion concentrations were measured from the supernatants. Unbound Na⁺, K⁺, Cl⁻ (ion-selective electrode) Ca²⁺ and Mg²⁺ (colorimetry) levels were analyzed using a COBAS INTEGRA 400 plus analyzer (Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Germany) following the manufacturer's instructions. Total (protein-bound and free) Na⁺, K⁺ and Ca²⁺ were also measured by flame photometry (Efox 5053/Eppendorf). The intracellular ion concentrations are equal to five times of measured values. The final ionic strength (IS) was derived using the following equation:

$$[IS] = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n c_i z_i \quad (1)$$

where c_i and z_i are the molar concentrations and charge of the ions, respectively.

Expression of MreB. The *Leptospira interrogans* MreB gene (gene bank accession number: AAS69864.1), the *Rickettsia rickettsii* MreB gene (gene bank accession number: ABY73136.1) and the *Escherichia coli* MreB gene (gene bank accession number: AJF45056.1) sequences were codon optimized for expression in *E. coli*, synthesized (GenScript) and engineered into the pSY5 plasmid which encodes an 8-histidine tag, followed by a PreScission protease (GE Healthcare Life Sciences) cleavage site prior to the protein sequence. The construct was verified by DNA sequencing. The DNA construct encoding MreB was transformed into *E. coli* BL21 DE3 pLysS strain (Novagen). Cell cultures were grown in Luria Broth medium at 37 °C supplemented with ampicillin until reaching OD₆₀₀ = 0.6. Protein expression was induced by adding IPTG to a final concentration of 1 mM followed by incubation overnight at 20 °C. Cells were harvested by centrifugation and pellets were stored at -20 °C³⁹.

Purification of MreB. We used a novel method for the isolation of MreB polymers, which we refer to as the polymer filtration (PF) method. *E. coli* cell pellets were resuspended in a buffer consisting of 2 mM TRIS.HCl, 50–300 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0.1 mM CaCl₂, 0.2 mM ATP, 1 mM DTT (pH 8.0). The slurry was treated with DNase (0.01 U/mL) (PanReac, AppliChem) and lysozyme (0.01 mg/mL) (Sigma-Aldrich) overnight at 4 °C. MreB polymers (Supp. 3C) were filtered first on a paper filter and then washed and filtered again on a 0.45 μm membrane filter. The purity of MreB stocks were assessed with SDS-PAGE (Supp. 1) (Supp. 1C was cropped from Supp. 3D).

For the comparison of MreB polymers prepared by the PF method, we also purified MreB monomers on a Ni–NTA column under denaturing conditions with minor changes of protocol what we published before³⁹. A cell pellet was resuspended and homogenized in a denaturing lysis buffer (6 M guanidine-HCl, 0.1 M NaH₂PO₄, 10 mM TRIS.HCl, pH 8.0). After centrifugation (30,000 × g at 4 °C for 2 h) the supernatant was loaded onto a Ni–NTA column and incubated overnight at 4 °C. Then the column was washed with a buffer containing 8 M urea, 0.1 M NaH₂PO₄, 10 mM TRIS.HCl. A descending pH gradient from pH 8.0 to 4.0 was applied to elute the protein. MreB containing fractions were pooled and dialyzed overnight against a buffer containing 2 mM TRIS.HCl, 0.1 mM CaCl₂, 0.2 mM ATP, 1 mM DTT, pH 8.0) in order to refold the MreB monomers. The re-natured MreB were clarified by ultracentrifugation (100,000 × g, 4 °C, 30 min). The MreB stocks were either used immediately or flash-frozen with liquid nitrogen in small volumes. Concentrations of MreBs were determined by Bradford Assay (Bio-Rad) using a Jasco v-660 photometer (Jasco Corporation).

Fluorescent labeling of MreB. The cysteines of MreBs were labeled with Alexa Fluor 488 C5 maleimide or with Alexa Fluor 568 C5 maleimide. Prior to initiating of the labeling reaction, DTT was removed from the solution by overnight dialysis. Next, MreB polymers were incubated in the presence of fivefold molar excess of the fluorophore for 1 h on ice. The excess fluorophore was removed by overnight dialysis. However, labeled

MreB polymers were not but monomers were clarified by ultracentrifugation ($100,000\times g$, at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 30 min) and the concentrations of protein and fluorophore in the supernatant were determined using spectrophotometry ($\epsilon_{\text{Alexa488}} = 73,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$, $\epsilon_{\text{Alexa568}} = 88,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$, $\epsilon_{\text{LiMreB}} = 10,555\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$, $\epsilon_{\text{RrMreB}} = 15,025\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$, $\epsilon_{\text{EcMreB}} = 7575\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$). The ratio of labeling was calculated as the concentration ratio of the probe to the protein and was found to be approximately 0.1 in cases of MreB polymers and more than 0.5 in case of monomers.

In vitro polymerization and polymer remodelling assays of MreB. The polymerization kinetics of MreB was investigated using light scattering assays with a Perkin Elmer LS-50 spectrofluorimeter. The excitation and emission monochromators were set to wavelength 400 nm and the excitation and emission slits to 2.5 nm. The samples (2 mL) were stirred continuously with a magnetic stirrer during the polymerization process. Polymerization was initiated by adding monovalent and/or divalent cations, as indicated. The same set up was used to study the time dependent and ionic concentration dependent morphology changes of MreB polymers. The settings for the method based on our protocol and experience³⁹.

Fluorescence microscopy. In these experiments 15 μL of fluorescent labeled MreB was dropped on slides, incubated in the presence of a buffer containing 300 mM KCl, 2 mM MgCl_2 , 0.1 mM CaCl_2 , unless otherwise indicated, then covered by coverslips. The morphologies of the labeled MreB assemblies were analyzed using a Leica TCS SP confocal scanning microscope system (Leica Microsystems GmbH Germany) equipped with a 10-63X objective lens. Image acquisition was carried out a fluorescent-probe specific wavelengths, Alexa488 (ex.: 488 nm, em.: 515–560 nm) and with Alexa568 (ex.: 543 nm, em.: 600–700 nm). The typical vertical stacking height of images was 1–3 μm .

Determination of persistence length of MreB assemblies. To determine the persistence length of the filaments we used *Easyworm*, an open-source software tool used to determine the mechanical properties of protein chains (Lamour et al.; licensee BioMed Central Ltd. 2014), coded in MATLAB⁴⁷. Representative confocal microscopy images were selected and fitted with the worm-like chain (WLC) model. Resultant persistence lengths (L_p) were calculated from the function of End2End length versus contour length of assemblies.

Data analysis. Data are presented as means \pm standard deviations (SD) throughout. Comparisons were performed using Students *T*-test and statistically significant differences between groups were defined as *p* values < 0.05 or < 0.005 and are indicated in the legends of figures.

Data availability

The datasets generated during and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Received: 13 January 2020; Accepted: 8 June 2020

Published online: 20 July 2020

References

- Sleator, R. D. & Hill, C. Bacterial osmoadaptation: the role of osmolytes in bacterial stress and virulence. *FEMS Microbiol. Rev.* **26**, 49–71. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2002.tb00598.x> (2002).
- Christian, J. H. & Waltho, J. A. The sodium and potassium content of non-halophilic bacteria in relation to salt tolerance. *J. Gen. Microbiol.* **25**, 97–102. <https://doi.org/10.1099/00221287-25-1-97> (1961).
- Csonka, L. N. The role of proline in osmoregulation in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *Basic Life Sci.* **18**, 533–542 (1981).
- Dinnbier, U., Limpinsel, E., Schmid, R. & Bakker, E. P. Transient accumulation of potassium glutamate and its replacement by trehalose during adaptation of growing cells of *Escherichia coli* K-12 to elevated sodium chloride concentrations. *Arch. Microbiol.* **150**, 348–357 (1988).
- Record, M. T. Jr., Courtenay, E. S., Cayley, D. S. & Guttman, H. J. Responses of *E. coli* to osmotic stress: large changes in amounts of cytoplasmic solutes and water. *Trends Biochem. Sci.* **23**, 143–148 (1998).
- Record, M. T. Jr., Courtenay, E. S., Cayley, S. & Guttman, H. J. Biophysical compensation mechanisms buffering *E. coli* protein-nucleic acid interactions against changing environments. *Trends Biochem. Sci.* **23**, 190–194 (1998).
- Brown, A. D. Microbial water stress. *Bacteriol. Rev.* **40**, 803–846 (1976).
- Yancey, P. H., Clark, M. E., Hand, S. C., Bowlus, R. D. & Somero, G. N. Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science* **217**, 1214–1222 (1982).
- Shabala, L. et al. Ion transport and osmotic adjustment in *Escherichia coli* in response to ionic and non-ionic osmolytes. *Environ. Microbiol.* **11**, 137–148. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01748.x> (2009).
- Whatmore, A. M., Chudek, J. A. & Reed, R. H. The effects of osmotic upshock on the intracellular solute pools of *Bacillus subtilis*. *J. Gen. Microbiol.* **136**, 2527–2535 (1990).
- Vollmer, W. & Seligman, S. J. Architecture of peptidoglycan: more data and more models. *Trends Microbiol.* **18**, 59–66. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2009.12.004> (2010).
- Jones, L. J. F., Carballido-Lopez, R. & Errington, J. Control of cell shape in bacteria: helical, actin-like filaments in *Bacillus subtilis*. *Cell* **104**, 913–922. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00287-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00287-2) (2001).
- Vats, P. & Rothfield, L. Duplication and segregation of the actin (MreB) cytoskeleton during the prokaryotic cell cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 17795–17800. <https://doi.org/10.1073/pnas.0708739104> (2007).
- Dominguez-Escobar, J. et al. Processive movement of MreB-associated cell wall biosynthetic complexes in bacteria. *Science* **333**, 225–228. <https://doi.org/10.1126/science.1203466> (2011).
- Garner, E. C. et al. Coupled, circumferential motions of the cell wall synthesis machinery and MreB filaments in *B. subtilis*. *Science* **333**, 222–225. <https://doi.org/10.1126/science.1203285> (2011).
- van Teeffelen, S. et al. The bacterial actin MreB rotates, and rotation depends on cell-wall assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**, 15822–15827. <https://doi.org/10.1073/pnas.1108999108> (2011).

17. White, C. L., Kitich, A. & Gober, J. W. Positioning cell wall synthetic complexes by the bacterial morphogenetic proteins MreB and MreD. *Mol. Microbiol.* **76**, 616–633. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07108.x> (2010).
18. Kawai, Y. *et al.* A widespread family of bacterial cell wall assembly proteins. *EMBO J.* **30**, 4931–4941. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.358> (2011).
19. Pilizota, T. & Shaevitz, J. W. Fast, multiphase volume adaptation to hyperosmotic shock by *Escherichia coli*. *PloS one* <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035205> (2012).
20. Morgenstein, R. M. *et al.* RodZ links MreB to cell wall synthesis to mediate MreB rotation and robust morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **112**, 12510–12515. <https://doi.org/10.1073/pnas.1509610112> (2015).
21. Rojas, E., Theriot, J. A. & Huang, K. C. Response of *Escherichia coli* growth rate to osmotic shock. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **111**, 7807–7812. <https://doi.org/10.1073/pnas.1402591111> (2014).
22. Pilizota, T. & Shaevitz, J. W. Origins of *Escherichia coli* growth rate and cell shape changes at high external osmolality. *Biophys. J.* **107**, 1962–1969. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.08.025> (2014).
23. Iwai, N., Nagai, K. & Wachi, M. Novel S-benzylisothiourea compound that induces spherical cells in *Escherichia coli* probably by acting on a rod-shape-determining protein(s) other than penicillin-binding protein 2. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66**, 2658–2662. <https://doi.org/10.1271/bbb.66.2658> (2002).
24. Bendezu, F. O. & de Boer, P. A. J. Conditional lethality, division defects, membrane involution, and endocytosis in mre and mrd shape mutants of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **190**, 1792–1811. <https://doi.org/10.1128/Jb.01322-07> (2008).
25. Furchtgott, L., Wingreen, N. S. & Huang, K. C. Mechanisms for maintaining cell shape in rod-shaped Gram-negative bacteria. *Mol. Microbiol.* **81**, 340–353. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07616.x> (2011).
26. van Teeffelen, S. & Gitai, Z. Rotate into shape: MreB and bacterial morphogenesis. *EMBO J.* **30**, 4856–4857. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.430> (2011).
27. Auchus, R. J. *et al.* Guidelines for the development of comprehensive care centers for congenital adrenal hyperplasia: guidance from the CARES foundation initiative. *Int. J. Pediatr. Endocrinol.* **2010**, 275213. <https://doi.org/10.1155/2010/275213> (2010).
28. Figge, R. M., Divakaruni, A. V. & Gober, J. W. MreB, the cell shape-determining bacterial actin homologue, co-ordinates cell wall morphogenesis in *Caulobacter crescentus*. *Mol. Microbiol.* **51**, 1321–1332. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2003.03936.x> [MMI3 936\[pil\]](https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2003.03936.x) (2004).
29. Madabhushi, R. & Mariani, K. J. Actin homolog MreB affects chromosome segregation by regulating topoisomerase IV in *Escherichia coli*. *Mol. Cell* **33**, 171–180. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.01.001> (2009).
30. Strahl, H., Burmann, F. & Hamoen, L. W. The actin homologue MreB organizes the bacterial cell membrane. *Nat. Commun.* <https://doi.org/10.1038/Ncomms4442> (2014).
31. Nurse, P. & Mariani, K. J. Purification and characterization of *Escherichia coli* MreB protein. *J. Biol. Chem.* **288**, 3469–3475. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.413708> (2013).
32. Esue, O., Cordero, M., Wirtz, D. & Tseng, Y. The assembly of MreB, a prokaryotic homolog of actin. *J. Biol. Chem.* **280**, 2628–2635. <https://doi.org/10.1074/jbc.M410298200> (2005).
33. Holland, I. B., Jones, H. E., Campbell, A. K. & Jacq, A. An assessment of the role of intracellular free Ca²⁺ in *E. coli*. *Biochimie* **81**, 901–907. [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(00\)87175-8](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(00)87175-8) (1999).
34. Liu, P. *et al.* Chemotaxis without conventional two-component system, based on cell polarity and aerobic conditions in helicity-switching swimming of *Spiroplasma eriocheiris*. *Front. Microbiol.* **8**, 58. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00058> (2017).
35. Slamti, L., de Pedro, M. A., Guichet, E. & Picardeau, M. Deciphering morphological determinants of the helix-shaped *Leptospira*. *J. Bacteriol.* **193**, 6266–6275. <https://doi.org/10.1128/Jb.05695-11> (2011).
36. Neuhofer, W., Bartels, H., Fraek, M. L. & Beck, F. X. Relationship between intracellular ionic strength and expression of tonicity-responsive genes in rat papillary collecting duct cells. *J. Physiol.* **543**, 147–153 (2002).
37. Voets, T., Droogmans, G., Raskin, G., Eggermont, J. & Nilius, B. Reduced intracellular ionic strength as the initial trigger for activation of endothelial volume-regulated anion channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 5298–5303 (1999).
38. Biemans-Oldehinkel, E., Mahmood, N. A. & Poolman, B. A sensor for intracellular ionic strength. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 10624–10629. <https://doi.org/10.1073/pnas.0603871103> (2006).
39. Barko, S. *et al.* Large-scale purification and in vitro characterization of the assembly of MreB from *Leptospira interrogans*. *BBA Gen. Subj.* **1942–1952**, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.06.007> (1860).
40. Isambert, H. *et al.* Flexibility of actin-filaments derived from thermal fluctuations—effect of bound nucleotide, phalloidin, and muscle regulatory proteins. *J. Biol. Chem.* **270**, 11437–11444. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.19.11437> (1995).
41. Whatmore, A. M., Chudek, J. A. & Reed, R. H. The effects of osmotic upshock on the intracellular solute pools of *Bacillus subtilis*. *J. Gen. Microbiol.* **136**, 2527–2535. <https://doi.org/10.1099/00221287-136-12-2527> (1990).
42. Colavin, A., Hsin, J. & Huang, K. C. Effects of polymerization and nucleotide identity on the conformational dynamics of the bacterial actin homolog MreB. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **111**, 3585–3590. <https://doi.org/10.1073/pnas.1317061111> (2014).
43. van den Ent, F., Izore, T., Bharat, T. A. M., Johnson, C. M. & Lowe, J. Bacterial actin MreB forms antiparallel double filaments. *Elife*. <https://doi.org/10.7554/eLife.02634> (2014).
44. Shi, H., Quint, D. A., Grason, G. M., Gopinathan, A. & Huang, K. C. Chiral twisting in a bacterial cytoskeletal polymer affects filament size and orientation. *Nat. Commun.* **11**, 1408. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14752-9> (2020).
45. Dominguez, D. C. Calcium signalling in bacteria. *Mol. Microbiol.* **54**, 291–297. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04276.x> (2004).
46. Brown, A. D. Aspects of bacterial response to the ionic environment. *Bacteriol. Rev.* **28**, 296–329 (1964).
47. Lamour, G., Kirkegaard, J. B., Li, H., Knowles, T. P. & Gsponer, J. Easyworm: an open-source software tool to determine the mechanical properties of worm-like chains. *Source Code Biol. Med.* **9**, 16. <https://doi.org/10.1186/1751-0473-9-16> (2014).

Acknowledgements

This work was supported by a grant from the National Research, Development and Innovation Office and the European Union (GINOP-2.3.3-15-2016-00025, GINOP-2.3.2-15-2016-00049 and EFOP-3.6.1-16-2016-00004) and by the Hungarian Science Foundation (OTKA Grant K112794 to MN). The present scientific contribution is dedicated to the 650th anniversary of the foundation of the University of Pécs, Hungary. Special thanks to István Németh for the help in flame photometry.

Author contributions

D.S.: made substantial contributions to the conception; design of the work; the acquisition, analysis; interpretation of data; P.S.: made substantial contributions to the conception; the acquisition, analysis; B.K.: contributed to the acquisition, analysis; interpretation of data; T.N.: made substantial contributions to the conception; interpretation of data; A.M.: contributed to the design of the work; interpretation of data; and was involved in drafting and substantively revising the work; S.B.: contributed to the acquisition, analysis; interpretation of data; B.L.: contributed to the acquisition, analysis; interpretation of data; R.C.R.: contributed to the interpretation of data;

and was involved in drafting and substantively revising the work; M.N.: Contributed to the design of the work; the acquisition, analysis; interpretation of data; and was involved in drafting and substantively revising the work.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary information is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68960-w>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to M.N.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2020