

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM

Biológiai és Sportbiológiai Doktori Iskola

Primycin termelő ipari baktérium törzs polifázikus azonosítása, a hatóanyag jellemzése és *in vitro* vizsgálata

PhD értekezés tézisei

Pénzes-Húvös Ágota

Témavezetők:

Dr. habil. Fekete Csaba, Tanszékvezető egyetemi docens

Általános és Környezeti Mikrobiológiai Tanszék

Prof. Dr. Pongrácz E. Judit, Intézetvezető egyetemi tanár

Gyógyszerészi Biotechnológia Intézet



Pécs, 2019

Bevezetés

Túlzás nélkül állítható, hogy az antibiotikumok felfedezése majd széles körű elterjedése nem csupán az orvosi gyakorlatban, a fertőző betegségek elleni küzdelemben jelentett áttörés, hanem máig ható módon döntő befolyást gyakorolt az emberi történelem menetére is [1]. A huszadik század közepén, amit az antibiotikumok aranykorának tartunk, az antibiotikumok a bakteriális fertőzések végleges gyógyszereinek tűntek, azonban hamar kiderült, hogy az antibiotikumok nem bizonyulnak mindenható gyógyszereknek. Annak ellenére, hogy napjainkban jelentős számú természetes, fél-szintetikus és szintetikus antibiotikum áll rendelkezésre a gyógyításban, részben az antibiotikumok indokolatlan használatának következtében a kórokozók ellen alkalmazott terápiás eljárások egyre gyakrabban hatástalanok. Ennek egyik oka, hogy a folyamatosan bővülő antimikrobiális szerekkel szemben multirezisztens baktériumtörzsek alakulnak ki. A kiterjedten antibiotikum-rezisztens *Mycobacterium tuberculosis*, a methicillin-rezisztens *Staphylococcus aureus* (MRSA), a multirezisztens *Escherichia coli* és *Klebsiella pneumoniae* ma már komoly közegészségügyi fenyegetések [2]. Az új antibiotikumok kifejlesztésének lassulása miatt új stratégiák alkalmazása vált szükségessé a világszerte egyre fenyegetőbbé váló antibiotikum rezisztenciák ellen. A fenti jelenség alapján ezen stratégiák egyike a régi, a jelenlegi klinikai gyakorlatban nem, vagy kevéssé használt antibiotikumok felelevenítését célozza [3–5].

A primycin, mely az első Magyarországon felfedezett [6], izolált és gyártott antibiotikum, kimagasló hatékonyságot mutat a leggyakoribb Gram-pozitív kórokozók jelenlegi populációival szemben, beleértve a jelenleg terjedő multirezisztens törzseket [7]. A nem osztódó baktériumokkal szembeni baktericid hatása [8], és a multirezisztens Gram-pozitív baktériumokkal szembeni kiterjedt és nagyfokú hatékonysága a primycint igen értékessé teszi a

klinikai gyakorlat számára. A gyógyszerfejlesztés szempontjából azonban mindenképp szükséges a modern vizsgálati módszerekkel történő újraértékelése és ismereteink bővítése, hogy a mai kor ipari és tudományos elvárásainak megfeleljen. A munka alapjául a PTE TTK Általános és Környezeti Mikrobiológiai Tanszék és a Pannonpharma Kft. közös kutatási programja szolgált.

Célkitűzések

Összhangban a bevezetőben bemutatott ismeretekkel, munkám célkitűzései a következők:

- A primycin antimikrobiális hatásának vizsgálata eddig még nem vizsgált mikrobákon, illetve a már elvégzett vizsgálatok újraértékelése modern, standardizált mikrobiológiai módszerekkel.
- A termelő törzs mikrobiológiai jellemzése és taxonómiai helyzetének pontosítása molekuláris biológiai módszerekkel.
- A primycin toxikológiai vizsgálata *in vitro* háromdimenziós (3D) humán szövetmodellen.
- Primycin kezelés hatásának génexpressziós vizsgálata mikroarray, valamint valós idejű kvantitatív PCR technikával

Alkalmazott módszerek

Mikrobiológiai módszerek

Minimális gátló koncentráció meghatározása mikrodilúcióval

Az antimikrobiális anyagokkal szembeni érzékenység megállapítására végzett vizsgálatokat nemzetközi szabványok (CLS-Clinical and Laboratory Standards Institute) alapján végeztük.

A mikrobák primycinnel szembeni érzékenységének vizsgálatát a szabvány megfelelő szervezetre vonatkozó szabványa alapján végeztük: élesztőgombák M27 [10], fonalas gombák M38 [11]; baktériumok M7 [12].

Szénasszimiláció, fajazonosításhoz használt tesztek

A szénasszimilációs vizsgálatok célja, hogy megállapítsuk, képes-e egy adott mikroba oxigén jelenlétében a tápoldatban egyedüli szénforrásként rendelkezésre álló szénhidrátot felhasználni. A fajazonosítás során az alábbi tesztekkel végeztük el: keményítő bontás, zselatináz kimutatás, kazein hidrolízis, nitrát redukció, kataláz teszt.

Biológiai értékmérés

A primycin biológiai értékmérését, az ipari primycin termelő törzs és a *Saccharomonospora* fajok esetében is, rázatott lombikos fermentációból kiindulva végeztük el. A biológiai értékméréshez *B. subtilis* ATCC 6633 törzs 24 órás tenyészetét használtuk, a mérést latin négyzetes elrendezésben végeztük.

Pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálat

A primycint termelő ipari törzset (NCAIM 00028) LB tápoldatban, 37°C-on 48 órán keresztül inkubáltuk. A pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálatokat JSM 6300 (JEOL) mikroszkóppal végeztük.

Analitikai módszerek

Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC)

A feltárt mikroba sejtek felülúszóját Agilent 1100 folyadékkromatográf készülékkel vizsgáltuk. A komponensek elválasztására 4,6 x 150 mm-es, 5 µm töltetű BDS Hypersil C18 oszlopot használtunk. Az elválasztás ideje 60 perc, ebből a 16-26 perc közötti kromatogram szakasz került kiintegrálásra.

Folyadékkromatográfiával kapcsolt elektropray ionizációs tömegspektrometria (HPLC/ESI-MS)

A primycin komponensek vizsgálatát HPLC/ESI-MS módszerrel is elvégeztünk. A komponensek elválasztására 2,1 x 150 mm-es, 3,5 µm töltetű Zorbax Eclipse XDB-C18 oszlopot használtunk. A minták fragmentálását pozitív elektropray ionizációval (70 V) végeztük. A kromatográfiás paraméterek ellenőrzését és az adatok kiértékelését Chemstation (Agilent, A.08.04.) szoftverrel végeztük.

Genomikai vizsgálatok

DNS izolálás

A DNS izolálását Sambrook és munkatársai *Molecular Cloning Manual* (Sambrook és mts., 2001, *ColdSpring Harb. Lab. Press*) genomi DNS izoláló módszerének adaptálásával végeztük kiindulásként 50-150 mg nedves sejtömeget alkalmazva. A minták mennyiségi és minőségi meghatározását NanoDrop 2000 UV-Vis spektrofotométerrel és Agilent 2100 Bioanalyzer DNS kittel végeztük.

Genom szekvenálás

A primycin termelő ipari törzs esetében izolált nagy mennyiségű és tisztaságú genomi DNS nukleotidsorrendjét a szegedi BayGen Intézetben SOLiD 3 Plus (Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection) és Roche 454 FLX szekvenáló rendszerek segítségével határoztuk meg. A SOLiD rendszer

esetében 25 bp adapterekkel ellátott mate-pair könyvtárt, illetve 50 bp-os fragment könyvtárt, míg a Roche 454 FLX rendszer esetében 400 bp hosszúságú könyvtárakat készítettünk a szekvenáláshoz. A genomok annotálása az NCBI Prokaryotic Genomes Automatic Annotation Pipeline [13], EMBL EBI Velvet program valamint a RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology) [14] szerver felhasználásával történt.

A PKS génklaszter struktúrális elemzése

A *Saccharomonospora azurea* SZMC 14600 genomban kódolt PKS génklaszterek azonosításához CLUSTSCAN és antiSMASH (antibiotics & Secondary Metabolite Analysis Shell) programcsomagokat használtuk [15]. A feltárt génklaszterekben annotált gének és fehérjék homológia keresését az NCBI BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) szerveren [16] végeztük el. A PKS domének részletes azonosításához és analíziséhez a MAPSI (Management and Analysis for Polyketide Synthase type I) [17], SBSPKS (Structure Based Sequence Analysis of Polyketide Synthases) [18], a SMART (Simple Modular Architecture Research Tool) [19] és MEME (Multiple Em for Motif Elicitation) [20] adatbázisokat használtuk fel. A PKS domén szekvenciák többszörös illesztését CLUSTALW [21] program használatával hajtottuk végre.

Sejtbiológiai vizsgálatok

Humán szövetkultúrák

A két és háromdimenziós *in vitro* májmodell összeállításához humán májkarcinóma sejtvonalat (HepG2, ATCC), primer humán hepatocita sejteket (hNHEPS, Lonza) és primer humán fibroblaszt sejteket (NHLF, Lonza) használtunk. A sejteket ~80 % konfluencia mellett tripszinezttük és használtuk fel a különböző vizsgálati modellekhez. Az ismert hepatocita differenciálódási marker géneket génexpressziós vizsgálatokkal ellenőriztük minden vizsgálatba bevont 2D es 3D májmodellnél.

RNS izolálás, cDNS készítés, qPCR

A különböző sejtkultúrákból származó minták RNS kivonását EZ-10 totál RNS izoláló kittel végeztük a gyártói utasítások szerint. A minták RNS tartalmát Qubit fluorométerrel (Invitrogen, verzió 1.0) Quant-iT™ RNA BR Assay Kit használatával ellenőriztük. Az izolált RNS-t DNáz kezeltük, majd ezt követően cDNS készítettünk a gyártói protokoll szerint, melyhez High capacity RNA to cDNA Kitet használtunk. A minta cDNS tartalmát Qubit fluorométerrel ss DNA BR Assay Kit használatával ellenőriztük. A génexpresszió változások kiszámítására ddCt módszert alkalmaztunk, beta-aktin belső kontrollhoz normalizálva.

Mikroarray analízis

Mikroarray vizsgálatainkat az Affymetrix GeneAtlas™ Personal Microarray (Affymetrix) készülékkel végeztük, U219 array chip-et (Affymetrix) alkalmazva, amely 20.000 gén és 36.000 transzkripciós variáns génexpressziós szintjének vizsgálatára alkalmas. A CEL file-okat R statisztikai környezetben analizáltuk Affymetrix Bioconductor szoftver alkalmazásával (Bioconductor, verzió 2.10.1). Az array-k közötti normalizálást Robust MultiArray Avarage (RMA) módszer alkalmazásával végeztük.

Viabilitási tesztek

Elvégeztük a primycin *in vitro* toxikológiai vizsgálatát kolorimetriás (MTT teszt) és lumineszcens (CellTiter Glo LuminescCell Viability Assay) módszert alkalmazva különböző májmodelleken. A sejtkultúrákat a különböző koncentrációjú primycin (0,1 µg/ml; 1,0 µg/ml; 10 µg/ml; 100 µg/ml) oldatokkal 72 órán keresztül inkubáltuk. A hatóanyag citotoxikus aktivitásának meghatározásához mikroplate leolvasót (Multiskan Ascent, Thermo Fisher Scientific Inc.) használtunk.

Lipidtox festés

A lipidek festését HSC LipidTOX™ Red neutrális lipid festékekkel végeztük. A

metszeteket 30 percig inkubáltuk az 1:1000 arányban hígított festékkel. A képek rögzítése LSM 710 konfokális mikroszkóppal (Zeiss) történt.

Peroxiszóma ploriferátor aktivált receptor (PPAR) gamma aktivitás mérés

A PPAR gamma aktiváció méréséhez BrightGlo luciferáz assay-t (Promega) alkalmaztunk, melyet mikroplate leolvasó készülékkel (Synergy™ HT, BioTek Instruments) detektáltunk.

Eredmények

Primycin antimikrobiális hatásának vizsgálata

Antibiotikum készítmény fejlesztés során a terápiás felhasználhatóság szempontjából kiemelt fontosságú az antibiotikum hatékonyság vizsgálata (MIC), hiszen ennek ismeretében történik az antibiotikum hatékony dózisának és a terápiás spektrumának meghatározása. Elvégeztük néhány törzsgyűjteményből származó *Candida* faj, illetve klinikai mintából származó *Candida* és *Aspergillus* faj primycinnel szembeni érzékenység vizsgálatát. Az irodalomból ismert 2-10 µg/ml MIC értékekkel szemben az általunk kapott eredmények alapján a primycin, 4-64 µg/ml között hatékony *Candida* fajok ellen. A primycin minimális gátló koncentrációjának fajon belüli variabilitásának vizsgálatát klinikai *C. albicans* izolátumokkal végeztük el. A vizsgált *C. albicans* izolátumokról elmondható, hogy primycinnel szembeni érzékenységük csak kismértékben különbözött. Primycinre rezisztens humán patogén *Candida* fajt nem találtuk és a szakirodalomban sem írtak le. A szemfertőzésekben komoly szerepet játszó fonalas gombák vizsgálata során megállapítottuk, hogy az *Aspergillus niger* érzékenysége a legnagyobb primycinnel szemben, de MIC értéke így is 64-szerese az amphotericin B-hez képest.

A Gram-negatív és Gram-pozitív baktérium bevonásával végzett MIC

vizsgálatok alapján az irodalommal egybecsengő adatokat kaptunk. Az *S. azurea* primycinnel szembeni toleranciája azonban kiemelkedett a vizsgálatokba bevont Gram-pozitív fajok közül, ezért további összehasonlító vizsgálatot végeztünk, melyből kiderült, hogy a *S. azurea* antibiotikum termelésre képes, melyre a szakirodalomban nincs adat. A biológiai értékmérést követően analitikai módszerekkel is igazoltuk, hogy a *S. azurea* által termelt antibiotikum azonos a primycinnel. Az analitikai vizsgálatok során azonosítottuk a marginolaktonok termelődése során leírt amino molekulát, melyet a primycin termelő ipari törzs és a törzsgyűjteményből származó *S. azurea* törzsek fermentlevéből is azonosítottunk. A primycin esetében a deguanidino-amino A1 komponens biológiai aktivitásáról nem rendelkezünk adatokkal.

Törzsazonosítás

A primycinnel kapcsolatos irodalom zöme a múlt században került publikálásra. Az azóta eltelt időben nemcsak a tudományos vizsgálómódszerek és a klinikai szempontból fontos mikroorganizmusok rezisztencia viszonyai változtak, hanem a hatósági elvárások is. Mivel a primycin ipari termelése fermentáció során valósul meg, a termelő törzs pontos taxonómiai azonosítása elengedhetetlen a későbbi készítmény fejlesztés során. A baktériumok taxonómiai és diverzitás vizsgálatában a 16S rRNS a legáltalánosabban vizsgált gén, melyre alapozva elvégeztük a primycin termelő ipari törzs rendszertani státuszának meghatározását.

Vizsgálataink során a 16S rRNS-t kódoló DNS szakasz bázisrendjének homológiájára alapozva megállapítottuk, hogy a NCAIM 00028, NCAIM 000181 és az ES-23 jelű ipari törzsek nem állnak közvetlen rokonságban az irodalmi adatok alapján feltételezett referencia fajokkal, hanem a *Saccharomonospora azurea* néven leírt faj képviselői.

A teljes genomszekvenálást követően a 16S rRNS génen kívül vizsgálatainkat kiterjesztettük a 23S, 5S és ITS szekvenciák, valamint a ribonukleáz P és giráz B gén kódoló szakaszának molekuláris elemzésével. A filogenetikai analízisek az összes vizsgált gén esetében megerősítették, hogy a primycin termelő ipari törzsek azonosak a *S. azurea* fajjal. Ennek ismeretében a primycin termelő ipari törzset *Saccharomonospora azurea* SZMC14600 néven deponáltuk a Szegedi Mikrobiológiai Törzsgyűjteményben.

A primycin termelésében szerepet játszó PKS I enzimkomplexet kódoló gének azonosítását követően elvégeztük az ipari primycin termelő törzsek részleges PKS szekvenciáinak összehasonlító analízisét, melyből kiderült, hogy a két ipari törzs a vizsgált szekvencia 5' végén csupán egyetlen pozícióban mutat eltérést, melynek következtében a törzsekre jellemző fehérje elsődleges szerkezete (aminosav sorrend) is különbözik.

A hatóanyag *in vitro* toxikológiai és hatástani vizsgálata

Vizsgálati modellek

A differenciálódási markerek és a funkcionalitási teszt alapján a 3D HepG2:Fb májmodell alkalmas *in vitro* toxikológiai tesztek elvégzésére. A HepG2 májkarcinóma sejtvonallal végzett vizsgálatok nem térnek el szignifikánsan a primer humán hepatocitákkal végzett vizsgálatokban kapott eredményektől. Mivel a HepG2 sejtek beszerzése, fenntarthatósága illetve reprodukálhatósága a primer sejtekhez képest sokkal könnyebben megoldható, ezért alkalmazásuk nagyban megkönnyíti és olcsóbbá teszi a toxikológiai és hatástani tesztek elvégzését.

Viabilitási tesztek

A primycin akut toxicitási tesztekben dózis függő módon fejt ki hatását. A primycin 10 és 100 µg/ml koncentrációban toxikusnak bizonyult. Alacsonyabb koncentrációban (0,1 és 1,0 µg/ml) a primycin nem volt toxikus sem a primer hepatocita sem a májkarcinóma sejtmodellekben. Az MMT-tesztben

atoxikusnak bizonyult primycin koncentrációkról független tesztben is igazoltuk, hogy nem toxikusak. Az eredmények előre vetítik, hogy a primycin alkalmas lehet Gram-pozitív kórokozók által okozott szisztémás fertőzések elleni orális készítmény fejlesztésére.

Affymetrix mikroarray analízis

A primycin nem toxikus koncentrációkban eltéréseket okoz az inflammatórikus citokinek és kemokinek valamint a lipid metabolizmust szabályozó gének expressziójában. Az IL11 és IL24 gén expressziója sokkal erősebb növekedést mutat, mint a gyulladást keltő IL6 és IL8 gének expressziója. Mivel mind az IL11 mind az IL24 esetében leírták ezen gének karcinogenezisben betöltött szerepét és a rákellenes terápiák lehetséges targetjeként említik, ezért érdemes a primycin ezen hatását további vizsgálatokban igazolni. A kemokinek CXC alszaládjába tartozó gének expressziós változása szintén megfigyelhető volt. A primycin által génexpressziós növekedést mutató kemokinek (CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL4, CXCL5) azonos alszaládba tartoznak. A primycin lipid metabolizmust befolyásoló hatását mikroarray adatokkal igazoltuk. A primycin fokozta a glükóz és zsírsav anyagcsere szabályozásában kulcsfontosságú PDK4 és a celluláris stresszre adott válaszban szerepet játszó SGK1 gén expresszióját. Ezzel párhuzamosan a primycin génexpresszió csökkenést okoz az APOB és FABP1 génekben. A primycin lipid metabolizmussal kapcsolatos hatásának további bizonyítéka, hogy a primycin kezelt 3D májmodellben, lipid festési vizsgálatokban, drasztikusan lecsökkent mind a celluláris, mind a membránban lévő lipidek mennyisége.

PPAR géncsalád vizsgálata

A gyulladáskeltő citokinek megnövekedett génexpressziója (IL6, IL8) összefüggésben van a lipid metabolizmussal a PPAR géncsalád által. A gyulladás csökkentő hatású prednizolonnal szemben a primycin nem növeli a PPAR géncsaládba tartozó gének (PPAR α , PPAR γ) és annak targetjének az

ADRP génnek az expresszióját, valamint az aktivitás assayben is PPAR γ aktivitás csökkenést okozott. Ugyan a kezeletlen kontrollhoz képest a primycin hatására bekövetkező génextpresszió csökkenés nem szignifikáns, azonban a PPAR α génextpressziós szintje mindkét alkalmazott koncentrációban (0,1 és 1,0 $\mu\text{g/ml}$) lecsökkent és ez a PPAR α target génjében, a CYP3A4 gén expressziójában már szignifikáns csökkenéshez vezetett. Bár számos olyan hatóanyag van, mely a CYP3A4 aktivitását befolyásolja, azonban ezek a hatóanyagok a CYP3A4 enzim aktivitását, és nem a CYP3A4 gén transzkripcióját gátolják.

Az eredmények összefoglalása

Az antibiotikumokkal szembeni rezisztenciák kiemelt jelentőségű egészségügyi problémát jelentenek világszinten. A multirezisztens baktériumok megjelenése és elterjedése számos vizsgálat indítását eredményezte hatékonyabb antibakteriális szerek fejlesztése érdekében, valamint több, korábbról ismert, de a mai terápiás alkalmazásban háttérbe szorult vegyület újraértékelését inspirálta.

Ilyen antibiotikum a primycin is, mely a multirezisztens Gram-pozitív baktériumokkal szembeni kiterjedt és nagyfokú hatékonysága miatt igen értékes lenne a klinikai gyakorlat számára. A gyógyszerfejlesztésbe bevont antibiotikum termeltetésére használt törzs taxonómiai státuszának, a primycin antimikrobiális hatásának és hatásmechanizmusának bizonytalanságai, valamint az *in vitro* toxikológiai és hatástani vizsgálatok hiányosságai szükségessé tették a primycin tudományos szempontból elfogadott, modern módszereken alapuló revidálását.

Jelen munkában elvégeztük a primycin antimikrobiális hatásának vizsgálatát. Igazoltuk, hogy a Gram-negatív törzsekre nincs hatással, valamint elvégeztük a primycin antifungális hatásának vizsgálatát számos élesztő- és fonalas gomba

esetében modern, standardizált mikrobiológiai módszerekkel. Az antibakteriális hatásvizsgálatok során bebizonyítottuk, hogy a törzsgyűjteményekből származó *S. azurea*, mely a primycinnel szemben magas toleranciát mutatott, antibiotikum termelésre képes. A képződött antibiotikumot primycin komponensekként azonosítottuk HPLC és HPLC/ESI-MS módszerekkel. Az ipari termelő törzsnél nagy mennyiségben azonosítottuk az eddig még nem vizsgált deguanidino-amino primycin A1 komponenst, mely a marginolaktanonok bioszintézisének végén amidino hidroláz enzim katalizálásával képződik a guanidino csoporttal rendelkező primycin A1 komponensből. Az amino primycin A1 komponenst a törzsgyűjteményekből származó *S. azurea* törzseknél is kimutattuk. Feltételezzük, hogy a desertomycinhez hasonlóan a primycin A1 amino molekulája biológiailag aktívabb, mint a primycin A1 guanidint tartalmazó molekulája. Az ipari törzs taxonómiai bizonytalanságai miatt elvégeztük a törzs rendszertani azonosítását molekuláris biológiai módszerekkel, mely igazolta, hogy a termelő törzsek a Runmao és munkatársai által leírt *S. azurea* faj képviselői. A genomszekvenálási adatok elemzésével azonosítottuk a primycintermelő ipari törzsből az antibiotikum termelésért felelős PKS doméneket és elvégeztük ezen génszakaszok összehasonlítását a törzsgyűjteményben lévő *S. azurea* törzsekkel, melynek során eltéréseket találtunk a primycint nagy mennyiségben termelő ipari törzs és a komponenseket kisebb mennyiségben termelő törzsgyűjteményi törzsek között. Elvégeztük a primycin *in vitro* toxikológiai vizsgálatát humán szövetmodellen, melynek első lépéseként toxikológiai vizsgálatokra alkalmas modellt fejlesztettünk. Vizsgálatunk során olyan háromdimenziós májkarcinóma sejtmodellt alkalmaztunk, mely gyorsan és könnyen elkészíthető, és jobban modellezi a humán szöveti környezetet, mint a gyakorlatban alkalmazott kétdimenziós modellek. A kapott eredményeket primer humán hepatocita sejtet tartalmazó modellel összehasonlítva nem kaptunk szignifikánsan eltérő

eredményeket, mely alátámasztja az általunk összeállított modell alkalmazhatóságát *in vitro* toxikológiai és hatástani vizsgálatokban.

Feiszt és munkatársai munkája alapján 180 klinikai izolátum esetében a primycin hatékonyabb Gram-pozitív baktériumok ellen, mint a vankomicin, gentamicin, eritromicin, ofloxacin, oxitetraciklin, tobramicin és neomicin. Az MRSA izolátumok esetében a primycin 0,06 µg/ml MIC értékeket mutatott, gátolva a mupirocin-rezisztens izolátumot is. Az *in vitro* toxikológiai vizsgálat során megállapítottuk, hogy a primycin 0,1 és 1,0 µg/ml koncentrációkban nem toxikus. Ebben a koncentráció tartományban a primycin hatékony a legtöbb Gram-pozitív baktériummal szemben, beleértve a multirezisztens törzseket is. A fenti eredmények tükrében a primycin tartalmú készítmény fejlesztés megalapozottnak tűnik.

A szubtoxikus primycinnel kezelt humán 3D májkarcinóma sejtmodellnél átfogó vizsgálatot végeztünk mikroarray és qPCR vizsgáló módszerekkel. A primycin nem toxikus koncentrációkban eltéréseket okoz az inflammatórikus citokinek és kemokinek, valamint a lipid metabolizmust szabályozó gének expressziójában. A primycin lipid metabolizmussal kapcsolatos hatásának további bizonyítéka, hogy a primycinnel kezelt 3D májmodellben lecsökkenti mind a celluláris, mind a membránban lévő lipidek mennyiségét. A lipid metabolizmussal összefüggésben megvizsgáltuk a primycin PPAR géncsalád expressziójával és aktivitásával kapcsolatos hatását, melynek során vizsgáltuk nemcsak a PPAR- α és PPAR- γ , hanem azok target génjeit is. A vizsgálatokból kiderült, hogy a primycin a CYP3A4 gén expresszióját szignifikánsan csökkenti. A CYP3A4 számos másik hatóanyag metabolizmusában játszik fontos szerepet, így a készítmény fejlesztés szempontjából további vizsgálatok elvégzése szükséges a primycin gyógyszerinterakciók kapcsán. A fenti eredmények előzetes információk a primycin hatásának tekintetében. A primycin lipid anyagcsere moduláló hatása egyértelmű, azonban további

vizsgálatok szükségesek a primycin humán szöveten vizsgált komplex hatásának átfogó megismeréséhez.

1. Irodalomjegyzék

1. Demain A. L., From natural products discovery to commercialization: a success story. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 33, no. 7, pp. 486–495, 2006.
2. Prestinaci F., Pezzotti P., Pantosti A., Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. *Pathog. Glob. Health*, vol. 109, no. 7, pp. 309–318, 2015.
3. Falagas M. E. és Kopterides P., Old antibiotics for infections in critically ill patients. *Curr. Opin. Crit. Care*, vol. 13, no. 5, pp. 592–597, 2007.
4. Pulcini C., Bush K., Craig W. A., Frimodt-Møller N., Grayson M. L., Mouton J. W., Turnidge J., Harbarth S., Gyssens I. C. and ESCMID Study Group for Antibiotic Policies, Forgotten Antibiotics: an inventory in Europe, the United States, Canada, and Australia,” *Clin. Infect. Dis.*, vol. 54, no. 2, pp. 268–274, 2012.
5. N. Cassir, J.-M. Rolain, and P. Brouqui, “A new strategy to fight antimicrobial resistance: the revival of old antibiotics,,” *Front. Microbiol.*, vol. 5, p. 551, 2014.
6. T. Valyi-Nagy, J. Uri, and I. Szilagyi, “Primycin, a new antibiotic,,” *Nature*, vol. 174, no. 4441, pp. 1105–6, Dec. 1954.
7. P. Feiszt, G. Mestyán, M. Kerényi, O. Dobay, J. Szabó, Z. Dombrádi, E. Urbán, and L. Emódy, “Reevaluation of in vitro activity of primycin against prevalent multiresistant bacteria,,” *Int. J. Med. Microbiol.*, vol. 304, no. 8, pp. 1077–1085, Nov. 2014.
8. P. Feiszt, G. Schneider, and L. Emódy, “Effect of primycin on growth-arrested cultures and cell integrity of *Staphylococcus aureus*,,” *Acta Microbiol. Immunol. Hung.*, vol. 64, no. 2, pp. 121–130, Jun. 2017.
9. T. Valyi-Nagy and B. Kelentey, “The toxicology and pharmacology of primycin,,” *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, vol. 124, pp. 466–81, Mar. 1960.
10. CLSI, “M27-A3 Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard—Third Edition,” 2008.
11. CLS, “M38-A2 Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard—Second Edition,” 2008.
12. CLSI, “M07Ed11 | Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically, 11th Edition.” [Online]. Available: <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m07/>
13. “NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline.”
14. “RAST Server - RAST Annotation Server.” [Online]. Available: <http://rast.nmpdr.org/rast.cgi>.
15. A. Starcevic, J. Zucko, J. Simunkovic, P. F. Long, J. Cullum, and D. Hranueli, “ClustScan: an integrated program package for the semi-automatic annotation

- of modular biosynthetic gene clusters and in silico prediction of novel chemical structures.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 36, no. 21, pp. 6882–92, Dec. 2008.
16. S. F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, and D. J. Lipman, "Basic local alignment search tool," *J. Mol. Biol.*, vol. 215, no. 3, pp. 403–410, Oct. 1990.
 17. H. Tae, J. K. Sohng, and K. Park, "MapsiDB: an integrated web database for type I polyketide synthases," *Bioprocess Biosyst. Eng.*, vol. 32, no. 6, pp. 723–727, Oct. 2009.
 18. S. Anand, M. V. R. Prasad, G. Yadav, N. Kumar, J. Shehara, M. Z. Ansari, and D. Mohanty, "SBSPKS: structure based sequence analysis of polyketide synthases," *Nucleic Acids Res.*, vol. 38, no. suppl_2, pp. W487–W496, Jul. 2010.
 19. I. Letunic, T. Doerks, and P. Bork, "SMART 7: recent updates to the protein domain annotation resource," *Nucleic Acids Res.*, vol. 40, no. D1, pp. D302–D305, Jan. 2012.
 20. T. L. Bailey, M. Boden, F. A. Buske, M. Frith, C. E. Grant, L. Clementi, J. Ren, W. W. Li, and W. S. Noble, "MEME SUITE: tools for motif discovery and searching," *Nucleic Acids Res.*, vol. 37, no. Web Server, pp. W202–W208, Jul. 2009.
 21. M. A. Larkin, G. Blackshields, N. P. Brown, R. Chenna, P. A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I. M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J. D. Thompson, T. J. Gibson, and D. G. Higgins, "Clustal W and Clustal X version 2.0," *Bioinformatics*, vol. 23, no. 21, pp. 2947–2948, Nov. 2007.

2. Köszönetnyilvánítás

Elsőként köszönetet szeretnék mondani témavezetőimnek, Prof. Dr. Pongrácz Juditnak és Dr. Fekete Csabának, hogy szakértelmükkel, emberségükkel segítettek és irányították tudományos munkámat. Hálás vagyok messzemenő támogatásukért, megértésükért.

Köszönetet szeretnék mondani Prof. Dr. Pesti Miklósnak a tudományos munkám elindításában nyújtott segítségével és külön köszönöm Pallos József Péternek a PannonPharma Kft. ügyvezető igazgatójának, hogy ezen munka megszülethetett.

Hálásan köszönöm a Pécsi Tudományegyetem, Gyógyszerésztudományi Kar Gyógyszerészi Biotechnológia Intézet valamint az Általános és Környezeti Mikrobiológia Tanszék dolgozóinak segítségét a lipid toxikológiai és molekuláris biológiai munkákban, valamint Dr. Járomi Lucának az adatok kiértékelésében nyújtott segítségével. A PPRE gént tartalmazó luciferáz riporter gén konstrukciót köszönöm Dr. R. M. Evans Professzor Úrnak (The Salk Institute for Biological Studies, La Jolla, CA, USA). Köszönöm Dr. Bartók Tibornak a HPLC/ESI-MS vizsgálatokhoz nyújtott segítségét és nagyszerű társaságát. Szeretném megköszönni a munkatársaimnak és barátaimnak, Sefferné Szalai Máriának és Seffer Dénesnek, Bóvári-Biri Juditnak, Dr. Péteri A. Zsanettnek, Dr. Juhász Ákosnak, Fenyvesiné Dr. Páger Csillának és Tóth Zsuzsannának a munkám során nyújtott önzetlen szakmai segítségüket és baráti tanácsaikat, értékes javaslataikat, valamint a tőlük kapott bátorítást. És végül szeretném kifejezni hálámat Szüleimnek és Családomnak, akik tanulmányaim során mindvégig támogattak, és biztattak. Külön köszönöm férjemnek, Húvös Károlynak a rendíthetetlen támogatását és bizalmát bennem az évek során, hogy ez a dolgozat megszületik valamint gyermekeimnek: Marcinak, Borinak és Jonkának hogy bearanyozták a napjaimat.

3. Publikációs jegyzék

A disszertáció témakörében készült publikációk:

1. Eszter Virág, Á. Juhász, R. Kardos, Z. Gazdag, G. Papp, **Á. Péntzes**, M. Nyitrai, Cs. Vágvölgyi, M. Pesti: In vivo direct interaction of the antibiotic primycin on *Candida albicans* clinical isolate and its ergosterol-less mutant, *Acta Biologica Hungarica* 63(1), pp 42-55 (2012), **IF: 0,793**
2. K. Csepregi, A. Valasek, **Á. Péntzes**, Zs. Tóth, É. Í. Kiss, I. Kerepesi, B. Horváth, I. Nagy, Cs. Fekete: Draft genom sequence of an efficient antibiotic-producing industrial strain of *Saccharomonospora azurea*, SZMC 14600, *Journal of Bacterology*. 2012, 194(5):1263, **IF: 3,726**
3. **Á Péntzes**, Mahmud Abdelwahab EM, J Rapp, ZA Péteri, J Bovári-Biri, C Fekete, G Miskei, K Kvell, JE Pongrácz.: Toxicology studies of primycin-sulphate using a three-dimensional (3D) in vitro human liver aggregate model, *Toxicol Lett.* 2017 Sep 12. pii: S0378-4274(17)31337-1. doi: 10.1016/j.toxlet.2017.09.005. [Epub ahead of print] **IF: 3,858**

A disszertáció témakörében készült szabadalom:

1. Á. Juhász, **Á. Péntzes**, Zs. A. Péteri, J.P. Pallos, D. Seffer, P. Feiszt, M. Pesti, Cs. Fekete, Cs. Vágvölgyi, Z. Gazdag, G. Papp: Process for producing primycin, primycin component(s), precursors and metabolites thereof via fermentation by the use of bacterial species *Saccharomonospora azurea*, WO 2011/051741 A1, 2011.05.05.

2. P. Feiszt, L. Emódy, J.P. Pallos, Á. Juhász, D. Seffer, M. Szalai, **Á. Péntzes**, Primycin or its components or combination thereof for the treatment or prevention of infestations by special organisms, WO/2013/061101, 2013.05.03.

A disszertáció témakörében készült nem referált konferencia absztraktok:

1. Bóvári-Biri J., **Péntzes Á.**, Götzer K., Mézes B., Pongrácz E. J.: 2D humán primer hepatocytá és fibroblast kokultúrán végzett *in vitro* máj toxikológiai vizsgálatok. Congressus Pharmaceuticus Hungaricus XIV. 2009. november 13-15., Budapest, Hungary.
2. Fekete Cs., Csepregi K., Valasek A., Juhász Á., **Péntzes Á.**, Péteri Zs., Kiss Í., Kondor B., Szabó L., Horváth B., Nagy I.: Új generációs DE NOVO szekvenálási stratégiák a bioaktív szekunder metabolitok megismerésének és kombinatórikai módosításának szolgálatában, IX. Magyar Genetikus Kongresszus és XVI. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, 2011 (O038).
3. **Péntzes Á.**, Bóvári-Biri J., Götzer K., Tóth Zs., Fekete Cs., Pongrácz E. J.: Két és háromdimenziós májmodell összehasonlítása primycin akut toxikológiai vizsgálatában, IX. Magyar Genetikus Kongresszus és XVI. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, 2011, P018, pp. 142-143.
4. Tóth Zs., **Péntzes Á.**, Payrits M., Berta G., Fekete Cs.: A primycin hatásának vizsgálata *Caenorabditis elegans* modellszervezeten, IX. Magyar Genetikus Kongresszus és XVI. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, 2011, P026, pp. 149-150.

5. **Á. Péntzes**, K. Húvös, T. Bartók, J. P. Pallos: Identification of antimicrobial molecules from fermentation broth produced by *Saccharomonospora* sp. using RP-HPLC/ESI-SQMS. 36th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and related techniques, 19-23 June 2011, Budapest, Hungary.
6. A. Valasek, K. Csepregi, Zs. Tóth, I. Kerepesi, B. Frey, **Á. Péntzes**, Á. Juhász, B. Horváth, I. Nagy, Cs. Fekete: *In silico* analysis of thiotemplate multidomain gene clusters in *Saccharomonospora azurea*, P-M32, 75th Anniversary of Albert Szent-Györgyi's Nobel Prize Award International Conference, 22-25 March, 2012, Szeged, Hungary.
7. Zs. Tóth, **Á. Péntzes**, J. E. Pongrácz, J. Hunyadkürti, A. Valasek, B. Horváth, I. Nagy, Cs. Fekete: Whole transcriptome profiling of mono- and co-cultured two- and three dimensional *in vitro* liver models, 75th Anniversary of Albert Szent-Györgyi's Nobel Prize Award International Conference, P-M30, 22-25 March, 2012, Szeged, Hungary.
8. K. Csepregi, A. Valasek, **Á. Péntzes**, Zs. Tóth, É. Í. Kiss, I. Kerepesi, J. Hunyadkürti, B. Horváth, I. Nagy, Cs. Fekete: Structural and functional characterization of polyketide synthase gene clusters found in newly sequenced bacterial genome, 75th Anniversary of Albert Szent-Györgyi's Nobel Prize Award International Conference, P-M5, 22-25 March, 2012, Szeged, Hungary.