

Ph.D. értekezés tézisei

A MreB, mint bakteriális aktin vizsgálata biofizikai módszerekkel

Szajkóné Longauer Beáta

2023

Témavezetők: Prof. Dr. Nyitrai Miklós

Dr. Huberné Dr. Barkó Szilvia

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



Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Biofizikai Intézet

BEVEZETÉS

A MreB egy prokarióta aktin fehérje, nevét a sejtfal 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 [1]. Kromoszómán kódolt fehérje, amely a *mre* lókuszon helyezkedik el. Az eukarióta aktin ortológ MreB filamentumok közvetlenül szabályozzák a sejtalakot, szerepet játszanak a morfogenezisben [2, 3], sejtsztódásban, sejtfalszintézisben, sejt polaritás kialakításában, fehérje lokalizációban, sejtorganelumok elhelyezkedésében, ezen kívül a kromoszómaszegregációban és a replikációban.[4, 5].

Fényszóráson alapuló polimerizációs kísérletek bizonyították, hogy a MreB fehérjék képesek ATP, AMP-PNP, GTP, vagy ADP jelenlétében polimerizálódni [6-9]. *Bacillus subtilis* esetén megfigyeltek nukleotid-független polimerizációt is [8]. A MreB irodalmat csoportosíthatjuk az alkalmazott pufferkörülmények szerint. Vannak olyan kutatócsoportok, akik a kísérleteket sómentes pufferben végezték [6, 8, 9], mások pedig magas sótartalmú pufferben renaturált fehérjén dolgoztak és nukleotid hozzáadásával kezdeményezték a polimerizációt [7, 10-12]. 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 [13]. 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. Ezen felül a nukleotid kötés a MreB polimerizációja során befolyásolja a kritikus koncentrációt. Ugyanígy a hőmérséklet is növeli a kritikus koncentrációt, és magasabb hőmérsékleten a MreB polimerizációja gyorsabb lesz [6].

Az eukarióta aktin esetén leírták, hogy a polimerizáció során megkülönböztetünk egy zárt (polimerben lévő monomer esetén) és egy nyitott (monomerre jellemző) konformációt [14]. A polimerizáció során a *Leptospira interrogans* MreB filamentum zártabbá válik, és 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 szuperstruktúrák kialakulása zajlik. A molekuláris dinamika szimulációk alátámasztják azt a hipotézist, miszerint a *Thermotoga maritima* MreB konformációs változásai hasonlóak [13]. A polimerizáció során kialakuló filamentumok szerkezeti változásainak vizsgálatához Colavin és kutatócsoportja [13] szimulációs mérésekkel 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. 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. Tehát végső soron a hidrolízis vezethet a filamentumok kiegyenesedéséhez [13]. 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 [15]. A nukleotid állapot szintén befolyásolhatja az MreB affinitását más fehérjékhez, amint azt az aktin és az aktin-kötő fehérjék között megfigyelték [16].

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 [17]. A sóhidak stabilizálják a fehérje szerkezetét, ezáltal az képes lesz ellenállni a külső behatásoknak, olvadásnak, vagy kitekeredésnek magasabb hőmérsékleten. A közeli sóhidak együttműködve és kölcsönösen erősítik egymást, és növelik a stabilitást. A sóhidak összetarthatják és merevíthetik a fehérjestruktúrákat [17]. 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 [18].

Az általunk vizsgált *Thermotoga maritima* MreB egyetlen triptofán aminosavat tartalmaz, 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.

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 sejtfa kialakulását gátolják, de a már létrejött sejtfa nincs hatásuk, tehát csak a szaporodást akadályozzák meg. Az alapján, hogy mely sejtfolymatokon keresztül gátolnak, hat nagy csoportba oszthatjuk őket: sejtfa szintézis gátló antibiotikumok, fehérje bioszintézis gátlók, membrán funkciót gátlók, nukleinsav-szintézis gátló antibiotikumok, anyagcsere útvonalat gátlók, ATP-szintáz gátló antibiotikumok [19]. 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 prekuzora. 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-hídkötés stabilizálja [20]. A vankomicin egy nagy hidrofíll molekula, amely nem transzportálódik a membrán porin molekuláin, és nem diffundál szabadon a külső membránon [21], ezért Gram-negatív baktériumokkal szemben hatástalan, mert be sem tud jutni a sejtbe. Fluoreszcensen jelölt antibiotikummal könnyebben nyomon követhető az antibiotikum hatásmechanizmusa a sejten belül, vagy akár az élő szervezetben [22]. 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 [23]. A BODIPY azonban viszonylag kisebb mérete, és neutralitása miatt a minimális gátlókoncentrációt sem növelte meg olyan mértékben, mint a fluoreszcenssel jelölt antibiotikum [23].

A másik általunk tanulmányozott antimikrobiális vegyület az A22, amely közvetlenül a MreB fehérjén fejt ki a hatását, és annak blokkolásával megakadályozza a baktériumsejt növekedését, szaporodását. Az A22 (S-(3,4-diklorobenzil) izotiourea) S-benzilizotiourea származék. [24, 25]. Az A22 mikromoláros érzékenységgel kötődik a MreB-hez (minimális gátlókoncentráció: ~13 µg/ml), és a polimerizáció folyamatába avatkozik be [26]. Emellett gátolja a baktérium mozgékonyágát, felülethez tapadását, és a biofilm képzését, amely tulajdonságok szükségesek a bakteriális fertőzések és az antibiotikum rezisztencia kialakulásához [27, 28]. *Awuni és munkatársai* molekula dinamikai szimulációkban megállapították, hogy az A22 a MreB nukleotid kötő zsebe melletti árokba köt [29], és kötési affinitása 20-30-szor nagyobb di- és trinukleotid foszfátok jelenlétében [25]. 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. [29]. Irodalmi adatok arra utalnak, hogy az A22 kezelés hatására a MreB *in vivo*, sejten belüli helikális lokalizációja megszűnik, depolimerizálódik, ami a MreB diffúzió elhelyezkedését okozza a citoplazmában, és a pólcaalak illetve az életképesség elvesztéséhez vezet [4, 26, 30]. Az A22-nek bakteriosztatikus hatása van. Ugyanis *Caulobacter crescentus* faj esetén az A22 10 µg/ml (~50µM) koncentrációban lassította a sejtek növekedését, amelyek a szer hatására gömbölyű formát vettek fel. Viszont 100µg/ml koncentráció már leállította a sejtnövekedést, de nem okozott változást a sejtek alakjában [30]. Az A22 gátolja a biofilm képződést, ami nagyban hozzájárul a baktériumok fertőzőképességéhez. Feltételezhető, hogy az A22 vegyület a tapadás kezdeti szakaszában hat, befolyásolva a biofilm fejlődés alapvető paramétereit, például a baktériumok mozgékonyágát, a kitapadást a felszínre. Mivel az A22 vegyület a bakteriális sejttel MreB fehérjéjére hatva megváltoztatja a sejtalakot, feltételezhető, hogy a sejt olyan részeit is, mint a flagella és a fimbria destabilizálhatja vagy szétbonthatja, befolyásolva a baktériumok mozgási képességét. [27]. 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 [31].

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 [6, 11, 32].

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 [10], ráadásul tartalmaz egy spektroszkópos szempontból jól vizsgálható triptofán aminosavat is.

Disszertációm második felében az A22 és vankomicin hatásait vizsgáltuk az előzőekben leírt módon előállított *Tm*-MreB fehérjén. 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 tesztek 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 tesztek tervezünk, amit mikrobiológiai módszerekkel támasztottunk alá.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Thermotoga maritima MreB fehérje natív preparálás

A *Thermotoga maritima* MreB-t tartalmazó plazmidot ArcticExpress (DE3) (Agilent Technologies) kompetens sejtbe transzformáltuk. 100 μ l kompetens sejthez 2 μ l 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 μ l 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 μ l sejt kultúrát szélesztettünk kettős rezisztenciát tartalmazó plate-re (gentamicin: 20 μ g/ml és ampicillin: 100 μ g/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 μ g/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 μ g fehérje), amit a fehérje mellett hagyunk 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 M⁻¹cm⁻¹.

Funkcionalitás vizsgálatok

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 MgCl₂, 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.

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 enzimátikus 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.

Triptofán fluoreszcencia mérések

20 μM *Tm*-MreB vagy 20 μM triptofán aminosavat mértünk sómentes (4 mM TRIS-HCl, 0,1 mM CaCl₂, 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.

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 CaCl₂, 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 küvetta tartóval felszerelt Jobin Yvon Horiba fluoriméteren végeztük.

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.

Nukleotid kötés, leszorítás vizsgálata TNP-ATP-vel

Az ATP kötéset 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.

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

Az ATP kompetíció vizsgálatához 20 μM *Tm*-MreB-t egy éjszakán át sómentes (4 mM TRIS-HCl, 0,1 mM CaCl_2 , pH 7,5) környezetben 1 μM 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 [35].

Steady-state anizotrópia

A méréseket Jobin Yvon Horiba fluoriméteren végeztük. A kötődés vizsgálatához 1 μM 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:

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

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.

Mikroszkópiai mérések

MreB filamentumok vizsgálata

20 μ M *Tm*-MreB fehérjét polimerizáltunk magas sós pufferben, 100 μ M 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 sejtuszpenziókat lecentrifugáltunk (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 μ 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)

Baktériumpopuláción végzett mikrobiológiai tesztek

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.

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. Amennyiben ΣFICI ≤ 0,5, szinergizmusról beszélhetünk, tehát a két antibakteriális szer támogatja egymás hatását.

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

EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

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 sejtvonala 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 sejt típusok (DE3; DE3 pLysS, Rosetta) esetén tapasztaltuk. Érdekes kiemelni, hogy endogénean expresszált chaperon fehérjéket tartalmaz a rendszer, ami biztosítja a fehérje normál feltekeredését, azaz elősegíti a natív konformáció kialakulását az expresszió során.

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 [36]. *Thermotoga maritima* esetén sóhíd alakul ki a K49-es és E204-es aminosavak között [10]. Mivel az egyik aminosav ezek közül a *Tm* - MreB D-hurokján található, fontos szerepe lehet a polimerizáció során bekövetkező konformációváltozásban. Véleményünk szerint a sejtlyízis 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 sóhíd által kiváltott termikus stabilitás növekedést más hőmérséklettűrő fehérjék esetén is leírták [17]. Másrészt a MreB-nek vélhetően más kötőpartnerei is vannak, amik stabilizálják a fehérjét a citoplazmán belül.

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 [37]. Az aktin Trp-79 triptofán aminosava a leginkább hozzáférhető az oldószer számára az aktin másik három triptofán aminosavához képest. A *Tm-MreB* egyetlen triptofánja 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 μM -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 μM 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 sejtben. A fehérje tehát elkezd összeépülni, oligomereket alkotni, ahogy a mikroszkópos és szedimentációs tesztek is alátámasztották. Azonban ez nem a MreB megfelelő, natív állapota a sejtben. 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 alkalmaztak. Leírtuk, hogy különböző körülmények között milyen affinitással köt a BODIPY-vankomicin a *Tm-MreB*-hez. Ezek a kötési arányok (4-8 μM) 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.

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 sóhíd 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 következtettünk, 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 [25][26]. 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 esszékkal 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.

IRODALOMJEGYZÉK

- [1] R. Carballido-López, “The bacterial actin-like cytoskeleton,” *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 70, no. 4, pp. 888–909, 2006.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] J. W. Shaevitz and Z. Gitai, “The structure and function of bacterial actin homologs,” *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2010.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] P. Nurse and K. J. Marians, “Purification and characterization of *Escherichia coli* MreB protein,” *J. Biol. Chem.*, vol. 288, no. 5, 2013.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] D. Popp *et al.*, “Filament structure, organization, and dynamics in MreB sheets,” *J. Biol. Chem.*, vol. 285, no. 21, pp. 15858–15865, 2010.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] C. G. Dos Remedios *et al.*, “Actin binding proteins: Regulation of cytoskeletal microfilaments,” *Physiological Reviews*, vol. 83, no. 2. 2003.

- [17] 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.
- [18] 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.
- [19] S. Kirmusaoğlu, *Antimicrobials, Antibiotic Resistance, Antibiofilm Strategies and Activity Methods*. 2019.
- [20] 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.
- [21] 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.
- [22] S. Feng *et al.*, "Real-Time In Vivo Detection and Monitoring of Bacterial Infection Based on NIR-II Imaging," *Front. Chem.*, vol. 9, 2021.
- [23] 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.
- [24] 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.
- [25] 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.
- [26] G. J. Bean *et al.*, "A22 disrupts the bacterial actin cytoskeleton by directly binding and inducing a low-affinity state in MreB," *Biochemistry*, 2009.
- [27] 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.
- [28] E. Awuni, "Status of Targeting MreB for the Development of Antibiotics," *Frontiers in Chemistry*, vol. 7, 2020.
- [29] 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.
- [30] 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.
- [31] 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.
- [32] 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.
- [33] 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.
- [34] 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.
- [35] 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.
- [36] 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.
- [37] 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.

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

Szutmári, 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, Szutmári Dávid, Barkó Szilvia, Nyitrai Miklós: Eltérő hatásmechanizmusú antibakteriális vegyületek hatása a bakteriális citoskeletonra. 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 Szutmári, 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 poszterek

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 sejtváznak 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 sejtváznak vizsgálata biofizikai módszerekkel.

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

Az értekezéshez szorosan nem kapcsolódó poszterek

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, Emoke Bodis, David Szatmari and Miklos Nyitrai: Phalloidin binds to MreB from *Leptospira interrogans*.

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