

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**Bakteriális fehérjék analízise kapilláris
elektroforézissel**

Dr. Kustos Ildikó

Programvezetők: Prof. Dr. Emődy Levente
Prof. Dr. Kilár Ferenc
Témavezetők: Dr. Kocsis Béla
Prof. Dr. Kilár Ferenc

PTE ÁOK Orvosi Mikrobiológiai és Immunitástani Intézet

Pécs, 2000

Bevezetés

A kapilláris elektroforézis (CE) meglehetősen későn jelent meg a biokémiai analitikai módszerek között. Kialakulásának előfeltétele volt, a jó minőségű ömlesztett szilika kapillárisok megjelenése (gázkromatográfiánál) és a nagy érzékenységű detektorok megalkotása (a nagy nyomású folyadék kromatográfiánál (HPLC)).

Az elektroforézis az egyik legszélesebb körben alkalmazott módszer a biomolekulák elválasztására. A kapillárisok felhasználása elektromigrációs csatornaként számos előnnyel jár. A nagy felület / térfogat arány elősegíti a Joule hő hatékony eltávolítását, így az elválasztáshoz használt térerősség akár 1000V/cm is lehet. Ez a gyakorlatban például 30 kV-ot jelenthet, amely gyors szeparációt biztosít. Ezenkívül a CE kapillárisok térfogata mikroliteres tartományban van, amely igen kis mennyiségű puffer és nanoliter mennyiségű mintát igényel. A CE analízis reprodukálható, kvantitatív és a direkt, 'on-line' detektálás lehetővé teszi időigényes festési, gél-száritási lépések elhagyását. A módszer automatizálható, az adattárolás és feldolgozás számítógépes rendszer segítségével történik.

Az első kísérletes kapilláris elektroforetikus rendszert kb. 30 évvel ezelőtt fejlesztették ki. Azonban a módszerben rejlő számos lehetőségre csak Jorgenson és Lukács közleményei világítottak rá, mikor megjelentek nagy-felbontású szeparációt mutató eredményeik. Ezek az adatok bátorították a kutatókat a kapilláris elektroforetikus rendszerek továbbfejlesztésére. Kereskedelmi forgalomban a készülék 1988-ban jelent meg. Ettől kezdve a CE irodalma exponenciális növekedést mutatott.

Ugyanúgy, ahogy a gél elektroforézisben, a kapilláris elektroforézisben is számos elválasztási technika fejlődött ki. A kapilláris elektroforézis jelenleg leggyakrabban alkalmazott módszerei a kapilláris zóna elektroforézis (CZE), ahol az elválasztás a molekula töltés / tömeg arányán alapul. A kapilláris izoelektromos fókuszálás (CIEF), ahol a szeparáció a biomolekulák izoelektromos pontjától függ. A kapilláris izotachoforézis (CITP), ahol az elválasztás a molekulák különböző mobilitásán alapul. A micelláris elektrokinetikus kapilláris kromatográfia (MEKC), ahol az elválasztás alapelve a molekulák hidrofobicitás alapján történő megoszlása a micellákban, és a kapilláris gél elektroforézis (CGE), ahol a molekulásúly befolyásolja az elválasztást. A kapilláris elektro-kromatográfia (CEC) az elektroforézis és a kromatográfia elveinek összekapcsolásából alakult ki.

A 'dinamikus sieving' kapilláris elektroforézis (DSCE), a technika fő hátrányainak kiküszöbölésére (pl. buborékképződés a gél készítés időtartama alatt, az oszlop limitált élettartama, stb.) a CGE-ből fejlődött ki. A DSCE során egy, a kapillárisból könnyen kimosható polimer mátrix biztosítja a molekulaszűrő hatást. Ehhez lehet lineáris poliakrilamidot alkalmazni, amely a polimer láncok flexibilitása következtében hosszabb élettartamot biztosít. A nem-poliakrilamid típusú, UV fényáteresztő polimer mátrixok alkalmazása (dextrán, polietilén-glikol, cellulóz származékok) lehetővé teszi az alacsonyabb UV tartományban történő detektálást is. DSCE során magasabb hőmérséklet és nagyobb térfogat is alkalmazható a lineáris polimer károsodása nélkül. A polimer típusát, hosszát és koncentrációját változtatni lehet úgy, hogy az adott komponensek molekulaszűrő hatást érjünk el.

A kapilláris elektroforetikus technikát alkalmazták a mikrobiológia, és ezen belül a bakteriológia néhány területén: a baktériumsejtek egyes komponenseinek és funkcióinak vizsgálatára már korábban is. Ezt a módszert egyes peptidok (microcystin), néhány fehérje (ferritin, actinavidin, *Yersinia pestis* F1 antigén stb.), az LPS molekulák, és DNS analízisére is felhasználták.

CE módszereket fejlesztettek ki különböző bakteriális enzimaktivitások monitorozására (tripeptidáz, VanX enzim), amelynek során az enzim degradációs termékeit detektálták.

A legtöbb bakteriológiai vizsgálatban a CZE technikát alkalmazták, de egyes esetekben más módszereket is felhasználtak (pl.: CIEF és MEKC az actinavidin jellemzésére, CIEP az LPS elemzésére).

Bakteriális sejtlizátumok fehérje profilja

A bakteriális sejtlizátumok „protein profilja” alatt a baktérium sejt teljes fehérje tartalmának jellemzését értjük. Ez a módszer alkalmas a baktériumok tipizálására és összehasonlító vizsgálatára. A teljes protein profil függetlennek bizonyult a baktérium sejt O serotípusától, bacteriocin és fág típusától, így az egyes törzsek jellemzésére célszerű mindezen módszerek kombinációját alkalmazni. A protein profil analízis felhasználható a taxonómiai vizsgálatokban, szerepe van a nozokomiális infekciók elemzésében és a preventív módszerek kidolgozásában, elősegíti a fertőző források felkutatását.

Bakteriális külső membrán

A Gram-negatív baktériumok külső membránja egy igen hatékony barrier, amely védelmet biztosít a baktérium sejt számára a gazdaszervezet protektív rendszere (lizozim, β -lizin, komplement stb.) ellen, ezenkívül az epesók detergens hatásával, az emésztő enzimekkel, és számos olyan antibiotikummal szemben, amelyek a Gram-pozitívokra hatásosnak bizonyultak. Szerkezetét tekintve a külső membrán egy összetett struktúra, amely elsősorban fehérjéket és foszfolipideket tartalmaz, és itt található a Gram-negatív baktériumok specifikus komponense, a lipopoliszacharid (LPS) is.

A legismertebb külső membrán fehérjék (OMP) a porinok, amelyek pórusokat alkotnak, és lehetővé teszik különböző anyagok bejutását a baktériumsejtbe. A porinok egy csoportja nem-specifikus csatornákat alkot, amelyek kis méretű hidrophil molekulák transzportját biztosítják; másik csoportjuk specifikus transzport folyamatokban vesz részt (maltóz és maltodextrinek, nukleozidok, B12 vitamin stb.). Ezenkívül az OMP-k receptorként szolgálnak számos colicin és bakteriofág számára. Mint felületi antigének részt vesznek a szervezet immunválaszának kiváltásában, és igen fontos patogenetikai faktorok, a gazdaszervezethez való tapadási folyamatban vesznek részt. Az OMP-knek strukturális funkciójuk is van, a külső membrán - peptidoglikán komplex szerkezetének stabilizálásában játszanak szerepet. Néhány enzim is található a külső membránban, pl.: foszfolipáz A₁ és proteázok.

A lipopoliszacharid (LPS) molekulákat a lipid A komponensük rögzíti a Gram-negatív külső membrán külső rétegében, míg poliszacharid láncai a baktérium sejt külső környezetébe nyúlnak. Ezek a molekulák nélkülözhetetlenek a külső membrán fizikális szerveződéséhez és funkciójának betöltéséhez. Ezek képviselik a Gram-negatív baktériumok fő felületi (O) antigénjeit. Szerepük van a baktériumsejt specifikus felismerésében és a gazdaszervezet általi eliminálásában. Ugyanakkor nagyon fontos virulencia faktorok, és számos biológiai aktivitással (pirogén hatás, letális toxicitás, mitogén hatás B limfocitákra, stb.) rendelkeznek.

A külső membrán szerkezeti felépítése és hatásos funkciója speciális kölcsönhatásokat igényel a külső membrán fehérjék és LPS molekulák között. Ahhoz, hogy a porinok stabil csatornákat hozzanak létre és trimerekké aggregálódjanak, az LPS jelenléte szükséges. A külső membrán proteineknek bakteriofág és colicin receptor funkcióinak betöltéséhez is kölcsönhatásba kell lépniük az LPS molekulákkal. 'R' mutáció esetén ezek a kölcsönhatások nem tudnak megfelelően kialakulni, ezen mutációkban néhány fő (major) külső membrán fehérje mennyiségének szignifikáns változását írták le.

Célkitűzések

Ezen tanulmány célja egy új és modern technológia, a kapilláris elektroforézis felhasználása a mikrobiológiai diagnosztika területén, ezen belül a bakteriális fehérjék analízisében. A célkitűzések konkrétan a következő pontokban foglalhatók össze:

1. Hatékony, gyors és precíz kapilláris elektroforetikus módszer kidolgozása a bakteriális fehérjék vizsgálatára, amely alkalmas a teljes fehérje tartalom és az OMP-k elemzésére. Ezen módszer alapvető követelményei a rövid elválasztási idő, a kis mintaszükséglet, a reprodukálhatóság, a jellegzetes mintázatok, és a kvantitatív kiértékelés.
2. A kifejlesztett módszer alkalmazása bakteriális sejtlizátumok teljes fehérje tartalmának jellemzésére, az *Enterobacteriaceae* család különböző genusaiból származó törzsek összehasonlító vizsgálata során.
3. A kapilláris elektroforetikus kísérletek és a hagyományos SDS-PAGE eredményeinek összehasonlítása.
4. A technika felhasználása a fent említett Gram-negatív törzsek OMP profiljainak jellemzésére és összehasonlító vizsgálatára.
5. A meropenem külső membrán proteinekre gyakorolt postantibiotikus hatásának elemzése kapilláris elektroforézissel.
6. Az *Enterobacteriaceae* család három genusából származó baktérium törzsek LPS mintázatainak meghatározása SDS-PAGE-val és ezüstözéssel, és az OMP mintázatok és LPS profilok közötti korreláció vizsgálata.
7. Az OMP profilokban genetikai manipulációk és spontán mutációk hatására bekövetkező változások detektálása kapilláris elektroforézissel.
8. Izogén baktériumklónok OMP profiljának és virulenciájának összehasonlító vizsgálata.

Anyagok és módszerek

Baktérium törzsek:

-A *Shigella sonnei* 'R' sorozatot intézetünkben állították elő olyan mutánsokból, melyek egymás után veszítették el a cukor komponenseket LPS-ük O-specifikus oldalláncából, külső és belső magjából. A kiindulási törzs a *S. sonnei* I. fázis volt, amelyből spontán mutációval (II. fázis) illetve etil-metil-szulfonáttal indukált mutációval állították elő az 'R' variánsokat.

-A vizsgált *Proteus penneri* törzseket humán sebváladékból, vizeletből és székletből izolálták a világ különböző országaiban (Magyarország, Németország, Törökország, Nagy-Britannia).

-Az *E. coli* speciesen belül az 536-s (humán vizeletből izolált) törzs vad típusát és ennek négy izogén mutánsát (spontán deléciós mutáns; *leuX* mutáns; vektor plazmidot hordozó *leuX* mutáns; *leuX* génnel komplementált *leuX* mutáns) elemeztük.

Teljes protein profil vizsgálat:

A minták előkészítését *Senior és Vörös* módszerével végeztük; a törzseket buillonban tenyésztettük szaporodásuk logaritmusos fázisának eléréseig. A baktérium sejteket centrifugálással gyűjtöttük össze, majd az üledéket *Laemli-féle* mintapufferben szuszpendáltuk. A sejtek lizisét főzéssel értük el.

Külső membrán fehérjék preparálása

A baktériumokat 2000 ml peptont (1.667%), Na₂HPO₄-t (0.11%), glükózt (0.389%), hús kivonatot (0.195%), és MgCl₂-t (0.023%) tartalmazó táptalajban tenyésztettük. Az OMP-k kivonását *Osborn és Munson* módszerének módosított változatával végeztük: a baktérium sejteket plazmolizáltuk, majd EDTA jelenlétében lizozimes kezelésnek vetettük alá, mely a sejtburkok peptidoglikán rétegének emésztését okozta. A sejtek feltörését ultrahangos kezeléssel végeztük (MSE típus, 400 W, 4 x 2 perc). A fel nem tört sejteket és aggregátumokat centrifugálással távolítottuk el, a membrán frakciókat pedig ultracentrifugálással gyűjtöttük össze. A külső és belső membránok elválasztására szacharóz gradiens ultracentrifugálást alkalmaztunk (Spinco UC, SW 28 rotor, 21 h, 4°C, 100.000 g).

Postantibiotikus hatás (PAE) vizsgálata

Vizsgálatainkban a modern, széles spektrumú carbapenem antibiotikumot, a meropenemet (Zeneca Pharmaceutical Group, Wilmington, Delaware, USA) használtuk fel. A minimális gátló koncentráció (MIC) meghatározását csőhígítási módszerrel végeztük. A baktérium szuszpenziókat suprainhibitorikus ($8 \times \text{MIC}$) koncentrációjú meropenem kezelésnek vetettük alá 30 percre. Az antibiotikum eltávolítása után a baktériumok szaporodását fotometriával ellenőriztük. A PAE időtartamát *Hostacka és Karelová* módszerével határoztuk meg: ez alapján a PAE alatt azt az időkülönbséget értjük, amely a kezelt és kontrol baktériumok szaporodása között volt az A_{50} érték eléréséig. Az A_{50} érték a kontrol tenyészet növekedési görbéjén a maximális abszorbancia 50 %-át jelenti.

Lipopoliszacharid (LPS) preparálás

A baktériumokat 30 literes fermentorban, 7,2-es pH-jú táptalajban tenyésztettük levegőztetéssel és automatikus pH korrekcióval. Az LPS molekulákat *Westphal és mtsai* forró fenol-vizes módszerével vontuk ki, ultracentrifugálással tisztítottuk, majd liofilizáltuk.

SDS-PAGE

A gél elektroforézist *Laemmli* féle diszkontinuus rendszerben, 12 %-os szeparáló és 4 %-os stacking gélben végeztük, 200 V konstans feszültséggel. A fehérje géleket Coomassie Brilliant Blue R-250-nel festettük, míg az LPS géleket *Tsai és Frasch* módszerével ezüstöztük. A kvantitatív kiértékelést denzitometriával végeztük (Sharp JX-330 Image Master System, Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). A molekulásúly meghatározáshoz a Pharmacia alacsony molekulásúlyú kalibrációs kit-jét használtuk fel.

Kapilláris elektroforézis (CE)

A kapilláris elektroforézist Biofocus 3000 (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA) készülékkel végeztük. 24 cm hosszú, 50 μm belső átmérőjű kapillárist használtunk. A futtatásokat DSCE technikával hajtottuk végre, egy kereskedelmi forgalomban kapható, hidrofíli polimer tartalmazó futtató pufférben, amely 14-200 kDa tartományban biztosított molekulaszűrő hatást. A mintákat hidrodinamikusan injektáltuk, 10 vagy 15 kV konstans feszültséggel futtattuk. UV detektálást alkalmaztunk 220, 254 nm-en, és a teljes spektrum elemzését, kvantitatív kiértékelését a Biofocus Integrator program segítségével végeztük el.

Bakteriológiai virulencia tesztek

Citotoxicitás vizsgálata: 100 μl 10^9 csíra/ml sűrűségű baktérium szuszpenziót és ennek 10-es léptékű hígításait adtuk Greiner lemezen tenyésztett VERO, HeLa, és HEp-2 sejtekhez, majd inkubáltuk (37°C, 5% CO_2 , 3 h). Ezt követően a szuszpenzióhoz kristályibolya festéket adagoltunk, amelyet csak a tenyészet megmaradt sejtjei voltak képesek felvenni. A felvett kristályibolya festék mennyiségét a sejtek feloldása után fotométerrel határoztuk meg (590 nm), és a kezeletlen kontrollok értékével összehasonlítva következtettünk az elpusztult sejtek mennyiségére, azaz a citotoxicitásra.

Intraperitoneális és intravénás virulencia vizsgálat egérben: A baktérium törzsek szuszpenzióinak 5-ös léptékű hígításait oltottuk Carworth Farm Lane Petter (CFLP), „specific pathogen free” (SPF) higiénés kategóriájú egerekbe. Az elhullást két héten át figyeltük. Az LD_{50} értékek kiszámítása *Spermann és Kärber* módszere szerint történt.

Tüdő toxicitási teszt: 2×10^7 baktérium csírákat inhaláltattunk egerekkel, majd két napon át figyeltük az elhullást. Vizsgáltuk a tüdő makroszkópos és mikroszkópos elváltozásait (utóbbihoz hematoxin-eozin és PAS festést alkalmaztunk).

Eredmények

1. A kapilláris elektroforézis segítségével egy új, gyors, pontos és hatékony módszert dolgoztunk ki a bakteriális sejtlizátumok teljes protein profiljának és külső membrán fehérjéinek elektroforetikus jellemzésére. A DSCE technikát alkalmaztuk, amely a fehérjék molekulásúly alapján történő elválasztását tette lehetővé. Az elválasztási idő rövid volt (10 és 20 perc között az alkalmazott feszültségtől függően), a direkt UV detektálás pedig lehetővé tette az időigényes gél-festési, kimosási, szárítási lépések elhagyását. A mintázatok reprodukálhatóak voltak, minden mérést 4-5-ször ismételtünk meg. A kapott fehérje profilok jellegzetesek voltak a vizsgált baktérium törzsekre. A kvantitatív kiértékelés során a mintázatokat domináló fehérje csúcsok molekulásúlyát és %-os arányát határoztuk meg.
2. A kapilláris elektroforézissel kapott mintázatokat a bakteriológiában széles körben alkalmazott SDS-PAGE profilokkal hasonlítottuk össze. A CE elektroferogramok több szempontból is eltérést mutattak a gél elektroforetikus denzitometriás mintázatokhoz képest. A CE mintázatokat általában néhány fehérje csúcs dominálta, míg a denzitometriás profilokban több fő csúcs volt detektálható szélesebb molekulásúly tartományban. A fő csúcsoknak megfelelő molekulásúlyok jó korrelációt mutattak, de a csúcsterületek %-os eloszlása különbözött a két módszerrel. Az SDS-PAGE-nak nagyobb volt a felbontó képessége, különösen a nagy molekulásúlyú fehérjéket tekintve. Ezen különbségek egyik oka az elválasztó közeg eltérése a két módszernél: SDS-PAGE-nál a szeparáció kereszt kötésű akrilamid gélben történik, CE-nél az elválasztást lineáris polimer láncok biztosítják. További különbségek eredhetnek az eltérő detektálásból: SDS-PAGE-nál a fehérjék által kötött festék (Coomassie Brilliant Blue R-250) optikai denzitásán, CE-nél a molekulák direkt UV elnyelésén alapul az észlelés.
3. Ezt az új technikát használtuk fel *S. sonnei*, *P. penneri*, *E. coli* törzsek és izogén mutánsaik, valamint a *S. minnesota R595* referencia törzs teljes fehérje profiljának összehasonlító vizsgálatára. A kapilláris elektroforetikus mintázatokat 20 percen belül kaptuk meg, és általában 25-30 csúcsot tartalmaztak. A profilokat domináló fehérjék a 35-60 kDa molekulásúly tartományban helyezkedtek el, *S. sonnei* esetében hat, *P. penneri* és *E. coli* törzsek esetében kettő, *S. minnesota R595* törzsnél öt fő (major) fehérje csúcsot

tartalmazott ez a régió. Az egy genusba tartozó törzsek teljes fehérje profiljai hasonlóak voltak, bár a domináns proteinek %-os arányában több törzs esetén eltéréseket detektáltunk, illetve néhány esetben további major csúcsok megjelenését tudtuk kimutatni (pl. *S. sonnei I. fázis*).

4. A fent említett, *Enterobacteriaceae* családba tartozó baktérium törzsek külső membrán fehérje profiljait elemeztük CE-vel. Az OMP profilokat 10 percen belül tudtuk detektálni. A különböző genusok OMP mintázatai szignifikáns különbségeket mutattak a major fehérjék számát, molekulásúlyát, és %-os arányát illetően. A profilokat domináló protein csúcsok a 35-50 kDa molekulásúly tartományban helyezkedtek el. A *S. sonnei* törzsek profiljai három, a *P. penneri* és *E. coli* törzseké kettő, a *S. minnesota R595* törzs egy major csúcsot mutatott a domináns régióban. Egy genuson belül a kapilláris elektroforetikus OMP mintázatok hasonlóak voltak, de egyes törzsek eltéréseket mutattak a domináns csúcsok relatív %-os arányában. Így az OMP mintázatok alapján az egy genusba tartozó törzseket csoportosítani tudtuk.
5. A meropenem postantibiotikus hatását (PAE) négy különböző genusba tartozó Gram-negatív törzsnél vizsgáltuk. A meropenem minden vizsgált törzsből képes volt PAE-t indukálni. Az antibiotikum hatásának időtartama alatt mindkét elektroforetikus módszerrel szignifikáns változásokat tudtuk kimutatni az OMP mintázatokban. Minden baktérium törzs esetében több major külső membrán fehérje mennyiségének szignifikáns változását észleltük.
6. Az LPS profilokat SDS-PAGE-val vizsgáltuk, majd az LPS és OMP profilok közötti korrelációt elemeztük. A *S. sonnei* 'R' sorozatban az LPS struktúra fokozatos változásával párhuzamosan az OMP profilokban is fokozatos eltéréseket detektáltunk. A *S. sonnei I. fázis* (vad típus - 'S' baktérium) OMP profilja tartalmazta a legtöbb major fehérje csúcsot. A *II. fázisban* egy major fehérje csúcs hiányát tudtuk kimutatni. A 'deep rough' mutánsok mintázataiban szignifikáns kvantitatív változások detektálhatók. Ezen 'R' mutánsokban a domináns fehérjék relatív %-os aránya hasonló volt. A *P. penneri* csoportban a *H1209* törzs, ill. a *357* törzs két izogén mutánsának LPS-e mutatott 'R' formát a gélben. Ezen törzsek OMP profiljaiban is szignifikáns változásokat

mutattunk ki, a mutánsok mintázataiban a domináló fehérjék mennyisége változott, a *H1209* törzsben hárommal több karakterisztikus csúcs jelent meg.

Az *E. coli* törzsek LPS molekulái a gélben létraképződést mutattak ('S' forma). Az OMP profilokban a domináns fehérjék különböző %-os megoszlását detektáltuk.

7. A bakteriális fehérje profilokban genetikai manipuláció és spontán mutáció hatására is bekövetkezhetnek szignifikáns változások. Mi a *P. penneri* 357 törzs teljes fehérje és OMP profiljaiban analizáltuk a transzpozon és spontán mutáció hatására bekövetkező változásokat. A teljes protein profilokban mindkét mutáció hatására a domináns fehérje csúcsok szignifikáns mennyiségi változásait tudtuk kimutatni. A 39 kDa molekulású fehérje aránya 21-ről 17 %-ra csökkent, míg a 43 kDa proteiné 9-ről 20 %-ra nőtt. Az OMP mintázatokban is szignifikáns változásokat észleltünk: a 39 kDa OMP relatív %-os aránya 60-ről 45 %-ra csökkent, a 43 kDa fehérje mennyisége 40-ről 55 %-ra nőtt. Ezen mutációk hatására az LPS struktúrában is változásokat tudtunk kimutatni. A vad típus LPS profilja 'S' formát mutatott a gélben, ugyanakkor mindkét mutánsban az LPS 'R' mutációját detektáltuk.
8. A bakteriális virulencia és a külső membrán komponensek közötti korrelációt a *P. penneri* 357 törzs vad típusában, illetve ennek két izogenikus mutánsában elemeztük. A vad típus intraperitoneális vagy intravénás bevitel után hemolitikus tünetek között elpusztította az egereket. Nazális installáció esetén az állatokban órákon belül hemorrágiás tüdőödéma alakult ki. A vizsgált három fajta sejtenyészetben a vad típusú törzs tenyészetének felülúszói toxikusnak bizonyultak. A két mutáns nem mutatott virulenciát és toxicitást. Elektroforetikus módszerekkel mindkét mutáns OMP és LPS profiljaiban szignifikáns eltéréseket tudtunk kimutatni.

Összefoglalás és következtetések

A bakteriális fehérjék elemzésének mind a klinikai mintákból izolált baktériumok azonosításában, mind a tudományos munka során előállított mutánsok jellemzésében igen nagy jelentősége van. Intézetünkben igen régi hagyománya van a bélbaktériumok vizsgálatának, ezért választottuk tanulmányunk tárgyává az *Enterobacteriaceae* család különböző genusainak tagjait: munkánk során a *S. sonnei*, *P. penneri*, *E. coli* törzsek és izogén mutánsaik, valamint a *S. minnesota* R595 referencia törzs összehasonlító vizsgálatát végeztük el. Analitikai munkánk során vad típusú (S) baktériumokat, és ezek izogenikus 'R' mutánsait is felhasználtuk. Analizáltuk a fent említett baktérium törzsek sejt lizátumainak teljes fehérje tartalmát, amelynek jelentősége lehet a taxonómiai és epidemiológiai vizsgálatokban, valamint a nozokomiális infekciók kivizsgálásában. Ezen kívül elemeztük ezen Gram-negatív törzsek külső membrán fehérje profiljait, amelynek jelentőségét az adja, hogy ezek a komponensek számos bakteriális funkcióban töltenek be fontos szerepet (pl.: pórus formálás, receptor funkció, adhéziós folyamatban való részvétel, stb.). Így az OMP profilokban észlelt változások utalhatnak a baktérium sejt megváltozott permeabilitására, pathogenitására, colicin és fág érzékenységre.

A bakteriális fehérjék elemzésére egy új technikát, a 'dinamikus sieving' kapilláris elektroforézist alkalmaztuk, amely a fehérjék molekulású alapján történő elválasztását biztosította. Eredményeink értékelése során a bakteriológiában is széles körben alkalmazott, egy-dimenziós SDS-PAGE mintázatokkal hasonlítottuk össze a CE profilokat. A DSCE egy olyan, reprodukálható és karakterisztikus profilokat nyújtó technikának bizonyult, amely számos előnyös tulajdonsággal rendelkezik a hagyományos gél elektroforézishez képest: ezek közül kiemelném a gyors (percekben belül történő) fehérje elválasztást, a nagyon kis minta szükségletet, az automatizálhatóságot, és az azonnali kvantitatív elemzés lehetőségét. Mindezen tényezőknek igen nagy jelentősége lehet nagyszámú bakteriális minta kiértékelésénél, illetve sürgős esetekben. Habár a CE és SDS-PAGE profilok között különbségeket tapasztaltunk, mind a két módszer a vizsgált baktériumokra jellegzetes, reprodukálható eredményeket nyújtott.

Tanulmányunk során nemcsak a teljes protein profilok és OMP-k összehasonlító vizsgálatát végeztük el, hanem vizsgáltuk számos külső tényező hatását is a baktérium sejt fehérje összetételére. A DSCE alkalmasnak bizonyult az antibiotikumok és mutációk OMP profilra gyakorolt hatásának elemzésére, az LPS módosulásokkal asszociált OMP változások

kimutatására, és a protein profilok és hagyományos bakteriológiai virulencia tesztek közötti összefüggések vizsgálatára. Az OMP profilokban észlelt eltérések hatással lehetnek a baktérium sejt permeabilitására, antibiotikum érzékenységére, megbetegítő képességére, toxicitására, így ezen vizsgálatoknak klinikai jelentősége lehet. Azonban ezen tényezők közötti összefüggések pontos feltárása még további vizsgálatokat igényel.

Mindezek alapján úgy gondoljuk, hogy a kapilláris elektroforézis egy értékes, effektív, pontos, kvantitatív módszer, amely egy új és modern technológia bevezetését jelentheti a bakteriális fehérjék elemzésébe. A jövőben a CE még számos nehezen, vagy lassan analizálható sejt komponens és funkció vizsgálatában nyújthat gyors és hatékony megoldást a bakteriológia területén.

Publikációs jegyzék

Kustos, I., Kocsis, B., Kilar, F.:

Determination of protein profile and outer membrane proteins of bacteria by capillary electrophoresis
Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica 1997, 44, p.: 400 (Abstract)

Kustos, I., Kocsis, B., Kerepesi, I., Kilar, F.:

Protein profile characterization of bacterial lysates by capillary electrophoresis
Electrophoresis 1998, 19(13), 2317-2323

Kustos, I., Kocsis, B., Kerepesi, I., Kilar, F.:

Changes in outer membrane protein profiles of bacteria after meropenem induced postantibiotic effect studied by capillary electrophoresis
Electrophoresis 1998, 19(13), 2324-2330

Kustos, I., Kocsis, B., Kerepesi, I., Kilar, F.:

Examination of the postantibiotic effect of Meropenem on outer membrane proteins and lipopolysaccharides of Gram-negative bacteria by capillary electrophoresis
Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica 1999, 46, p.: 129 (Abstract)

Kustos, I., Tóth, V., Kilar, F., Kocsis, B., Emődy, L.:

Effect of spontaneous and induced mutations on outer membrane proteins and lipopolysaccharides of *Proteus penneri* strain 357
Advances in Experimental Medicine and Biology 2000, 485: 177-182

Kustos, I., Tóth, V., Kocsis, B., Kerepesi, I., Emődy, L., Kilar, F.:

Capillary electrophoretic analysis of wild type and mutant *Proteus penneri* outer membrane proteins
Electrophoresis 2000, 21(14), 3020-3027

Előadások és poszter demonstrációk:

Kustos I., Kocsis B., Emődy L., Kilár F.:

Baktériumok fehérje profiljának meghatározása kapilláris elektroforézissel
I. Korányi Frigyes Tudományos Fórum, Budapest, 1997

Kustos I., Kocsis B., Emődy L., Kilár F.:

Determination of bacterial protein profile by capillary electrophoresis
4th Symposium on Instrumental Analysis, Graz, Austria, 1997

Kustos I., Kocsis B., Kilár F.:

Baktériumok fehérje profiljának és külső membrán proteinjeinek meghatározása kapilláris elektroforézissel
Magyar Mikrobiológiai Társaság 1997. évi Nagygyűlése, Szekszárd, 1997

Kustos I., Kocsis B., Kilár F.:

Determination of bacterial protein profiles and outer membrane proteins by capillary electrophoresis
8th European Students' Conference at the Charité, Berlin, Germany, 1997

Kilár F., Peltre G., Kustos I., Török B., Kerepesi I., Kocsis B.:

Complex capillary electrophoretic patterns of biologically active mixtures
Electrophoresis Forum '97, Strasbourg, France, 1997

Kustos I., Kocsis B., Kerepesi I., Kilár F.:

Examination of the postantibiotic effect of meropenem on the outer membrane proteins of Gram-negative bacteria by capillary electrophoresis
Second European Congress of Chemotherapy, Hamburg, Germany, 1998

Kustos I., Kocsis B., Kerepesi I., Kilár F.:

Meropenem Gram-negatív baktériumok külső membrán fehérjeire gyakorolt postantibiotikus hatásának vizsgálata kapilláris elektroforézissel
Magyar Kemoterápiás Társaság XIII. Konferenciája, Debrecen, 1998

Kustos I., Kocsis B., Kerepesi I., Kilár F.:

Postantibiotic effect of drugs on Gram-negative bacteria followed by capillary electrophoresis
11th International Symposium on Capillary Electrophoresis, Venice, 1998

Kustos I., Kocsis B., Kerepesi I., Kilár F.:

Gyógyszerek postantibiotikus hatásának kimutatása baktériumok fehérje összetételére kapilláris elektroforézissel
Elválasztástudományi Vándorgyűlés, Lillafüred, 1998

Kustos I., Kocsis B., Kerepesi I., Kilár F.:

A meropenem Gram-negatív baktériumok külső membrán fehérjeire gyakorolt postantibiotikus hatásának vizsgálata kapilláris elektroforézissel
Magyar Mikrobiológiai Társaság 1998. évi Nagygyűlése, Miskolc, 1998

Kustos I., Tóth V., Kilár F., Kocsis B., Emődy L.:

Investigation of outer membrane components of *Proteus penneri* strains by electrophoretic methods
13th International Congress of Microbiology, Budapest, 1999

Kocsis B., Kustos I., Péterfi Z.:

Isolation and characterization of a *Shigella sonnei* absolute rough mutant
13th International Congress of Microbiology, Budapest, 1999

Kustos I., Tóth V., Kilár F., Kocsis B., Emődy L.:

Investigation of outer membrane components in wild type and isogenic mutants of *Proteus penneri* 357 strain by electrophoretic methods
Balaton Symposium '99 Siófok, 1999

Kustos I., Tóth V., Kilár F., Kocsis B., Emődy L.:

Effect of spontaneous and induced mutations on outer membrane proteins and lipopolysaccharides of *Proteus penneri* strain 357
Genes and proteins underlying microbial urinary tract virulence: Basic aspects and applications – FEMS Symposium, Pécs, 1999

Kustos I., Kocsis B., G. Blum-Ohler, J. Hacker, Emődy L., Kilár F.:

Vad típusú és izogén mutáns *Escherichia coli* külső membrán komponenseinek vizsgálata elektroforétikus módszerekkel
Magyar Mikrobiológiai Társaság 2000. évi Nagygyűlése, Keszthely, 2000