

PhD értekezés tézisei

Pseudomonas törzsek
külső tényezők hatására bekövetkező
szerkezeti és aktivitásbeli változásai

Írta: Felső Péter

Témavezetők: Dr. Kocsis Béla egyetemi docens

Dr. Kilar Ferenc egyetemi tanár

Programvezető: Dr. Emödy Levente emeritus professzor

Pécsi Tudományegyetem

Klinikai Központ

Orvosi Mikrobiológiai és Immunitástani Intézet

Pécs, 2014

1. Bevezetés

1.1 Általános bevezető

A *Pseudomonas* genus több mint 200 fajt foglal magába, melyek többsége a talajban és vizekben élő szaprofita. Gram-negatív, spórát nem képző, poláris csillóval rendelkező pálcák. Valódi tokjuk nincs. Egyszerű táptalajon is jól szaporodnak. Nem fermentáló, obligát aerob baktériumok.

A számos *Pseudomonas* species közül a legtöbbet kutatott és orvosi szempontból is legjelentősebb a *P. aeruginosa*. Széles hőmérsékleti tartományban túlélni és szaporodni képes baktérium. Nagy mennyiségben képes exopoliszacharid termelésére, amely segíti az adhéziót és nagymértékben nehezíti a baktérium elleni védekezést a szervezetben. Gyakori nozokomiális kórokozó, más szóval kórházi fertőzéseket okozó baktérium. A baktérium tenyésztése nem okoz nehézséget, egyszerű táptalajon is jól szaporodik. A telepek édes, hársfa illatúak, a színük zöldes a vízőldékony pyoverdin, vagy kékes a pyocianin, esetleg vöröses a pyorubin pigmentek termelése következtében. Véres agar táptalajon jellemzően erős béta-hemolízist okoz. Ami a *P. aeruginosa* patogenitását illeti, elsősorban az immunológiailag károsodott szervezetben okoz megbetegedést. Egyes virulencia faktorok az invazív készséget növelik, mások valódi toxinként hatnak és vannak, amelyek a szervezet védekező mechanizmusainak hatásosságát csökkentik. A *P. aeruginosa* egy poláris csillóval és számos pílussal rendelkezik, melyek a baktérium adhéziós képességét növelik.

A *P. aeruginosa* virulencia faktorai közül jelentős a diftéria toxinnal azonos hatásmechanizmusú A toxin, amin kívül még exoenzim S, különböző proteázok, elasztázok, hemolizinek és a foszfolipáz C játszanak szerepet a patomechanizmusban. Nem szabad megfeledkezni arról sem, hogy Gram-negatív jellegéből kifolyólag endotoxinnal is rendelkezik, mely szepszis alkalmával nagy mennyiségben szabadul fel és fejt ki biológiai hatását.

A *P. aeruginosa* baktériummal szembeni orvosi fellépést csak nehezíti a törzsek magas fokú antibiotikum rezisztenciája. Ez nagyrészt a külső membrán alacsony áteresztő képességének, a β -laktamázok termelésének és az efflux pumpa mechanizmusnak köszönhető, mely által a baktérium képes a membránján már átjutott szereket kipumpálni a külvilágba.

1.2 A Gram-negatív sejtfa

A bakteriális sejtfa a sejt mechanikai védelmére, alakjának a belső ozmotikus nyomással szembeni fenntartására, a káros anyagok távoltartására, a táplálékfelvétel és szekréció biztosítására, általánosságban a környezettel való kapcsolat fenntartására szolgál. A sejtfa egyik fő alkotó eleme a peptidoglikán, amely N-acetil glukozaminból és N-acetil-muraminsavból álló lánc, melyet a muraminsavhoz kötött tetrapeptidek között kialakuló kötés kapcsol össze egy háromdimenziós térhálós rendszerre. A keresztkötések sűrűsége határozza meg a szerkezet erősségét, ami a Gram-pozitív baktériumoknál nagyobb, mint a Gram-negatívoknál és ez az általában nagyobb belső ozmotikus nyomást egyensúlyozza. A *P. aeruginosa* a Gram-negatív baktériumok közé tartozik, melyeknek a sejtfa felépítése összetettebb, mint a Gram-pozitívoké. A Gram-negatív baktériumsejtek esetében a citoplazmamembrántól kifelé haladva a periplazmatikus teret találjuk, amely magába foglalja a Gram-pozitívoktól eltérően jóval kevesebb rétegszámú peptidoglikánt. A periplazmatikus tér nagyon fontos a Gram-negatív baktériumok számára, oldott fehérjék, antibiotikum degradáló enzimek, szállító molekulák és még sok, a baktérium ellenálló képességét fokozó enzim és sok más egyéb fehérje található itt.

A Gram-negatív baktériumok sejtfaának legkülső rétegét a külső membrán alkotja, mely több komponensből épül fel. Lipoprotein kettős réteg, aminek a külvilág felőli felszínébe az endotoxikus lipopoliszacharidák (LPS), illetve egyes baktériumoknál lipooligoszacharidok (LOS) vannak beépülve. Ezeknek a molekuláknak a legbelső, a külső membránba nyomuló eleme a lipid A, mely az endotoxin molekula toxikus alkotórésze. Ez egy speciális fosfolipid, mely majd minden Gram-negatív baktérium esetében nagyon hasonló. Belülről kifelé haladva a lipopoliszacharid molekula következő része az R mag, amelynek elkülöníthető belső és külső része van. Mindkettő nagy fokban konzervált, cukormolekulák alkotják. Az R magot követő endotoxin komponens az O specifikus oldallánc. Ez adja a Gram-negatív baktériumok fő felszíni antigénjét, az O-antigént. Felépítésében cukormolekulák játszanak szerepet, melyeknek a fajtája, mennyisége és kapcsolódási sorrendje nagy változatosságot mutat, így alakítva ki a számos és különböző szerotípust. A kórokozók LPS-ének változatossága a fertőzések esetében jelentősen megnehezíti a gazdaszervezet védekezését.

A külső membránban számos porin fehérje található, melyek „csatornát” képeznek a membránon át, lehetővé téve anyagok transzportálását a baktériumsejtbe és onnan kifelé. A

csatornafehérjéken kívül még sok más fehérjét tartalmaz a külső membrán, melyeket összefoglalóan külső membránfehérjék (OMP) néven említeneek.

2. Célkitűzések

A *P. aeruginosa* tág hőmérsékleti tartományban életképes baktérium, mely fertőző képességét is megőrzi, viszont eltérő körülmények közt tenyésztve szabad szemmel is látható változások figyelhetők meg mind a telepek színében, mind morfológiájában.

1. Célunk az eltérő hőmérséklet hatására a baktérium fehérjeiben és endotoxinjában bekövetkező változások vizsgálata
2. Célunk a hőmérséklet hatásának vizsgálata a *P. aeruginosa* baktérium eukarióta sejteken mutatott inváziós képességére.
3. Célunk a szegfűszeg és fahéj illóolaj hatásának vizsgálata a *P. aeruginosa* külső membránfehérjeire. Célunk a baktérium szerkezetbeli változásainak felderítése, továbbá a hatásos illóolaj komponensek azonosítása.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Baktériumtörzsek

A kísérletekhez használt baktériumtörzsek a *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 és *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 törzsek voltak. A törzsek a Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Orvosi Mikrobiológiai és Immunitástani Intézet gyűjteményéből származtak.

3.2. Külső membránfehérjék izolálása

A *P. aeruginosa* PAO1 törzset 500 ml Mueller-Hinton táptalajba oltottuk, majd egy éjszakán át rázó-termosztátba helyeztük. Az inkubáció három különböző hőmérsékleten: 25, 37 és 42°C-on történt. Másnap a baktérium tenyészetet lecentrifugáltuk (4000 g, 60 perc, 4°C), az üledéket pedig fiziológiás sóoldatban szuszpendáltuk. A szuszpenziót az előbbi paraméterekkel újra centrifugáltuk, majd ezt a mosási lépést még egyszer megismételtük. Ezt követően 15 ml szonizáló pufferben vettük fel a mintákat, ultrahanggal feltártuk, majd lecentrifugáltuk (6000 g, 15 perc, 4°C), és a felülúszót leválasztottuk a további ultracentrifugáláshoz (100.000 g, 60 perc, 4°C). Ezt követően az üledéket 5 ml 0,5 %-os *N*-laurylsarcosin oldatban szuszpendáltuk, 20 percen át szobahőmérsékleten inkubáltuk és újra ultracentrifugáltuk. A külső membrán fehérjék az üledékben helyezkedtek el.

3.3. Endotoxin tisztítás

A baktériumokat 8 liter Mueller-Hinton táptalajba oltottuk, majd egy éjszakára rázó-termosztátba helyeztük (200 rpm). A tenyészetet 3000 g-n, 40 percig, 4°C-on centrifugáltuk. A felülúszót eltávolítottuk, majd az üledéket kétszer mostuk fiziológiás sóoldattal. A baktériumokhoz ezt követően 150 ml desztillált vizet öntöttünk, majd összekevertük. A mintát ultrahangos fürdőbe helyeztük 2 percre. A szuszpenzióhoz ezután 150 ml 90%-os fenolt adtunk, majd a mintát 56°C-os vízfürdőbe helyeztük. A fenol-víz fázis megszűnésével lehetővé vált a minta összekeverése. 10 percig kevertük a mintát ezen a hőmérsékleten, majd 4°C –ra hűtést követően centrifugáltuk (3000 g, 40 perc, 4°C). A vizes fázist külön gyűjtöttük a fenol fázistól, melyhez ezután ismét 150ml desztillált vizet adtunk és az 56°C-on történő keverést megismételtük. A mintát az előző paraméterekkel ismét centrifugáltuk és a vizes fázist az előzőhöz gyűjtöttük, majd dializáló zsákba téve 6 napig dializáltuk. A mintát kis térfogatra bepárooltuk és ultracentrifugáltuk (4 óra, 100.000 g, 4°C), az üledéket desztillált

vízben szuszpendáltuk, majd még háromszor megismételtük a centrifugálást. A végső üledék tartalmazta az endotoxint, amit liofileztünk.

3.4. Lipid A preparálás

A liofilezett endotoxin minta 5 mg-jához 5 ml 1%-os ecetsavat adtunk, 1 órán át 100°C-os vízfürdőben inkubáltuk, majd a mintát lecentrifugáltuk (8000 g, 20 perc, 4°C). A centrifugálást követően a csőben lévő üledék tartalmazta a lipid A-t. Az ecetsav eltávolítása érdekében a mintát liofileztük.

3.5. Poliakrilamid gélelektroforézis

A vizsgálataink során 4%-os stacking és 14%-os szeparáló poliakrilamid gél alkalmaztunk, a futtatást 120 V feszültségen 60 percre végeztük. A fehérjeminták elválasztását követően a gél lapokat Coomassie Brilliant Blue festő oldatban inkubáltuk 14 órán át. Az inkubáció leteltével a differenciáló oldattal eltávolítottuk a gélekből a fehérjéhez nem kötődött festéket, majd GE ImageScanner és MagicScan segítségével kiértékeltek.

3.6. Fehérje koncentráció meghatározása

A minták fehérje-koncentrációjának meghatározásához Bio-Rad DC Protein Assay Kit-et használtunk a forgalmazó utasítása szerint. Fluostar Optima (BMG Labtech GMBH, Ortenberg, Germany) műszerrel 675 nm-en végeztük a koncentrációmérést.

3.7. Kétdimenziós gélelektroforézis

A baktériumokból kinyert külső membránfehérje mintákat minta puffer A-ban oldottuk fel. A kísérlethez 7 cm-es lineár 3-10 pH grádiensű gélcsíkokat használtunk. A gélcsíkokra 80 µg fehérjét vittünk fel, majd rehidratáltuk őket. Ezt követően 800 µl ásványi olajat pipettáztunk rájuk. Az így összeállított mintákat 16 órán keresztül inkubáltuk szobahőmérsékleten, majd következett az izoelektromos fókuszálás.

Az 1. dimenzió (izoelektromos fókuszálás) futtatása 3 szakaszban történt:

- 1, 250 V, linear, 2 órán át
- 2, 500 V, linear, 2 órán át
- 3, 4000 V, rapid, 10000 VH (voltóra)-ig

A géleket ezt követően lecsepegtettük és a rehidratáló rekeszben egy éjszakán át -80 C° -on tartottuk, majd másnap equilibráltuk őket. Az equilibrálást követően a már elkészített 12%-os poliakrilamid gélre helyeztük a strip-eket, a fehérje standard felvitelét követően 120 V feszültséggel megkezdtük a második dimenziós futtatást, amelynek a menete megegyezett a PAGE módszerben leírtakkal.

3.8. Fehérjék kinyerése gélből

A fehérjék gélből való kinyerését Shevchenko (2006) féle módszerrel végeztük.

3.9. MALDI-TOF tömegspektrometria

A tömegspektrometriai méréseket Autoflex II MALDI-TOF/MS műszerrel végeztük (Bruker Daltonics, Bréma, Németország).

A fehérje azonosításához a MASCOT algoritmust használtuk (<http://www.matrixscience.com>) és az adatbáziskeresést Swiss-Prot adatbázisban (Swiss Institute of Bioinformatics, Genf, Svájc) a következő paraméterekkel végeztük:

- karbamid-metil cisztein mint állandó változás,
- a metionin oxidáció, mint változó módosítás,
- a tömegpontosság MS mérés esetében 3 Da-on belül,
- MS-MS esetén 0,8 Da-,
- az enzim elmaradt hasítási helyeinek száma: 2

3.10. Lab-on-a-chip technika

A vizsgálatokhoz az Agilent 2100 bionalyzer-t használtuk (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). A méréseket és kiértékelést a High Sensitive Protein 250 programmal és a hozzá való kittel végeztük.

3.11. Sejtinváziós kísérletek

A sejtinváziós kísérletek az A549-es sejtvonalon történtek. A kísérletet Steele-Mortimer (2008) alapján leírtak szerint végeztük. A fertőző csíraszám/csésze 10^9 volt.

3.12. Sejtek mikroszkópos vizsgálata

A sejtek festését Mileykovskaya (2000) alapján végeztük. A mikroszkópos vizsgálathoz pedig Olympus IX 81-es mikroszkópot és Hamamatsu Orca kamerát használtunk.

3.13. Gázkromatográfiás vizsgálat

Az illóolajok összetételét tömegspektrométerhez kapcsolt gázkromatográfiás készülékkel (Agilent 6890N GC, 5973N) határoztuk meg. Az elválasztás HP-5MS kapilláris oszlopon történt. A komponensek azonosítása NIST spektrum könyvtár és irodalmi adatok alapján történt. A komponensek százalékos arányának meghatározására lángionizációs detektorral (FID) felszerelt Fisons GC 8000 gázkromatográfiás készüléket alkalmaztunk. Az illóolaj komponensek azonosítását retenciós idő alapján és belső standard hozzáadásával végeztük el, a komponensek százalékos meghatározása területnormalizációval történt.

3.14. Csőhígítási módszer illóolajok minimális baktericid koncentrációjának meghatározására

5 %-os illóolaj emulzió készítése: 100 µl illóolaj + 40 µl 10 %-os poliszorbát 80 (vizes oldat) + 1860 µl Mueller-Hinton folyékony táptalaj. Ezt vortexel homogenizáltuk. Majd a hígítási sor készítése felező léptékben történt 5 és 0,02 %-os v/v koncentráció közt. Kontroll csövek: a - csak táptalajt tartalmazó, b – baktérium szuszpenzió, melybe nem került illóolaj emulzió, c – 0,2 % poliszorbát 80-at tartalmazó táptalaj és baktérium szuszpenzió. Minden csőhöz 10 µl-t adtunk az OD 600nm 1,00-es baktérium szuszpenzióból. Ezután inkubálás következett 24 órán keresztül 37 °C-on, majd kioltás 10 – 10 µl csőenként az értékeléshez Mueller-Hinton agarra. Majd újabb inkubálás 24 órán keresztül 37 °C-on, és a telepkezők megszámlálásával az eredmények leolvasása.

4. Eredmények

4.1. A hőmérséklet hatása a baktériális flagellinre és külső membránfehérjékre

4.1.1. A kétdimenziós elektroforézis eredményei

A *P. aeruginosa* (PAO1) tenyészeteket három különböző hőmérsékleten inkubáltuk (25°C, 37°C, 42°C). A tenyészetekből fehérjéket izoláltunk, majd a mintákat kétdimenziós gélelektroforézissel választottuk el. A gélekből való emésztést követően a következő fehérjéket azonosítottuk: MALDI-TOF tömegspektrométer segítségével a 25°C-os minta esetében: flagellin, OprF, porin. A 37 °C-os mintánál: Opr86, OstA, OprD, kettő féle flagellin, OprF, porin, hypothetical protein PA2318, lipid A 3-O-deaciláz, míg a 42 °C-os minta esetén: Opr86, OstA, OprD, három féle flagellin, OprF, porin, hypothetical protein PA2318, lipid A

3-O-deaciláz. A három minta közül a 25°C-on tenyésztett baktérium fehérjéi mutatták a legkisebb intenzitást és legszegényebb összetételt. A két magasabb hőmérsékleti tartományban tenyésztett baktériumokból izolált fehérjék nagyon hasonlóak. Mindhárom minta esetében a porin fehérjék, mint várható volt, több típusukkal is képviseltetik magukat a külső membránfehérjék közt. Az Opr86-ot a törzs 25°C-os tenyészetéből nem tudtuk kimutatni. Ebből arra következtethetünk, hogy az alacsonyabb hőmérséklet hatással van a külső membrán összeépülésére, ezáltal befolyásolja a membrán-permeabilitást is. A többi csatorna fehérje jelentős szerepet játszik az antibiotikumokkal szembeni rezisztenciában, mint például az OprD vagy az OprF. Az OprD fehérjét csak a 37 és 42°C-on tenyésztett baktérium mintákból sikerült azonosítani, míg az OprF mindhárom hőmérsékleten tenyésztett baktériumban megtalálható volt, de legintenzívebben a 25°C-os inkubációt követően fejeződött ki. Elsősorban a kórházi fertőtlenítők alkalmazásakor a szerves oldószerek elleni rezisztenciában az OstA fehérje hiánya játszik szerepet. A fehérje a gélképek közt csak a 37 és 42°C-os inkubáció során expresszáldott külső membránfehérjék közt található, így feltételezhetjük a 25°C-on inkubált *P. aeruginosa* (PAO1) a másik két inkubációs körülményhez viszonyítva szerves oldószerekkel szemben érzékenyebb. A kimutatott fehérjék közt a flagellin fehérje is megtalálható volt eltérő összetételben és intenzitásban, mely fehérje a baktérium csilló felépítésében játszik szerepet.

4.2. Az endotoxin minták vizsgálata

4.2.1. Mikrochip módszerrel kapott eredmények

A 37°C-os inkubációt követően izolált LPS minta lényegesen intenzívebb csúcsokat adott, mint a másik két hőmérsékleten keletkezett LPS-ek. A mérés 35. másodpercéig a három minta közel azonos csúcyszámot mutatott, igaz a csúcsok intenzitásbeli különbsége szembeötlő. 35 másodpercet követően, azonban míg a 37°C-os minta jele ellaposodtak, addig a 25°C-osé, de elsősorban a 42°C-osé emelkedni kezdett. A magasabb hőmérsékleten inkubált mintáknál a csúcsok jobb elválása volt látható. Ezek az eredmények jelentős számú cukor O-oldalláncot jeleznek a magasabb tömegtartományban. A cukor O-oldalláncok összetételében való különbség befolyásolhatja a szervezet fertőzésre adott válaszát.

4.2.2. ESI-IT-MS módszer használatával nyert eredmények (lipid A)

A *P. aeruginosa* (PAO1) endotoxinjának lipid A mintázatát ESI-IT-MS negatív ion módban használt tömegspektrométer segítségével tártuk fel. A penta- és hexaacilált alkotók nemcsak mennyiségi, de minőségi különbségeket is mutatnak az eltérő hőmérsékleten tenyésztett baktériumok lipid A-jában. Alacsonyabb hőmérsékleti viszonyok közt a hexaacilált lipid-A komponensek aránya jelentősen magasabb, mint a két másik hőmérséklet esetén. Összehasonlítva a penta-acilált komponensek egy mintán belül egymáshoz viszonyított intenzitását, látható, hogy a három mintában ezek a viszonyok megváltoztak. Ez alapján megállapítható, hogy a tenyésztési hőmérséklet befolyásolta a *P. aeruginosa* (PAO I) lipid A mintázatát. A Gram-negatív baktériumok lipopoliszacharid alkotórésze fontos szerepet játszik a baktérium és a gazda sejtek kapcsolatában. A hidrofób jellegét meghatározó lipid A rész és a hidrofil tulajdonságért felelős cukorláncok befolyásolják ezt a kapcsolatot. Ezekben a részekben bekövetkező változások szerepet játszanak a baktérium hidrofóbicitásában, következésképpen a baktérium adhéziós képességében.

4.3. Az inkubációs hőmérséklet hatásának vizsgálata a *P. aeruginosa* (PAO1) sejtinváziós képességére

A *P. aeruginosa* (PAO1) a humán eukaryota sejtekbe bejutni képes baktérium. A baktériumok inváziós képességét három különböző hőmérsékleten - 25°C, 37°C és 42°C - történő tenyésztést követően vizsgáltuk A549 sejtenyészeti rendszerben. Az eredményekből arra következtethetünk, hogy a *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1) inváziós képessége változik a tenyésztési hőmérséklet hatására. A 37 °C-os mintákhoz viszonyítva a 25 °C-os minták kevesebb, mint fele olyan mértékben voltak képesek a sejtekbe jutni, míg a 42 °C-on növesztett baktériumok inváziós eredményei az ideális hőmérsékleten inkubáltak 4%-át érték csak el. Ennek a változásnak több oka lehet. Az egyik lehet például a baktériumok sejten való megtapadásához szükséges pilusok és sejtfelszíni fehérjék kifejeződése. A másik ok lehet a *Pseudomonas* törzsek esetében az extracellulárisan kiválasztott nyák anyag, és a biofilm képződés. A vizsgálathoz használt három különböző hőmérsékleten inkubált baktérium telepei szabad szemmel is látható különbséget mutattak színükben és telep morfológiájukban.

4.3.1. A baktériális sejtinvázió mikroszkópos vizsgálata

A *P. aeruginosa* (PAO1) okozta sejtinvázió bizonyítása érdekében mikroszkóppal vizsgáltuk az invázióknak kitett sejteket. A baktériumok specifikus jelöléséhez Nonyl Acridine Orange fluorescens festéket használtunk, amely festék specifikusan kötődik a baktérium membránban lévő kardiolipinhez. A mikroszkópos vizsgálat eredményei azt mutatják, hogy a baktériumok jellemzően behatárolható területeken helyezkednek el, amely területek az eukaryota sejteknek felelnek meg.

4.4 Az illóolajokkal végzett kísérletek eredményei

A vizsgálatokat a *P. aeruginosa* PAO1-es és a *P. aeruginosa* ATCC 27853-es jelzésű törzseken végeztük. A kísérletek során a baktérium életképességére gyakorolt hatást és a fehérjéinek összetételében bekövetkező változásokat vizsgáltuk. A választott minták a szegfűszeg és a fahéj illóolajai voltak.

4.4.1. A PAO1 törzs esetében számos különbség volt látható a kontroll és fahéj illóolaj kezelést követően a baktérium külső membránfehérjéiben. A 0,5 MBC értékű illóolaj kezelés kevésbé okozott változást a fehérje összetételében, mint a 2 MBC értékű dózis, de az előbbi mintánál is jól láthatók a mennyiségi különbségek, bár a fehérje mintázat és a jelek száma közel azonos a kontroll mintáéval. A 0,5 MBC koncentrációjú fahéj illóolaj a chip mérés alapján a 40 és 60 kDa közötti fehérjék intenzitásbeli növekedését mutatta ki a kontroll mintához képest, továbbá a kontroll mintában jelen lévő 80,8 kDa-os fehérje hiányát. A magasabb dózisú fahéj illóolaj kezelés már nagyobb mértékben változtatta a külső membránfehérjék összetételét a chip mérés alapján. A két mérési eredményt összehasonlítva a leglátványosabb különbség az alkotók hiánya. A 42,7 kDa méretű fehérje a kezelt mintában nem mutatható ki, hasonlóképpen viselkedik a kontroll minta 80,8 kDa-os fehérjéje is. A fahéj illóolaj kezelés hatására a kontroll mintához viszonyítva a magasabb tömegtartományban pedig jelentős hiányt detektáltunk. A 140 kDa feletti tartományban látható három erős és kettő gyengébb jelet adó fehérje teljesen eltűnt az illóolaj kezelés hatására. A microchip módszerrel kapott eredményekkel összehangban álltak a PAGE módszer eredményei is. A magasabb tömegtartományban egy jól látható sáv volt jelen a kontroll mintában, ami csupán a fahéj illóolaj 0,5 MBC értékű kezelését követően mutatható ki, de kisebb intenzitással. A magasabb tömegtartományban a kontroll minta kettő sávot tartalmaz, míg a kezelt minták csak egyet. Továbbá, a hozzávetőlegesen 35 kDa tartományban látható sáv minden egyes kezelt minta esetén erősebb intenzitást mutat, mint a kontrollban. A 2 MBC kezelésekre hatására ennek

intenzitása még a 0,5 MBC által indukált intenzitás növekedést is túllépi. A legalacsonyabb tömegtartományt jelölő sáv felett közvetlenül szintén egy erőteljes sáv megjelenését láttuk. Ennek a fehérjének az előbbivel ellentétesen, a 2 MBC kezelések hatására az intenzitása csökkent a 0,5 MBC kezeléshez viszonyítva, amely közel azonos megjelenést mutat a kontroll mintáéval. Ezzel a mintázattal megegyezést mutat a körülbelül 25 kDa tartományban látható sáv.

4.4.2. Az illóolaj kezelés a *P. aeruginosa* 27853-as törzs külső membránfehérjéinek összetételét is megváltoztatta. A minták közül csak a 0,5 MBC értékű fahéj illóolaj kezelés hatására jelent meg a mintákban a 57 kDa-os fehérje. A kezelések hatására azonban a 71 kDa-os fehérje eltűnt a mintákból. A 2 MBC értékű szegfűszeg illóolaj hatására kialakult legjobban látható különbség a megnövekedett intenzitású 38,6 kDa-os fehérje. A 40 kDa körüli tartományban lévő kisebb tömegű fehérjét jelölő sáv a kontroll mintában tapasztalható intenzitást minden kezelt minta esetében túllépi, de elsősorban a fahéj illóolaj kezelések hatására. A tartományban még megjelent egy nagyobb molekula tömegű fehérjét jelölő sáv, amely csak a 0,5 MBC értékű fahéj illóolaj kezelés hatására volt kimutatható. A nagyobb molekula tömegtartományban két sáv látható a kontroll minta esetén, viszont a kettő közül a kisebb tömegű fehérjét jelölő sáv a kezelt minták egyikében sem volt kimutatható. A jelölt tartományokon kívül körülbelül a 15 kDa molekula tömegtartományban minden minta esetén erős fehérje sávot mutat a gél kép. Ez a sáv a kontroll és fahéj illóolaj kezelésen átesett mintákban közel azonos intenzitású, míg a szegfűszeg illóolajjal inkubált minták esetében halványabb megjelenést mutat.

A gélekből 3 sávot kivágtunk, majd MALDI-TOF segítségével azonosítottuk. Az eredmények kimutatták a d1 sávok flagellin tartalmát 21,7 %-os szekvencia lefedettséggel, míg a 3d2 sávból dihidrolipoamid dehidrogenáz enzimet sikerült azonosítani 10,7 %-os lefedettséggel.

5. Összefoglalás

Munkánk során igazoltuk, hogy

1. A külső tenyésztési hőmérséklet befolyásolja a *P. aeruginosa* biokémiai folyamatait és azok intenzitását.
 - 1.1 A fehérje izolálást követő kétdimenziós elektroforézissel számos fehérjét sikerült azonosítanunk, melyek változatos képet mutatnak a három tenyésztési hőmérséklet hatására. Ezek a változások olyan porin és flagellin fehérjéket is érintettek, amelyek befolyásolhatják a baktérium életképességét, fertőzőképességét és antibiotikummal szembeni ellenálló képességét.
 - 1.2. Bemutattuk, hogy a hőmérséklet változása hatással lehet az endotoxin szerkezetére is, ami kihathat a gazdaszervezetben általa kiváltott reakciókra is, mivel a cukor O-oldalláncok összetétele befolyásolja a szervezetnek a kórokozóra adott választ. A lipid A réteg összetétele pedig megváltoztathatja bizonyos anyagok, így akár antibiotikumok baktérium sejtbe való jutását. Elmondhatjuk tehát, hogy a tenyésztési körülmények befolyásolják a *P. aeruginosa* szerkezetét és feltehetően ebből kifolyólag aktivitását és fertőzőképességét is.
 - 1.3. Az inváziós kísérletekkel képet kaptunk a baktérium fertőzőképességének változásairól, ami valószínűleg összefüggésbe hozható a fehérje-összetétel módosulásával is.
2. Az illóolajok újabb fajta felhasználásának vizsgálata során kimutattuk, hogy jelenlétük befolyásolja a baktérium fehérje-összetételét. Találtunk olyan fehérjéket, amelyek a kezelések hatására megjelentek és olyanokat is amelyek eltűntek. A minimális baktericid koncentráció (MBC) meghatározásával bizonyítottuk azt is, hogy az illóolajok megfelelő koncentrációban nemcsak gátolják a baktériumok növekedését, hanem azokat elpusztítani is képesek.

6. Publikációk

Makszin L, Kilár A, Felső P, Péterfi Z, Kocsis B, Kilár F (2012). Quantitative microfluidic analysis of S- and R-type endotoxin components with chip capillary electrophoresis. *Electrophoresis*. 33: 3351-3360. IF.: 3,261

Felső P, Horváth Gy, Bencsik T, Godányi R, Lemberkovics É, Böszörményi A, Böddi K, Takátsy A, Molnár P, Kocsis B. (2013): Detection of the antibacterial effect of essential oils on outer membrane proteins of *Pseudomonas aeruginosa* by lab-on-a-chip and MALDI-TOF/MS. *Flavour and Fragrance Journal* 28: 367-372, DOI 10.1002/ffj.3150. IF.: 1,824

Kovács Judit K, Felső P, Emödy L, Schneider Gy, Kocsis B (2014). Improved Isolation Protocol to Detect High Molecular Weight Polysaccharide Structures of *Campylobacter jejuni*. *Journal of Microbiological Methods*. 107: 55-57. IF.: 2.096

7. Konferencia szereplések

Poszterek

Makszin L, Kilár A, Felső P, Péterfi Z, Kovács K, Kocsis B, Kilár F.: Endotoxins with highly sensitive microfluidic CE analysis. CEEPUS 10th International Symposium and Summer School on Bioanalysis, Zágráb 2010.

Makszin L, Kilár A, Felső P, Kovács K, Kocsis B, Kilár F.: Endotoxins with highly sensitive microfluidic CE analysis. CECE 7th International Interdisciplinary Meeting on Bioanalysis, Pécs 2010.

Makszin L, Kilár A, Felső P, Kocsis B, Kilár F.: *Pseudomonas* törzsek vizsgálata mikrochip elektroforézis módszerrel, Magyar Elválasztástudományi Társaság Kongresszura, Tapolca 2010.

Felső P, Kilár F, Kocsis B. : Examination of the outer membrane proteins of *Pseudomonas* strains treated with different methods. International Congress of the Hungarian Society for Microbiology, Budapest 2011.

Dorn Á, Horváth Gy, Makszin L, Kilar A, Felső P, Kilar F., Emödy L, Schneider Gy.: Rosemary extract shows different effect on the growth of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains sakai and EDL933 and on the laboratory *Escherichia coli* strain MG1655. International Congress of the Hungarian Society for Microbiology, Budapest 2011.

Felső P, Pribér J, Barkó Sz, Kilar F, Kocsis B.: A celluláris invazivitás és a külső membrán fehérje (OMP) profil vizsgálata különböző hőmérsékleten tenyésztett *Pseudomonas* törzseken. Magyar Mikrobiológiai Társaság Kongresszusa, Keszthely 2012.

Felső P, Böddi K, Horváth Gy, Bencsik T, Godányi R, Lemberkovics É, Böszörményi A, Takátsy A, Kilar F, Molnár P, Kocsis B.: Az antibakteriális hatású illóolajok külső membrán fehérjékre gyakorolt hatásának vizsgálata. Elválasztástudományi Vándorgyűlés, Hajdúszoboszló 2012.

Makszin L, Kilar A, Felső P, Péterfi Z, Kocsis B, Kilar F.: S- és R-típusú endotoxin komponensek mennyiségi meghatározása microchip elektroforézissel. Elválasztástudományi Vándorgyűlés, Hajdúszoboszló 2012.

Horváth Gy, Bencsik T, Godányi R, Felső P, Lemberkovics É, Böszörményi A, Takátsy A, Molnár P, Kocsis B.: Lab-on-a-chip: a technique for detection of antibacterial effect of essential oils on outer membrane proteins. 43th International Symposium on Essential Oils, Lisbon 2012.

Makszin L, Kilar A, Felső P, Péterfi Z, Kocsis B, Kilar F.: Quantitative analysis of S- and R-type endotoxin components with chip capillary electrophoresis. International Symposium on MicroScale Bioseparations and Analyses. Genf 2012.

Kovács J.K, Felső P, Horváth Gy, Emődy L, Schneider Gy.: *Campylobacter jejuni* törzsek lipopoliszacharid mintázatának vizsgálata növényi illóolajok hatására. Magyar Mikrobiológiai Társaság Kongresszusa, Keszthely 2012.

Felső P, Böddi K, Kocsis B.: Influence of cultivation temperature on the composition of OMP and LPS in *Pseudomonas aeruginosa*. Balaton Symposium on high-performance separation methods, Siófok 2013.

Kovács J.K, Felső P, Emődy L, Schneider Gy, Kocsis B.: Lipopolisaccharide structure based comparative analysis of different *Campylobacter jejuni* strains. Magyar Mikrobiológiai Társaság Kongresszusa, Keszthely 2013

Horváth Gy, Kira E, Felső P, Lemberkovics É, Böszörményi A, Böddi K, Kocsis B : Effect of thyme and eucalyptus essential oils on outer membrana protein composition of *Pseudomonas aeruginosa*. 45th International Symposium on Essential Oils, Istanbul 2014