



TDK dolgozat

A biofilm képződésben szerepet játszó jelátvivő molekulák antimikrobiális peptidekkel képzett szupramolekuláris asszociátumai

Készítette: Ujvári Kamilla
Vegyésszmérnök MSc hallgató

Külső témavezető: Szigyártó Imola Csilla PhD
Beke-Somfai Tamás PhD

Belső témavezető: Pusztai Éva PhD



HUN-REN Természettudományi Kutatóközpont

Anyag- és Környezetkémiai Intézet

Biomolekuláris Önrendeződés Kutatócsoport

2024

Tartalomjegyzék

Jelölések jegyzéke.....	3
Absztrakt.....	4
1. Bevezetés.....	5
1.1. Antimikrobiális rezisztencia.....	5
1.2. Baktériumok csoportosítása	6
1.3. Biofilm képződés.....	8
1.4. Sejtek közötti kommunikáció a biofilmben	10
1.5. Pseudomonas aeruginosa.....	10
1.6. Liposzómák, mint modelmembrán rendszerek	11
1.7. Jelátvivő molekulák.....	12
1.7.1. Fenazin	13
1.7.2. Pilocianin.....	13
1.7.3. Pseudomonas kinolon.....	14
1.7.4. Decénsav	14
1.8. Gazdavédő peptidek	15
2. Célkitűzés	19
3. Vizsgálati módszerek	20
3.1. Ciklárás dikroizmus spektroszkópia	20
3.2. Infravörös spektroszkópia	22
3.3. Dinamikus fényszórás	23
3.4. Transzmissziós elektronmikroszkópia	24
4. Felhasznált anyagok	25
4.1. Anyagok	25
4.2. Vizsgálati körülmények.....	26
5. Kísérletek menete.....	26
5.1. Ciklárás dikroizmus (CD) spektroszkópia.....	26

5.2.	Liposzómák előállítása	27
5.3.	Infravörös spektroszkópia (IR).....	28
5.4.	Dinamikus fényszórás (DLS)	28
5.5.	Transzmissziós elektronmikroszkópia (TEM)	28
6.	Eredmények és értékelésük	29
6.1.	Pseudomonas kinolon kölcsönhatása antimikrobiális peptidekkel	29
6.2.	Piocianin kölcsönhatása antimikrobiális peptidekkel	33
6.3.	Decénsav kölcsönhatása antimikrobiális peptidekkel	34
6.4.	Pufferoldat hatása	35
6.5.	Pseudomonas kinolon kölcsönhatása liposzómákkal	36
6.6.	Decénsav kölcsönhatása liposzómákkal.....	40
6.7.	Piocianin kölcsönhatása liposzómákkal	43
7.	Összefoglalás.....	44
	Irodalomjegyzék	45
	Függelék.....	55

Jelölések jegyzéke

AHL:	acil-homoszerin lakton
AMP:	antimikrobiális peptid
ATR-FTIR:	csillapított totál reflexiós Fourier-transzformációs infravörös spektroszkópia
CD:	cirkuláris dikroizmus spektroszkópia
CF:	cisztás fibrózis
DEC:	cisz-2-decénsav
DLS:	dinamikus fényszórás
DOPC:	dileoil-foszfatidilkolin
DOPG:	dileoil-foszfatidilglicerin
DSSP:	Fehérjék másodlagos szerkezeteinek gyűjteménye (Dictionary of Secondary Structure of Proteins)
EPS:	extracelluláris polimer mátrix
HDP:	gazdavédő peptid
PAO1:	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> baktériumtörzs
PDI:	polidiszperzitási index
PHE:	fenazin
PQS:	<i>pseudomonas</i> kinolon
PYO:	piocianin
QS:	quorum érzékelés (quorum sensing)
TEM:	transzmissziós elektronmikroszkópia

Absztrakt

Az antibiotikum rezisztens kórokozók egyre nagyobb veszélyt jelentenek nemcsak az emberi egészségre nézve, hanem a teljes élővilágra. A szakértők szerint 2050-re az antibiotikum rezisztencia lesz a vezető halálozási ok, évente akár 10 millió halálesetet okozva.

^[1] A bakteriális fertőzések jelentős hányadánál biofilm képződés is fellép, ami nehezebben kezelhetővé teszi a fertőzést, valamint elősegíti a rezisztencia kialakulását.^[2] Az antimikrobiális peptidek használata ígéretes megközelítést jelenthetnek a biofilmmel kapcsolatos fertőzések kezelésére, a sejtek közti kommunikáció megakadályozásával. Ezt a kommunikációs folyamatot quorum érzékelésnek (QS) nevezzük, melynek során a baktériumok jelátvivő molekulákkal képesek szabályozni a biofilm méretét, az alkotó sejtek fenotípusát, a populáció számot és virulencia faktorokat.

Elővizsgálatainkban kimutattuk, hogy a humán LL-37 antimikrobiális peptid komplexet képez a pszeudo-kinolon jelzőmolekulával (PQS) ^[3] Vizsgálatainkat kiegészítettük további természetes és mesterséges eredetű membránaktív peptid és QS-ben szerepet játszó jelzőmolekulák kölcsönhatásának tanulmányozásával. A jelátvivő molekulák királis asszociátumokat képeztek a peptidekkel, melynek jellemzésére cirkuláris dikroizmust és infravörös spektroszkópiát, valamint az aggregátumok jelenlétének bizonyítására dinamikus fényszórást és transzmissziós elektronmikroszkópiát alkalmaztunk. Az ígéretes kombinációkat emlősök és baktérium sejtmembrán modelleken tovább vizsgáltuk a biofilm átjárhatósági mechanizmusának megértésére.

1. Bevezetés

1.1. Antimikrobiális rezisztencia

Az antimikrobiális szerek alatt értjük mindazon antibiotikumokat, vírus ellenes, gombaölő és parazita ellenes hatású gyógyszerkészítményeket, melyeket fertőzések kezelésére alkalmaznak. Az antimikrobiális rezisztencia során a kezelt mikroorganizmusok ellenállóképességet fejlesztenek ki az alkalmazott antimikrobiális szerre, az adott gyógyszeres terápiára nem reagálnak.^[4] Emiatt a fertőzések nehezebben vagy egyáltalán nem gyógyíthatók, könnyebben terjednek, súlyosbodik a betegség lefolyása, valamint nő a halálozás kockázata.^[5]

A múlt században a halálozások többségét klasszikus kórokozók okozták. Az ilyen betegségek tipikus tünetekkel és lefolyással rendelkeznek, gyorsan kifejlődő fertőzések, mint például a tetanusz, diftéria, kolera.^[6] Ezek a fertőzések antibiotikummal kezelhetők voltak, lefolyásuk során szabadon úszó mikrobiális sejtek terjedtek a gazdaszervezetben. Később a modern orvostudomány oltásokat fejlesztett ki sok baktériumtörzs ellen, így bizonyos fertőzéseket sikerült kiirtani, visszaszorítani (pl.: rózsahimlő, tuberkulózis, diftéria).^[7] Ezen oltások többségét a gyermekoltási program keretei között adják be csecsemőkor és tinédzserkor között, a kötelező és ajánlott védőoltások listája országonként változó.

Sajnos napjainkban a mikrobiológusok és az egészségügy egy nagy kihívással néz szembe, mivel a fertőzések jelentős része krónikusan fejlődik, akut jellegű és ellenálló az antimikrobiális kezelésekkel szemben. Az ilyen fertőzések jelentős többségében biofilm képződik. A biofilmet mikroorganizmusok (gombák vagy baktériumok) sejttelpei alkotják, ez egy rendezettebb életforma, a szabadon úszó, planktonikus sejteknél strukturáltabb.^[8] A biofilm sejtek beágyazódnak az általuk termelt extracelluláris polimer mátrixba, képesek fenotípus változtatással befolyásolni a növekedési sebességüket és a géntranszkripciót.^[9,10] A biofilmek a planktonikus sejtekkel ellentétben kötődnek egymáshoz, és általában egy felszínhez is irreverzibilisen kapcsolódnak. Ez a felszín lehet természetes szövet vagy mesterséges eredetű - általában valamilyen abiotikus orvostechnikai segédeszköz, például: katéter, szívritmusszabályozó, endotracheális tubulus, kontaktlencse, protézis vagy fogorvosi implantátum.^[6,11] Biotikus felületeken is megfigyelhető biofilm képződés (például: hámfelületen, nyálkahártyán, fogakon). Cisztás fibrózisban (CF) szenvedő betegek esetén visszatérő légúti megbetegedéseket okozhat, diabéteszes betegeknél fekélyek keletkezhetnek a lábon. Immunhiányos páciensek esetében a biofilmek számos nem kívánatos betegséget

idézhetnek elő: visszatérő húgyúti fertőzéseket, fogszuvasodást vagy periodontitist is kiválthat, mely súlyos esetben fogvesztéshez vezet.^[6,9]

Napjainkban az emberi szervezetben előforduló bakteriális fertőzések több, mint 80%-a biofilm képződéssel jár.^[6,12] In vivo vizsgálatok kimutatták, hogy a biofilmek képesek befolyásolni a gazdaszervezet immunválaszát, ami krónikus gyulladások kialakulásához vezet.^[13]

Mivel a biofilm fertőzéseket nehéz hagyományos antibiotikumokkal kezelni a betegek mortalitása magas, főként kórházi körülmények között. Az antibiotikumok napjainkban könnyen hozzáférhetőek, használatuk elterjedt mind emberi, mind állati célokra. Sajnos azonban túlhasználatuk, és számos esetben helytelen használatuk lehetőséget biztosít rezisztens baktérium törzsek gyors kifejlődésére. Mindemellett a biofilm telep lassú növekedési sebessége, az alvó sejtek jelenléte, illetve a baktériumok alacsony diffúziója is hozzájárul a rezisztencia kialakulásához.

Emiatt a biofilm fertőzések kezelése kifejezetten nehéz, a korábban kezelhető fertőzések egyre inkább kezelhetetlenné válnak, ami jelentős klinikai kihívásokat jelent. A hatékony első vonalbeli antimikrobás szerek elvesztése miatt egyre inkább a második és harmadik vonalbeli terápiákat alkalmazzák, amelyek gyakran drágábbak, toxikusabbak és hosszabb kezelési időt igényelnek, néha csupán az orvostechikai eszköz vagy fertőzött szövet műtéti úton történő eltávolítása jelent megoldást a gyógyulásra.^[14] Az elhúzódó betegségek a hosszas kórházi kezelések miatt elszívják az egészségügyi rendszer erőforrásait, így erősen kutatott területté téve az antimikrobiális rezisztenciát, különös tekintettel a hatékony terápiák, gyógyszerek kifejlesztését.^[14] Gyakori megoldás a kombinált terápia, mely során két vagy több különböző típusú antibiotikumot kombinálnak a szinergikus hatás elérése érdekében, valamint kísérletek folynak természetes és mesterséges eredetű hatóanyagok kombinált alkalmazására.^[15–17]

1.2. Baktériumok csoportosítása

Hans Christian Gram (1853–1938) dán kutató fedezte fel 1884-ben, hogy a baktériumokat két csoportra lehet osztani aszerint, hogy a Gram-festéssel lilára festhetők-e vagy sem.^[18] A Gram-pozitív baktériumok kékre/lilára színeződnek a Gram-festés során, míg a Gram-negatív baktériumok rózsaszín/piros színűvé válnak.^[19] Ezen különböző viselkedés oka a baktériumok eltérő sejtfal szerkezete (1. ábra).

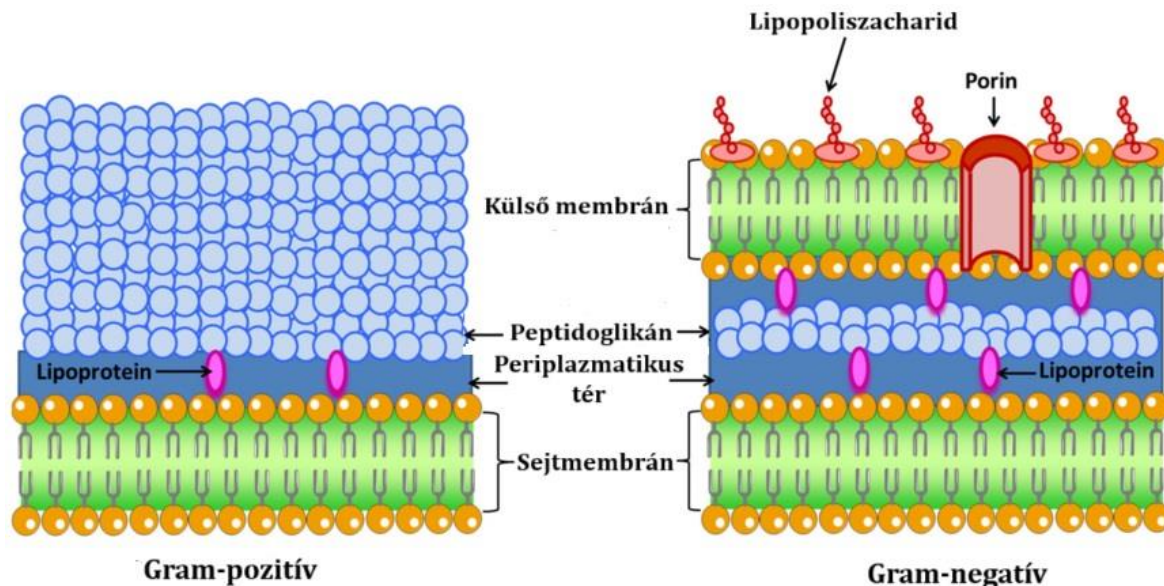
A Gram-negatív törzsek sejtfalának három fő rétege van kívülről befelé haladva: egy külső membrán, egy vékony peptidoglikán réteg és a citoplazmát határoló belső foszfolipid

membrán. A külső foszfolipid membrán védelmi határvonalként funkcionál, összetétele különbözik a belső membránétól, glikolipidekből épül fel és főként lipopoliszacharidot tartalmaz. A humán immunrendszer érzékeny a lipopoliszacharidokra, hiszen ez biztos indikátora a szervezetben jelen lévő fertőzésnek. Alapvetően a Gram-negatív baktériumok gyakrabban alakítanak ki rezisztenciát az antibiotikumokkal szemben, emiatt a plusz védelmi határréteg miatt. ^[18]

A peptidoglikán réteg az N-acetil-glükózamin-N-aktil-muraminsav diszacharid ismétlődő egységeiből áll, amelyeket a pentapeptid oldalláncok kötnek össze. Ez egy merev szerkezetet alkot, mely meghatározza a sejtek alakját. ^[18]

A citoplazmát határoló foszfolipid kettősrétegnek kettős szerepe van, nem csak határolja a prokarióta bakteriális sejteket, hanem a membránfehérjék elvégzik azokat a feladatokat, melyeket eukarióta sejtekben a sejtservecskék hajtanak végre. A belső membránon folyik az energiatermelés, a lipid-bioszintézis, a fehérjék szekréciója és a transzport. ^[18]

A lipoprotein kémiai összetételét tekintve olyan molekula, amely egy lipid (zsírmolekula) és egy fehérje összekapcsolódásával jön létre. A sejtmembránokban található lipoproteinek a membrán stabilitását biztosítják, valamint a peptidoglikán réteget kapcsolják össze a membrán rétegekkel. ^[18]



1. ábra: Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumok sejtfal szerkezete ^[20]

A Gram-pozitív törzseknél azonban a külső membrán hiányzik, csak egy vastagabb peptidoglikánréteg veszi körbe kívülről, mely nagyobb mechanikai védelmet biztosít. A baktériumsejt citoplazmáját itt is foszfolipid kettősréteg határolja, amely membrán stabilitását lipoproteinek segítenek fenntartani. ^[18]

A baktériumtörzsek sejtfalának lipidösszetétele törzsenként eltérő, az 1. táblázatban néhány jellegzetes baktérium sejtfalösszetételét tüntettük fel. A sejtmembránokban leggyakrabban előforduló foszfolipidek: foszfatidil-etanolamin (PE), foszfatidil-glicerin (PG), koleszterin (CL), foszfatidil-kolin (PC).

1. táblázat: Foszfolipid komponensek százalékos megoszlása az egyes baktériumtörzsek sejtfalában

Baktériumtörzs	PE	PG	CL	PC
E. coli	80	15	0	0
P. aeruginosa	60	21	11	0
S. aureus	0	58	42	0
Emlős májának plazmamembránja	23	18	1	39

1.3. Biofilm képződés

A biofilm különböző mikroorganizmusok együttélése és együttműködése egy adott felületen vagy a gazdatest szövetében. A biofilmek viselkedése rendkívül összetett, számos olyan tulajdonsággal rendelkeznek, mellyel a szabadon úszó baktérium sejtek nem. Képesek fenotípus tulajdonságaikon változtatni, a biofilm sejtjei kommunikálnak egymással különböző jelátvivő anyagok segítségével, valamint a környezeti változásokhoz adaptálódnak.^[9,21,22] Ezeket a speciális tulajdonságokat mind figyelembe kell venni a biofilm fertőzés megelőzési és kezelési stratégiák kidolgozásakor.

A biofilmek kialakulása több lépésből áll, így a különböző kezelési stratégiák is a fejlődés egyes lépéseibe próbálnak beavatkozni. A biofilm kialakulása egy kezdeti adhéziós lépéssel indul, ezt követi egy növekedési, majd egy diszperziós fázis. (2. ábra)

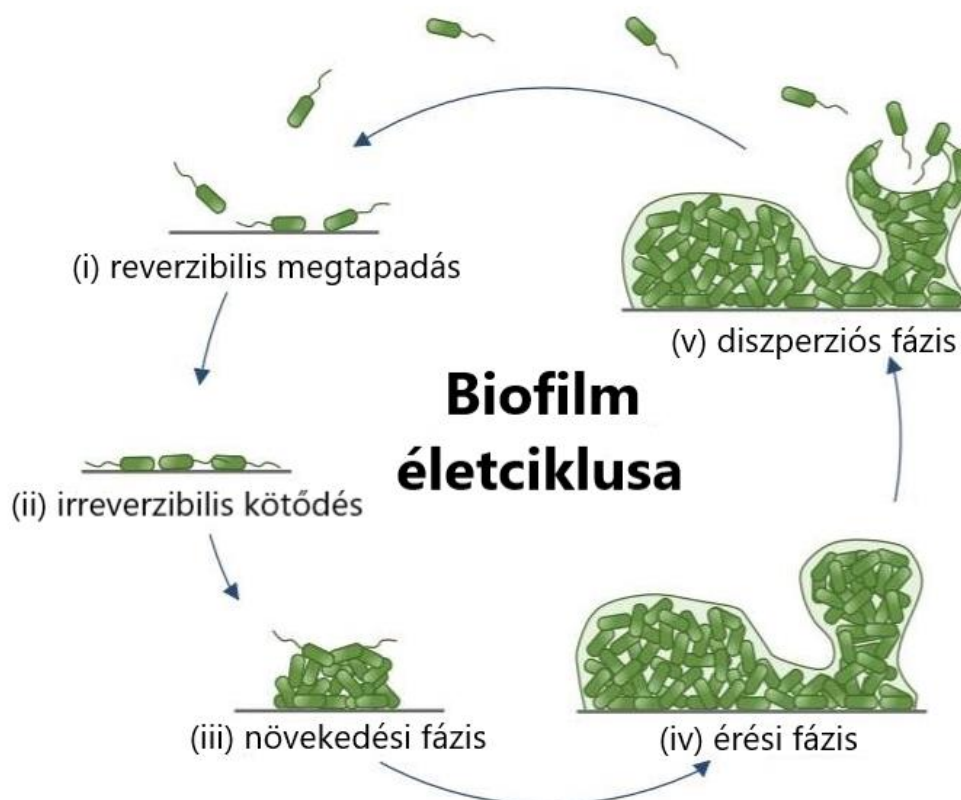
A biofilm kialakulásának első lépése a szabadon úszó sejtek kötődése valamilyen biotikus vagy abiotikus felülethez gyenge, reverzibilis, kölcsönhatásokkal (pl.: elektrosztatikus vonzás, hidrofób kölcsönhatás, van der Waals erők, hidrodinamikai erők).^[6] A kezdeti adhéziót követően a mikroorganizmusok stabilabb kapcsolatot alakítanak ki a felülettel specifikusabb molekuláris kölcsönhatások révén. Ezt az adhéziós fázist sok paraméter erőteljesen befolyásolja: többek között a lokális környezet, bakteriális tulajdonságok, a kötőfelület és az áramlási viszonyok.^[2,23,24]

A következő lépésben a biofilmet alkotó sejtek és a felület között irreverzibilis kötődés alakul ki. Az irreverzibilis kapcsolat kialakulása után a biofilm elérkezik a növekedési

szakaszba, mely során a sejtek elkezdik az extracelluláris polimer mátrix (EPS) termelését. Az EPS egy poliszacharidokat, lipideket, extracelluláris DNS-t és fehérjéket tartalmazó mátrix^[25], mely megvédi a biofilm sejtjeit a gazdaszervezet immunrendszerével és az antibiotikus kezelésekkel szemben, illetve nagyban befolyásolja a biofilm fenotípusát.

Ezek után a biofilm átlép az érési stádiumba és jelentős mennyiségű EPS-t termel, ezzel növelve tömegét és méretét, alkalmas környezetet biztosítva a baktériumsejteknek a tápanyagok megkötésére. Az EPS nemcsak kitölti a sejtek közötti teret, hanem szoros közelségben is tartja a sejteket egymáshoz, ezzel lehetőséget nyit a sejtek közötti kommunikációnak is.^[24,26–28] Az érés során a biofilm egyre rétegzettebbé válik, mikrokolóniák és víz csatornák alakulnak ki a mátrixban.

Az életciklus utolsó lépése a diszperziós fázis, ekkor a teljesen érett biofilm planktonikus sejteket vagy összetapadt mikrokolóniákat bocsájt ki a lokális környezetébe.^[29] Az így kikerült klaszterek migrációja tovább terjeszti a fertőzést a nyirok- és vérkeringés útján a gazdaszervezetben, melyek más felületeken is megtapadnak, ezzel tovább súlyosbítva a fertőzés lefolyását.^[30,31]



2. ábra: Biofilm életciklusa. Planktonikus sejt hozzátapad egy felszínhez (i), irreverzibilis kötődés kialakulása (ii), a növekedési fázis kezdetét veszi (iii), amit egy érési fázis követ (iv). A ciklus a diszperziós fázissal végződik, mely újabb planktonikus sejteket bocsájt a környezetbe.^[32]

1.4. Sejtek közötti kommunikáció a biofilmben

A biofilmet alkotó sejtek között lejátszódó kommunikációt az angol szakirodalom quorum sensingnek (QS) nevezi. A sejtek sűrűségét úgynevezett auto-inducer molekulák szabályozzák, ezáltal elkerülve a fenntarthatatlan populációs szintet.^[2,6] Amikor a jelátvivő molekulák mennyisége elér egy kritikus szintet (Quorum), a populáció tagjai ezt érzékelik (Sensing), viselkedésüket a populáció sűrűségének függvényében megváltoztatják.^[6]

A sejtfal felépítésén felül más különbségek is megfigyelhetők a két baktérium típus között: Gram-negatív baktériumokban főként acil-homoszerin-lakton (AHL) molekulák, míg Gram-pozitív baktériumok esetén a biofilm által termelt szerves kismolekulák töltik be a jelátvivő vegyületek szerepét QS során.^[6,23,24,26,33]

Ez a belső modulációs folyamat az oka annak, hogy a biofilmek a többsejtű szervezetekhez sorolhatók. A QS nemcsak segíti a biofilmet elérni és fenntartani ideális méretét, de szabályozza a virulens faktorok kibocsátását. Az információk terjesztése a bakteriális közösségben elősegíti a biofilm adaptálódását a változó környezeti viszonyokhoz, például: megváltozott áramlási viszonyokhoz vagy a korlátozott tápanyag hozzáféréshez.^[26,29]

A QS a populációsűrűség szabályozásán túl lehetővé teszi a baktériumtelep számára, hogy egy előnyös mutációt elterjesszen a kolóniában, mely antibiotikum rezisztencia kialakulásához vezethet. Az inhibítormolekulák számos QS útvonalat megzavarhatnak, akadályozhatnak, ezért jelentős szerepük van a biofilm fertőzések kezelésekor. Az már bizonyított, hogy bizonyos antagonista molekulák és QS-gátló vegyületek ígéretes jelöltek kiegészítő kezelésként.^[23] Christensen és munkatársai egy aminoglikozid típusú antibiotikum, a tobramicin hatását tanulmányozták kombinálva QS inhibitor molekulával, ez a szinergikus kezelés antibakteriális hatást mutatott az intraperitoneális idegentest fertőzéssel szemben az egerekben.^[34]

1.5. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa egy Gram-negatív baktérium, mely számos emberi fertőzésért és több ezer kórházi esetért felelős, csak Észak-Amerikában évi mintegy 180 000 megbetegedést okoz ez a baktérium törzs.^[35,36]

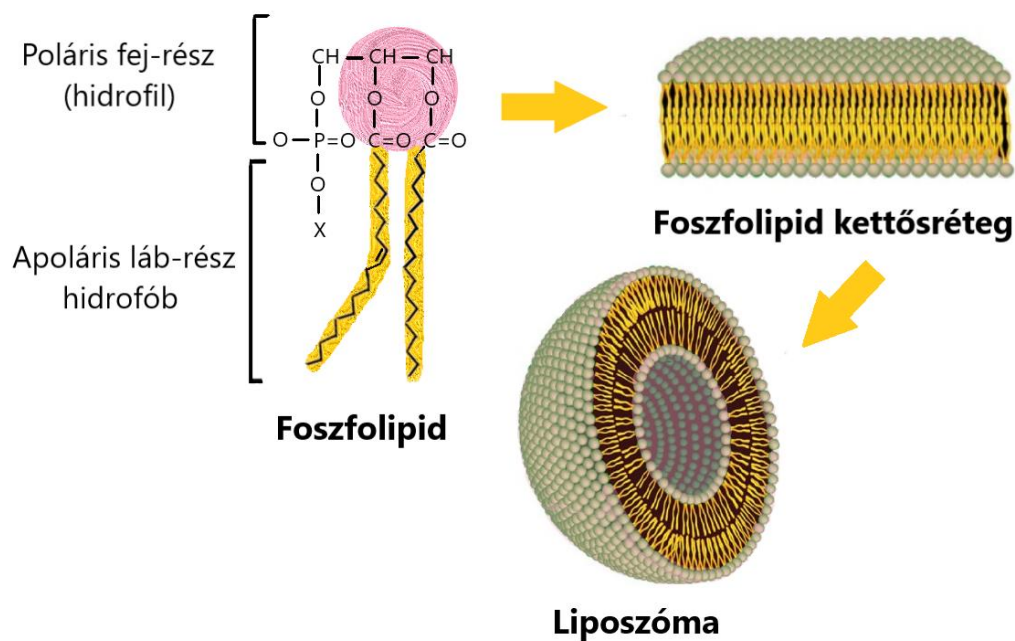
Cisztás fibrózisban szenvedő betegek esetén is igazolták a biofilm képződését, a baktériumot kitenyésztették a betegek köpeteiből. Minden kétséget kizáróan ez a baktérium a vezető halálozási ok a cisztás fibrózisban szenvedő betegek és az immunhiányos betegek esetében

is.^[26,37] A *Pseudomonas aeruginosa* előfordulása a noszokomiális fertőzések között 7,1-7,3%^[38], azonban az intenzív osztályokon ennél sokkal nagyobb ezen baktérium aránya. Vincent és munkatársai^[39] vizsgálatai kimutatták, hogy az intenzív osztályon a páciensek 16,2%-nak szervezetében jelen volt a baktérium, míg az intenzív osztályon szerzett fertőzések 23%-ért volt felelős ez a törzs. Egy közelmúltbeli tanulmány^[40] kimutatta, hogy a cukorbetegéken elvégzett évi 100 000 lábamputáció 80%-ért a *Pseudomonas aeruginosa* és a Gram-pozitív *Staphylococcus aureus* baktériumok által kiváltott fertőzések a felelősek.

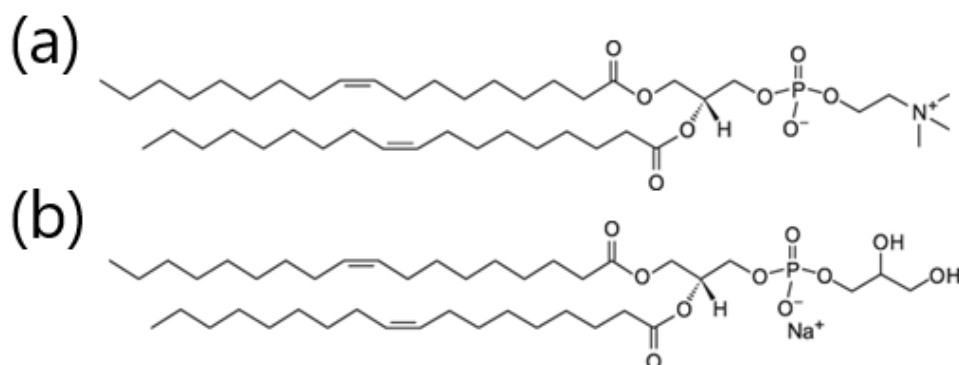
Mindezen kimutatások és trendek alapján a Fertőző Betegségekkel foglalkozó Amerikai Társaság (Infectious Diseases Society of America) 2020-ban kiadott kezelési útmutatóban kiemelt figyelmet fordít a nehezen kezelhető *Pseudomonas aeruginosa* fertőzés terápiájára.^[41]

1.6. Liposzómák, mint modellmembrán rendszerek

A természetes vezikula egy olyan sejtszervecske, mely a sejteken kívül és belül is előforduló lipid kettősréteggel körülhatárolt citoplazma vagy folyadék. A liposzómák olyan mesterségesen előállított nanostruktúrális egységek, melyek foszfolipid kettősrétegből épülnek fel. Megkülönböztetünk multilamellás és unilamellás liposzómákat aszerint, hogy egy vagy több foszfolipid kettősrétegből állnak. A liposzómát alkotó foszfolipidek amfipatikus molekulák, foszforsav és két tetszőleges zsírsav glicerinnel alkotott észterei.^[42] A lipidek vizes közegbe kerülve elsőként kettősrétegekbe önrendeződnek, melyben úgy helyezkednek el, hogy a poláris „fej-része” a molekuláknak -vagyis a foszforsav rész- kifelé áll, míg a hosszú apoláris szénláncú zsírsavak befelé fordulnak, egymással érintkezve. (3. ábra) Spontán önrendeződésre képesek, gömbbé záródnak össze.^[43] Ezeket a rendszereket napjainkban egyre inkább elterjedten alkalmazzák gyógyászati és biológiai területeken.^[42] Hatékony hatóanyag-hordozó rendszerek, ugyanis mind apoláris és mind poláris karakterű hatóanyagokat képesek célba juttatni, akár célzottan is, ezért a rákterápiás alkalmazások területén is intenzíven kutatják.^[44]



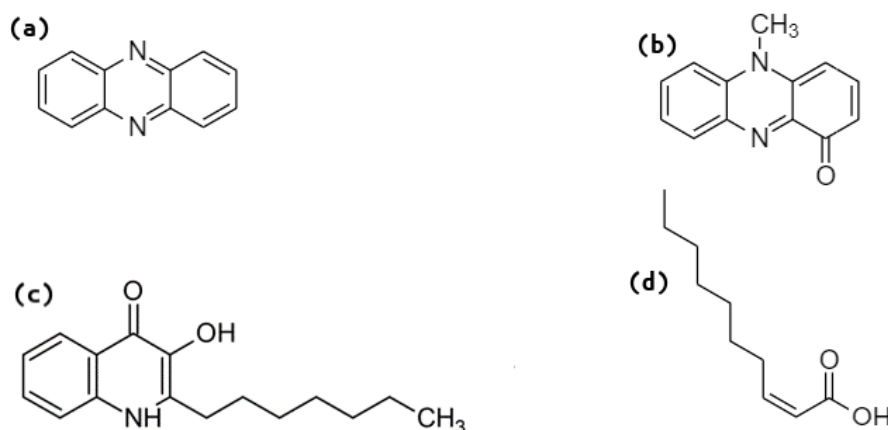
3. ábra: Liposzóma felépítése ^[45]



4. ábra: Dioleoil-foszfatidilkolin (DOPC, a), és b) Dioleoil-foszfatidilglicerol (DOPG, b) foszfolipidek szerkezete

1.7. Jelátvivő molekulák

A biofilmet alkotó sejtek QS útvonalakon keresztül kommunikálnak, amely exogén jelátvivő molekulák (5. ábra) szekréciójával valósul meg.



5. ábra: A kísérletekben használt autoindukáló molekulák kémiai szerkezete a) fenazin, b) pyocianin, c) pseudomonas kinolon és d) cis-2-decénsav. A molekulászerkezetek a ChemDraw szoftver segítségével lettek meg rajzolva.

1.7.1. Fenazin

A fenazिनok nitrogéntartalmú heterociklusos vegyületek, melyeket számos baktérium nemzetség (pl.: *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptomyces kebanksaanensis* (SUK12), *Streptomyces anulatus*) termel, az ilyen természetes eredetű fenazinszármazékok száma meghaladja a 150-et.^[46,47] Ezen vegyületek a redox-aktív pigmentek csoportjába tartoznak, széles spektrumú antibiotikus hatást mutatnak.^[47,48] A *Pseudomonas aeruginosa*-ban a fenazintermelést a QS folyamata váltja ki, termelődését a nagy sejtsűrűség, a környezeti jelek és a sejten belüli fiziológiai körülmény is befolyásolja. Fenazin-antibiotikumokat a tüdő társfertőzésének, a kialakult *Staphylococcus aureus* fertőzés kezelésére már alkalmazzák.

A fenazin (9,10-diazaantracén) alapszerkezetét az 5. ábra mutatja. A különböző baktériumfajok által termelt egyéb metabolikus vegyületek általában hidroxil- és/vagy karboxil-szubsztituált származékokat tartalmaznak,^[49] és feltételezhetően a biofilm képződéssel összefüggésbe hozhatók.^[48]

1.7.2. Piocianin

A piocianin (5-N-metil-1-hidroxifenazin, PYO)^[50] az egyik természetes eredetű fenazinszármazék (5. ábra), kék színű, a *Pseudomonas aeruginosa* által termelt, szintén redox-aktív vegyület. Biofilmen belüli szerepét tekintve befolyásolja a jelátvivő útvonalakat és a virulenciafaktorok expresszióját.^[37,50] A QS-en keresztül az N-(3-oxododekanoil)-L-homoszerin-lakton és az N-butil-1-homoszerin-lakton, összefoglaló nevükön acil-homoszerin-laktonok (AHL-ek) szabályozzák a PYO szintézisét, a virulenciafaktor gének

transzkripciójának aktiválásával.^[37] A PYO-t kimutatták cisztás fibrózisban szenvedő betegek köpetében (2. táblázat) és az emberi hámsejtekben is.^[37,51] Továbbá kimutatták, hogy antagonistá hatással van a gazdaszervezetre, főként a gyulladások kialakulását elősegítő folyamatokra és a szabad gyökök kibocsátására nézve, amelyek membránkárosodáshoz és sejthalálhoz vezetnek. Ezenkívül a *Pseudomonas aeruginosa* PYO-t expresszál, hogy elnyomja vagy elpusztítsa a környezetében lévő más baktériumokat, ezáltal kedvezőbben hozzájárva a tápanyagokhoz.^[52]

1.7.3. *Pseudomonas* kinolon

A *Pseudomonas* kinolon jelátvivő molekula (2-heptil-3-hidroxi-4(1H)-kinolon, PQS) egy hidroxikinolon-származék, a QS fő szabályozó molekulája (5. ábra), mivel nemcsak a PYO termelését befolyásolja, hanem a fenazin-1-karboxamid előállítását is.^[53–55] Megállapították, hogy a *Pseudomonas aeruginosa* törzsekben gátolja a két fő AHL-függő QS-jelátviteli útvonalat.^[56] A PQS molekula nagy affinitást mutat a vashoz, hozzá kötődve ioncsapdaként viselkedik a sejtmembránokban, ezáltal ionokat képes a baktériumsejtekbe szállítani.^[57] Ezenkívül hozzájárul a külső membrán vezikulák képződéséhez, ezekben a vezikulákban felhalmozódhat a termelt PQS. Fontos kiemelni, hogy a PQS funkciók általában együttműködő módon, kiemelkedő szerepet töltenek be a tápanyag-lekötésben és a biofilm közösség védelmében.^[57]

2. táblázat: PYO ÉS PQS molekulák koncentrációja *in vitro* és *in vivo* körülmények között.
CF: cisztás fibrózis, PA01: *Pseudomonas aeruginosa* törzs

QS molekula	Koncentráció	Hol?	Forrás
PYO	50-130 μM	CF-es betegek köpetében	[58–60]
	$\sim 210 \mu\text{M}$	Fülváladék fülgyulladásból	[61]
PQS	0,5-25 μM	PA01 baktériumtörzsekben	[53,62,63]

1.7.4. Decénsav

A decénsav, más néven kaprinsav egy 10 szénatomos, egyenes láncú telített zsírsav. Bár a zsírsavmolekulákat régóta használják szappanként, antimikrobiális hatásuk sokáig háttérbe szorult. A decénsav antimikrobiális hatását Nair és munkatársai^[64] vizsgálták részletesen, ahol fertőzött tejmintákat kezeltek. A telített és telítetlen zsírsavak a leggyakoribb

tőgygyulladás-kórokozók (pl. *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus aureus* és *Streptococcus uberis*) ellen is hatékonyak bizonyultak.

Ennek telítetlen formáját, a cisz-2-decénsavat (DEC) (5. ábra) a *Pseudomonas aeruginosa* termeli, melynek segítségével képes a környezetében más mikroorganizmus által előállított biofilmeket lebontani.^[65] Antibiotikumokkal (ciprofloxacín vagy ampicillín) kombinálva elősegíti a katétereken képződött biofilm lebontását, degradációját.^[66] Nanomoláris tartományban, jelzőmolekula jellegéből adódóan a biofilm növekedését nem gátolja, azonban magasabb koncentrációban ígéretes jelölt biofilmellenes terápiákhoz.^[67]

1.8. Gazdavédő peptidek

A gazdavédő peptidek (HDP), más néven antimikrobiális peptidek (AMP) kulcsszerepet játszanak minden élő szervezet veleszületett immunitásában. A HDP-k nagyon sokféle biológiai hatással rendelkeznek, elsősorban immunmoduláló hatásuk van, továbbá kifejthetnek biofilm-, vírus-, gomba- illetve rákellenes hatást is.^[68,69] Terminológiai szempontból a HDP kifejezést a rendkívül összetett biológiai hatású peptidekre használjuk, míg az AMP specifikusabb. AMP-nek minősülnek azok a peptidek, melyek antimikrobiális hatást fejtenek ki.

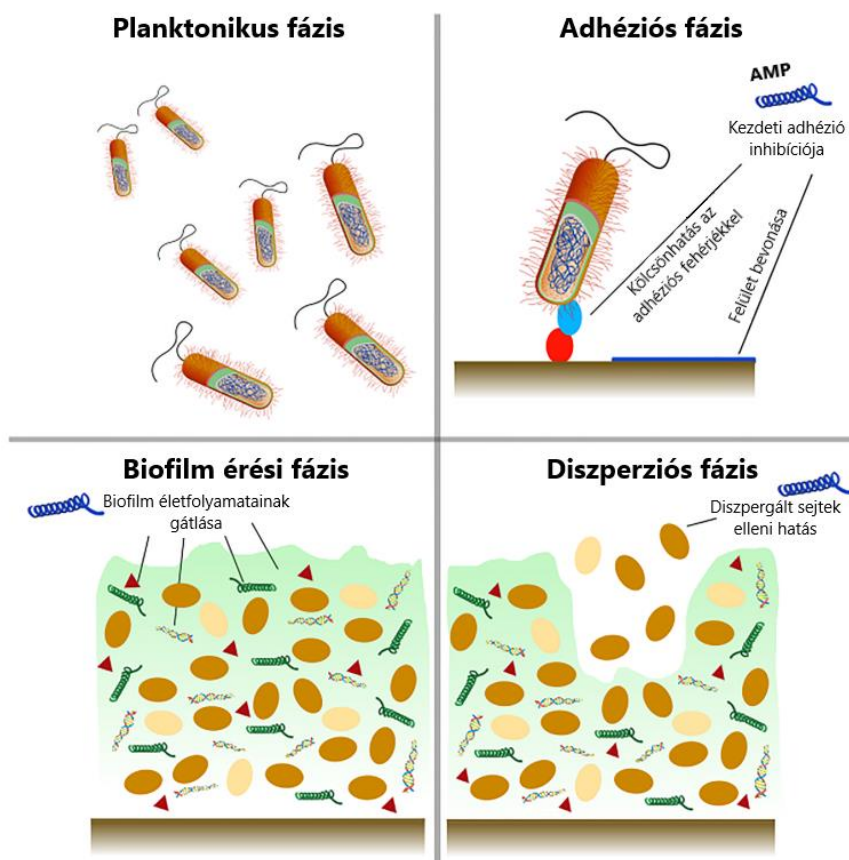
A HDP-k antimikrobiális hatása in vivo körülmények között drasztikusan lecsökken az in vitro kísérletekhez képest, azonban a gyulladással és sebgyógyulással kapcsolatos immunválaszokat jelentős mértékben befolyásolják.^[68,70] A HDP-k jellemzően 10-50 aminosavból felépülő, általában kationos peptidek, +2 és +9 közötti nettó töltéssel rendelkeznek.^[69,71] A peptid másodlagos szerkezete igen változatos, az α -helikális és/vagy β -lemezes szerkezeten kívül random szerkezet is megtalálható bennük, és gyakran óriási szerkezeti plaszticitással rendelkeznek, ezáltal könnyen váltanak konformációt rendezetlenből strukturált szerkezetűvé vagy fordítva.^[3,69]

Napjainkban a HDP-k egy intenzíven kutatott területté váltak, mivel fontos szerepet töltenek be mind az adaptív mind a veleszületett immunitásban. A veleszületett immunitás a születésünktől fogva velünk van, ez az elsődleges védelmi vonala a szervezetnek a kórokozókkal szemben. A nyálkahártya, bőrfelületek, véráram és szövetek hám- és fagocita sejtjei olyan kórokozó-felismerő receptorokkal rendelkeznek, melyek észlelik a jellemző mikrobiális molekulákat. Az immunsejtek aktiválódása különböző immunválaszokat indít el a szervezetben: a baktériumok számára kedvezőtlen környezetet teremtenek (például láz), vagy

specifikusabb reakciókat váltanak ki a kórokozóval szemben, mint például reaktív oxigén- vagy nitrogén-gyökök termelését.^[69,72]

A HDP-k bizonyos szekvencia részletei elősegíthetik vagy gátolhatják a biológiai aktivitást, mely a szekvenciát alkotó peptidektől és az azon belüli elhelyezkedésüktől függ.^[6,23,72] Mindezen immunmodulátor szerepük miatt a HDP-re kiemelt figyelem irányul, napjainkban több, mint 2600 HDP-t ismerünk. Ezek, az immunsejtek által termelt HDP-k nagyon változatos szekvenciával rendelkeznek, számos jelátvivő útvonalat befolyásolnak, köztük az immunitást, gyulladásos és génexpressziós folyamatokat.^[69,72]

A természetes kationos antimikrobiális peptidek bázikus karakterű (arginin vagy lizin) és ~50% hidrofób karakterű aminosavakat tartalmaznak. Amfipatikus jellegüknek köszönhetően több célpontot támadnak meg különböző mechanizmusokkal, ami a hagyományos antibiotikumokkal ellentétben kevésbé teszi őket hajlamossá a rezisztenciára. Jelenleg több mint 3100 olyan bejegyzés található az antimikrobiális peptid adatbázisban ([Antimicrobial Peptide Database \(unmc.edu\)](https://unmc.edu/antimicrobial-peptide-database/)), amelyek hatékonyak a rezisztens kórokozókkal szemben.^[73]



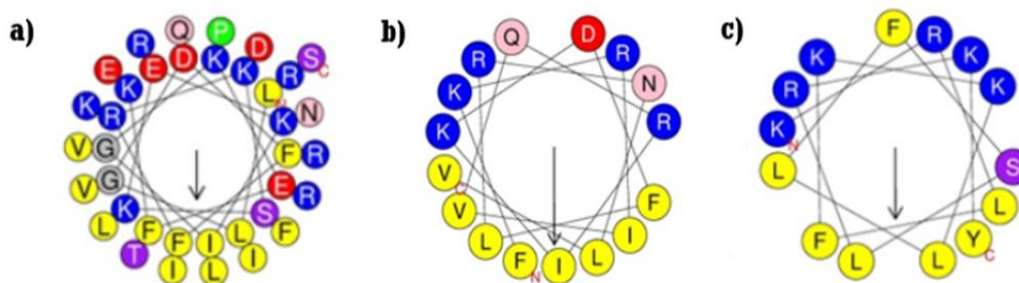
6. ábra: A "jó" biofilmellenes ágens különböző kölcsönhatási módjai: gátolja a baktériumok megtapadását a felülethez, beavatkozik az érett biofilm folyamataiba, gátolja a biofilm által kibocsátott aktív baktériumokat.^[2]

Az antimikrobiális peptidek ígéretes jelöltek a visszatérő fertőzések kezelésére, mivel képesek gátolni a biofilm növekedésének különböző szakaszait és/vagy kölcsönhatásba lépni ezek összetevőivel (6. ábra). Mivel a biofilm egy dinamikusan változó szerveződés, az antimikrobiális hatóanyagnak gyorsan kell kölcsönhatásba lépnie, mielőtt a célsejtek a közösség részévé válnak.^[23]

Egy másik lehetséges stratégia a biofilmben lévő lassan növekvő, vagy nem növekvő sejtek megcélzása. Az érett biofilmek rendkívül heterogén egységek, mind pH-juk, mind a tápanyagok, az oxigén és a hulladéktanyagok koncentrációja a biofilm belsejében változó, mivel az EPS-en keresztül lassú a diffúzió. E mikrokörnyezeti különbségek hatással vannak a kialakult biofilm fizikai-kémiai jellemzőire, ezáltal az antibiotikumok aktivitása csökkenhet a biofilmekkel szemben. Az aminoglikozidok például nem hatnak a mély biofilmrétegekre, ahol oxigénhiányos állapot van és a pH-szint alacsony.^[6,74]

A biofilm-populáció e térbeli heterogenitása miatt a sejtek nem egyforma sebességgel növekednek, ami hozzájárul a perziszter (nyugvó) sejtek számának növekedéséhez, mely kulcsszerepet játszik az antibiotikum-rezisztencia kialakulásában, mivel ezekre a sejtekre a hagyományos antibiotikumok nem hatásosak. Mindezeket összefoglalva egy ideális biofilm-ellenes hatóanyagnak a különböző növekedési ütemű sejteket kell megcélözni, beleértve a perziszter sejteket is.

A kvórumérzékelő molekulákkal való kölcsönhatások vizsgálatához öt membránaktív peptidet választottunk (1. táblázat, 5. ábra). Ezek közül a fő hangsúlyt a természetes eredetűkre helyeztük, mint például a humán katelicidin peptid (LL-37), és annak aktív fragmente, az FK-16. Vizsgáltuk továbbá a humán nyálhisztatinok egyik variánsát, a Dhvar4-et és két szintetikus peptidet, az IDR - 1018 és az 1037 peptidet is.



7. ábra: a) LL-37, b) FK-16, c) Dhvar4 peptidek aminosav szekvenciája (az ábra a HELIQUEST programmal készült)

1.8.1. LL-37

A humán katelicidin peptid, azaz az LL-37 (7. ábra) egy 37 aminosav hosszú gazdaszervezet-védő peptid, amelyet immunsejtek (pl. monociták, NK-sejtek, T-sejtek) és hámsejtek termelnek, de homeosztázisban ez az expresszió viszonylag alacsony. Az elmúlt évtizedekben az LL-37-et széles körben vizsgálták, mivel ígéretes tulajdonságokat mutat terápiás felhasználás szempontjából.^[75,76] Nemcsak a veleszületett immunválaszt modulálja, hanem bizonyítottan a biofilm növekedését is képes gátolni.^[76] Továbbá az LL-37 antibakteriális aktivitást mutat mind a Gram-negatív, mind a Gram-pozitív baktériumokra is (pl. *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* és *Listeria monocytogenes* nemzetségekre).^[75,76]

A közelmúltban bebizonyították, hogy az LL-37 képes gátolni a *Pseudomonas aeruginosa* biofilm növekedését és felgyorsítani a biofilmek felbomlását. Ridyard és munkatársai^[77] tanulmánya az LL-37 szerkezeti módosítására összpontosít oly módon, hogy egy optimalizált antimikrobiális hatóanyagot hozzon létre. Ez a vegyület nem csak antibakteriális aktivitást mutat, hanem immunmodulációs tulajdonságokat is, és gyulladásellenes folyamatokat egyaránt szabályoz a szervezetben.

A peptid elsődleges mechanizmusa a sejtmembránhoz való kapcsolódás, mivel a +6 nettó töltéssel rendelkező LL-37 elektrosztatikus kölcsönhatásba lép a biofilm negatív töltésű membránjával.^[77] A gátló hatás nemcsak a baktériumsejtek kötődésének akadályozásán keresztül érvényesül, hanem a sejtek mozgékonyágát is serkenti, ezáltal befolyásol két QS-útvonalat, valamint és a biofilm fejlődéséért felelős géneket is szupresszálja.

1.8.2. FK-16

Az FK-16 peptid az LL-37 aktív fragmense, egészen pontosan a szekvencia 17-32. aminosav szakasza, +5 nettó töltéssel (7. ábra). Szintézise olcsóbb a hosszabb LL-37-hez képest, és számos kórokozót képes elpusztítani, de nem okoz drasztikus immunológiai válaszreakciókat és szöveti toxicitást.^[78] Az antibiotikumokkal (pl. gentamicin, amikacin) való kombinációja befolyásolja az antimikrobiális aktivitását, pl. *Pseudomonas aeruginosa* törzsekben fiziológias körülmények között kétszer nagyobb baktericid aktivitást mutattak ki.^[79] Az ortopédiai és fogászati implantátumok gyakran titánból készülnek, azonban a biofilm kolonizációja ezeken az eszközökön is súlyos fertőzések kialakulásához vezethetnek. Mishra és munkatársai^[73] FK-16Cys bevonatú titánfóliák antibakteriális hatását vizsgálták, amelyről bebizonyították,

hogy a bevonat akadályozza a *Staphylococcus aureus* felületi adhézióját és gátolja más baktériumok növekedését.

1.8.3. Dhvar4

A Dhvar4 egy 12 aminosaból álló peptid (7. ábra), amelynek nettó töltése +6, és a humán nyál eredtű peptidből (hisztatin 5) származik.^[80,81] Erős antimikrobiális hatást mutat mind a Gram-pozitív, mind a Gram-negatív baktériumokkal szemben^[81], továbbá alacsony koncentrációban gombaölő hatásukat is kimutatták.^[82,83] Megfigyelték, hogy képes membránokon keresztül transzlokálódni, miközben membránkárosodást okoz.

3. táblázat. Peptidek tulajdonságai (szekvencia, hossz, töltés), mikroorganizmusok elleni aktivitásuk

Peptid	Aminosav szekvencia	Hossza	Nettó töltés	Hatása	Baktérium törzsek elleni inhibíciója	Referenciák
LL-37 (human)	LLGDFFRKSK EKIGKEFKRIV QRIKDFLRNL VPRTES-NH ₂	37	+6	antibiofilm, anticancer, antibacterial	<i>Pseudomonas. aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Listeria monocytogenes</i>	[75,76]
FK-16	FKRIVQRIKDFL RNLV-NH ₂	16	+4	antibacterial, antimicrobial, anticancer, antibiofilm	<i>Pseudomonas. aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> ,	[73,79,84]
Dhvar4	KRLFKKLLFSL RKY-NH ₂	14	+6	antifungal, antibacterial	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	[82,83]

2. Célkitűzés

Elsődleges célunk volt, hogy öt természetes és mesterséges eredetű peptid (LL-37, FK-16, IDR-1018, Dhvar4, 1037) és négy, a quorum-sensingben szerepet játszó jelátvivőmolekula (PYO, PHE, PQS, DEC) kölcsönhatását vizsgáljuk. A vizsgálatok során cirkuláris dikroizmus spektroszkópiával követtük nyomon a peptidek szerkezetének változását a QS molekula növekvő koncentrációban történő hozzáadásának hatására. Amennyiben a peptidek kölcsönhatásba lépnek a jelátvivő-molekulákkal, és megkötik őket, aggregátumokat képeznek velük az egy lehetséges mód a biofilmben fellépő QS gátlására, így könnyítve meg a biofilm-fertőzés kiirtását, valamint akadályozva az antibiotikum-rezisztencia kialakulását.

4. táblázat: Peptid- QS molekula kölcsönhatások. ++: peptid másodlagos szerkezetében bekövetkező változás, +: indukált CD jel megjelenése, -: nem detektálható kölcsönhatás.

	PYO	PHE	PQS	DEC
LL-37	++	++	++ (publikált eredmény)	++
FK-16	+	+	++	++
IDR-1018	-	+	++	-
1037	-	+	++	++
Dhvar4	++	+	+	++

A kapott eredményeket a 4. táblázat foglalja össze, melynek alapján választottuk ki azt a három peptidet és három QS molekulát, melyek erős kölcsönhatást mutattak. Ezeket a kombinációkat tovább vizsgáltuk, hogy jobban megértük a QS gátlás mechanizmusát. Rendszerünket kibővítettük baktériumok és emlősök sejtmembrán modelljével, így azt is tudtuk vizsgálni, hogy ez a peptid-QS komplex hogyan viselkedik, ha baktériummembrán is a közelében van, valamint, ha a rendszerben a peptid és a sejtmembrán is egyszerre van jelen, akkor a QS molekula melyikkel alakít ki erősebb kölcsönhatást.

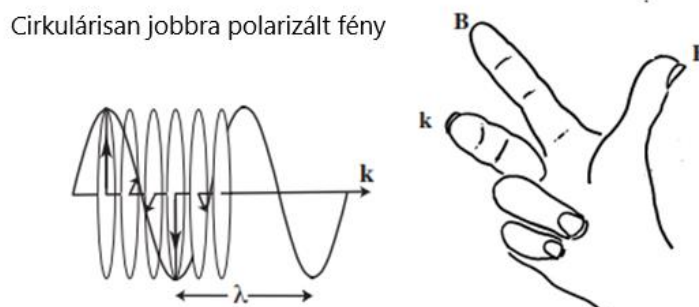
3. Vizsgálati módszerek

3.1. Cikrularis dikroizmus spektroszkópia

A cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópia széles körben használt technika a molekulák szerkezetének, valamint konformációs változásainak vizsgálatára. CD-spektrumok különböző, fényt áteresztő folyékony mintákban vehetőek fel. A technika nagy előnye, hogy makromolekulás oldatok esetében nincs felső mérethatár.^[85]

A fényt egy elektromágneses sugárzás, így rendelkezik egy elektromos (E) és mágneses (B) mezővel is, melyek a fény terjedési irányára (k), és egymásra merőlegesen oszcillálnak. Ez a három vektor a tér és az idő minden egyes pontján merőleges egymásra, ezt a 8. ábrán látható módon – a jobbkéz-szabállyal lehet egyszerűen vizualizálni. Cirkulárisan polarizált fény esetében az elektromos térvektor időben állandó nagyságú marad, de egy periodikus körkörös mozgást ír le, amely spirális fénysugarat hoz létre. A körkörös mozgás periódusideje akkora,

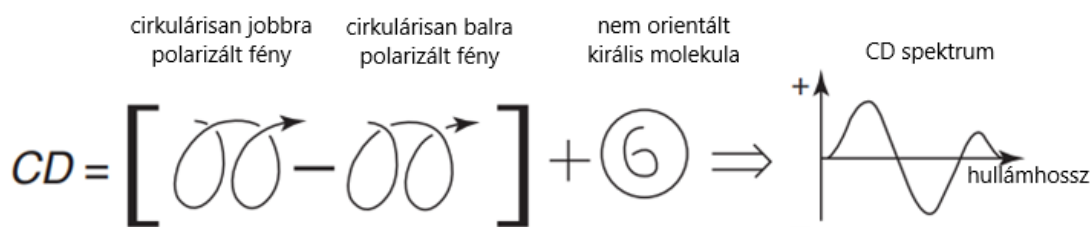
hogy a fény hullámhosszának megfelelő távolság megtétele alatt tesz meg egy teljes fordulatot.^[85]



8. ábra: Cirkulárisan polarizált fény és a három vektor iránya (E, B, k) jobbkez-szabály segítségével.^[85]

Miközben a cirkulárisan polarizált fény áthalad a mintán, a fény jobb- és balmenetes fotonjai kölcsönhatásba lépnek a minta optikailag aktív részével. A moláris extinkciós együtthatók a két sugárirányra eltérőek, ez sebességkülönbséget eredményez a különböző irányban polarizált fénysugarak között.^[86]

A CD-jelek a mintában a balra és jobbra cirkulárisan polarizált fény abszorbanáciájának különbsége a hullámhossz függvényében (9. ábra), ezért a nem nulla CD-jel előfeltétele az eltérő abszorbancia, vagyis a fentiek alapján csak a királis molekulák rendelkeznek CD-spektrummal. Ezzel a módszerrel a leggyakrabban vizsgált minták nagyobb méretű molekulák, valamint makromolekulák, például fehérjék, peptidek és a DNS. A távoli UV tartományba (180 – 260 nm) eső CD spektrumból információ nyerhető a fehérjék másodlagos szerkezetéről, és nyomon követhető a másodlagos kölcsönhatások vagy egyéb környezeti változások konformációra gyakorolt hatása.^[85] Míg a közeli UV tartományban (260 – 320 nm) az aromás oldalláncokról és a harmadlagos szerkezetről nyerhetünk információt.



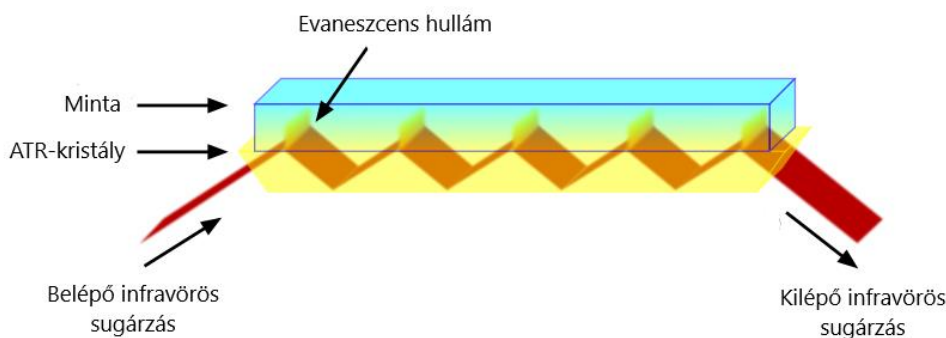
9. ábra: A CD-spektrum felvételének folyamata^[85]

3.2. Fourier-transzformációs infravörös spektroszkópia

Az infravörös (IR) spektroszkópia 2-25 μm hullámhossztartományba eső polikromatikus fénnel világítja meg a mintát, melynek energiája elegendő a molekulák rezgési és forgási átmeneteinek a gerjesztésére. A kapott IR spektrumot mennyiségi és minőségi analízisre is lehet használni. A funkciós csoportokra jellemző sávok egyszerűbb molekuláknál lehetővé teszik a teljes szerkezet meghatározását, míg bonyolultabb szerkezeteknél részinformációk nyerhetők, szerkezeti változások követhetők nyomon az IR spektroszkópia segítségével. Az IR mérésekhez polikromatikus fényforrást használnak, mely az interferométeren áthaladva jut a mintára. Az interferométerben a fénysugár egy 50%-osan áteresztő fényosztó tükörrre jut, mely a fénysugár felét egy állótükörrre, felét pedig egy mozgó tükörrre irányítja. Végül a fényosztón újból egyesül a 2 fénysugár, azonban az úthosszkülönbségük miatt interferálnak, ez a sugár halad át a mintán, majd jut a detektorba. A kapott interferogram, egy idő-intenzitás függvény, ebből Fourier-transzformációval (FT) kapjuk meg a hullámszám-intenzitás spektrumot.

Az ATR-FT-IR gyakori mintázási technikája nem igényel különösebb mintaelőkészítést, ennek során a mérendő oldatot egy úgynevezett ATR kristályra cseppentik, majd az oldószer elpárolgása után veszik fel a spektrumát. Az ATR rövidítés az angol Attenuated Total Reflection kifejezésből ered, mely a csillapított teljes visszaverődés jelensége. Vagyis, a 10.-ábrán látható módon az ATR feltét hullámvezetőként működik, a fénysugár többször találkozik a kristályon lévő mintával.

Az ATR kristály-minta határfelületen történő visszaverődés során evanescens hullám keletkezik a határfelületen, mely néhány tíz μm -es mélységig a mintába hatol, majd a visszaverődési ponttól távolodva exponenciálisan lecsökken. Ezekben a csomópontokban evanescens hullám keletkezik, ahol a minta összetételétől függően az IR-sugár bizonyos részei elnyelődnek. A továbbhaladó fénysugárból hiányoznak az elnyelt részek, ez enyhén csillapított teljes visszaverődéshez vezet.^[87]



10. ábra: Az ATR kristályon történő csillapított teljes reflexió jelensége^[88]

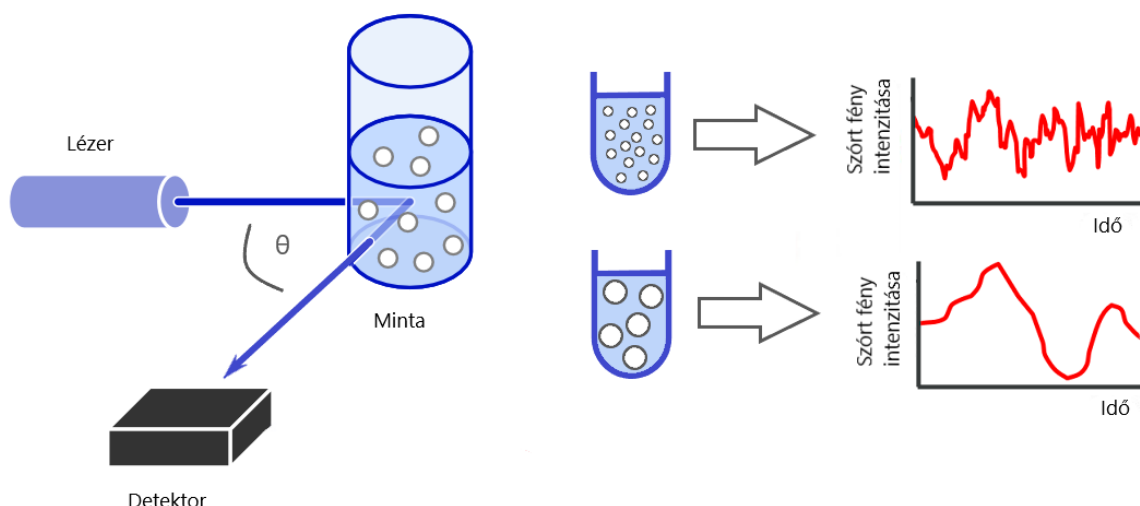
3.3. Dinamikus fényszórás

A dinamikus fényszórás (DLS) a szuszpenziók és makromolekulás oldatok részecskéinek méreteloszlását vizsgáló biofizikai módszer, amely a diszpergált részecskék Brown-mozgásán alapul. Az ütközések során átadott energia nagysága állandó, ezért az ütközések a kisebb méretű részecskékre nagyobb hatással vannak, nagyobb sebességgel fognak mozogni, mint a nagyobb méretű részecskék. A részecskék hidrodinamikai sugara a Stokes-Einstein-egyenlet alapján számítható ki, figyelembe véve a részecskék sebességét (a translációs diffúziós együttható) és a diszpergálószer paramétereit. ^[89,90]

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_H}$$

1. egyenlet: Stokes-Einstein egyenlet D: Transzlációs diffúziós koefficiens [m^2/s]; k_B : Boltzmann állandó [$\text{m}^2\text{kg/Ks}^2$]; T : Hőmérséklet [K]; η : Viskozitás [Pas]; R_H : Hidrodinamikai sugár [m]

A DLS készülék egy lézerből áll, mely megvilágítja a küvettában lévő mintát, a detektor pedig 90 °-os szöget zár be a fényforrással, hogy a minta által szórt fotonokat detektálja (11. ábra). A kapott szórt fény - idő diagram intenzitása az időben fluktuál, a gyors változás a kis méretű részecskékre, míg a lassabb fluktuáció a lomhán mozgó, nagy átmérőjű részecskékre jellemző. A korrelációs függvény a szórt fény intenzitás-idő függvényéből állítható elő oly módon, hogy egy késleltetési idővel eltolt párjával hasonlítják össze az eredeti intenzitás adatokat. A függvény kezdetben állandó, majd exponenciálisan csökken, amikor a részecske helyet változtat. Minél meredekebb lefutású a görbe, annál gyorsabban változik a részecske helye, tehát annál kisebbek a diszpergált részecskék. A korrelációs függvényből lehet a translációs diffúziós együtthatót meghatározni, amiből a Stokes-Einstein-egyenlettel a részecskeméret kiszámítható. ^[89]



11. ábra: DLS készülék felépítése és a mérés elve

Ezen kívül a DLS mérésből részecskeméret eloszlás és polidiszperzitási index (PDI) is kinyerhető. A PDI a részecskék méretének szórását és eloszlását kvantifikálja. Az alacsony PDI esetén a részecskék mérete egységes, (0,1 körüli vagy alatti érték) tehát homogén, monodiszperz rendszert jelez, míg a magasabb értékek (0,7 felett) széles méreteloszlásra, polidiszperz rendszerre jellemzőek. ^[89,90] Az intenzitás szerinti részecskeméret eloszlás a részecskék által szórt fény mennyiségén alapul, és inkább a nagyobb részecskéket emeli ki, így jól használható aggregátumok detektálására. ^[90]

A DLS különösen népszerű módszer a makromolekulák hidrodinamikai viselkedésének meghatározásában, mivel információt ad mind a részecskék méretről és eloszlásáról, mind a vizsgált minta homogenitásáról, esetlegesen bekövetkező aggregációjáról.

3.4. Transzmissziós elektronmikroszkópia

A transzmissziós elektronmikroszkópia (TEM) egy olyan képalkotó eljárás, mely elektronnyalábot bocsájt a mintára, majd a transzmittált elektronokat egy fluoreszcens detektor detektálja, végül egy számítógépes képalkotó rendszer segítségével az emberi szem számára láthatóvá teszi a képet, így digitális kamerával felvételek készíthetők a mintáról. Az elektronsugarat egy elektronágyú biztosítja, ami egy nagy feszültségű gyorsítótéren halad át, majd a minta előtt kondenzátorlencsék fókuszálják, utána objektív és projektív lencséken keresztül jut a detektorra. A minta extrém vékony, így az elektronnyaláb képes áthaladni rajta. A TEM-et számos anyagtudományi vizsgálatra alkalmazzák, főként kirtálszerkezetek, fémek, félvezetők felderítésére. Biológiai minták is vizsgálhatóak vele, azonban ehhez a

minták előkészítése során azok megfestése szükséges (leggyakoribb az uranil-acetáttal történő festési eljárás), amely segít a finom részletek és sejtszerkezetek megjelenítésében.^[91]

Mivel az elektronnyaláb hullámhossza nagyon kicsi, ezért nagyon kis méretű részecskék vizsgálhatóak vele, míg a fénymikroszkóp felbontóképességének határa 0,2 μm , addig TEM esetén 0,1-0,2 nm közötti felbontás érhető el. Az elektronmikroszkóp által alkotott képen a kontraszt nagy mértékben függ a minta vastagságától és anyagi összetételétől. Vastagabb területeken az elektronok nagyobb mértékben szóródnak, ezért kevesebb elektron jut a detektorra, sötétebb képet eredményezve.^[91]

4. Felhasznált anyagok

4.1. Anyagok

A kísérletekhez használt peptidek a bizonyított biofilm ellenes hatásuk alapján lettek kiválasztva. Az alábbi természetes és mesterséges eredetű peptideket LL-37, FK-16, Dhvar4, IDR-1018 és 1037 használtuk. A kísérletekhez piocianint (PYO), decénsavat (DEC), pseudomonas quinolone signal (PQS) és fenazin (PHE) jelátvivő molekulákat alkalmaztam. A liposzómákat DOPC és DOPG lipidekből készítettem, melyek az Avanti Polar Lipids-től (Merck, Magyarország) lettek beszerezve.

A peptideket a NovoPro Bioscience Inc. (Sanghai, Kína) szintetizálta. Molekulatömegük (M) tömegspektroszkópiával volt meghatározva, a peptid tisztasága $\geq 95\%$ -nak felelt meg (5. táblázat). Peptid törzsoldatkészítéshez liofilizált port oldottam ultranagy tisztaságú vízben, majd az 1mM töménységű törzsoldatot 100 μl -es részletekben tároltam a fagyasztoóban, -18°C -on.

5. táblázat: alkalmazott peptidek moláris tömege, tisztasága, nettó peptid tartalma

Peptid:	Moláris tömeg [g/mol]	Tisztaság	Nettó peptid tartalom
LL-37	4492,28	>95%	72,12%
FK-16	2044,4	95.071%	72.04%
Dhvar4	1839,3	>95%	50,5%
IDR-1018	1536,9	95,705%	70,93%
1037	1229,5	95,809%	60,28%

Valamennyi jelátvivő kis molekula piocianin (M = 210,23 g/mol), decénsav (M = 170,25 g/mol), PQS (M=259,34 g/mol), fenazin (M = 180,21 g/mol) a Merck-től lett beszerezve.

Ezeket a jelátvivő molekulákat spektroszkópai tisztaságú etanolban oldottam fel 8 mM koncentrációjú törzsoldatot készítve. A törzsoldatokat 4 °C-on tároltam, kivéve a piocianint, amelyet -18 °C-on és sötét üvegben tároltam. A piocianin esetében néhány nap után aggregátumképződést tapasztaltam, ezért a koncentrációcsökkenés elkerülése érdekében minden mérést frissen készített törzsoldatból végeztem. Az összes többi felhasznált vegyszer analitikai tisztaságú volt.

4.2. Vizsgálati körülmények

A mérések során Tris-HCl (10 mM, pH 7,4) és PBS (10 mM pH 7,4) pufferoldatot használtam a fiziológiás körülmények biztosítására. A DLS mérésekhez és CD spektroszkópia során 40 és 80 μ M koncentrációjú peptid oldatot, infravörös spektroszkópiához 80 μ M koncentrációjú peptid oldatot használtam. A liposzóma 635 μ M koncentrációban volt jelen.

5. Kísérletek menete

5.1. Cirkuláris dikrizmus (CD) spektroszkópia

A CD-spektrumok JASCO J-1500 spektropolariméterrel szobahőmérsékleten lettek mérve, Tris-HCl, illetve PBS pufferoldatokban. A spektrumokat folyamatos pásztázó üzemmódban vettük fel 190 és 420 nm között 50 nm/perc sebességgel, 2 nm sávszélességgel, 2-szeres ismétléssel, 1 mm-es úthosszúságú, cirkuláris kvarcküvetát használva. A PQS-titrálások CD-spektrumát 190 és 500 nm között vettem fel. A decénsav esetében, a spektrumokat 190 és 270 nm között rögzítettem, ugyanazokkal a paraméterekkel. A CD-titrálási kísérletekhez 280 μ l, 40 μ M koncentrációjú peptidoldatot pipettáztam a küvetába. A CD-szkennelések befejezése után az adott jelzőmolekula törzsoldatának részleteit pipettáztam a küvetába, és minden egyes koncentrációhoz CD-spektrumokat mértem. Az adatokat 20, 40, 80, 160, 200, 300, 400 μ M QS molekula esetén gyűjtöttem.

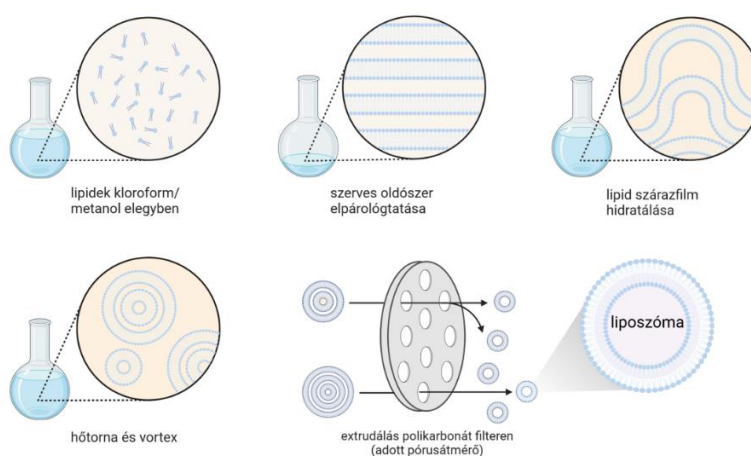
A három-komponensű rendszerek esetében magasabb peptidkoncentrációt alkalmaztam, 80 μ M-os peptidoldatok CD spektrumának felvétele után adtam hozzá a másik két komponens oldatát. A QS-molekula törzsoldatából annyit, hogy a koncentrációja 80 μ M legyen, a liposzóma törzsoldatából pedig 635 μ M legyen a végső koncentráció. A kísérleteket mindkét összekeverési sorrendben elvégeztem, egyszer először a QS-molekulát adtam hozzá a peptidoldathoz, majd a pipettával való homogenizálás után felvettem a CD spektrumát, ezután kevertem hozzá a liposzómát, amiről szintén CD spektrumot készítettem. Mindezt megcsináltam fordított sorrendben is, előbb a liposzómát majd utána a QS molekulát

hozzáadva a rendszerhez. A háromkomponensű rendszerek CD spektrumait decénsav esetén 190-270 nm között, PQS és PYO esetében 190-500 nm tartományban vettük fel.

Minden CD-mérést a reprodukálhatóság ellenőrzése érdekében kétszer ismételttem. A spektrumokat korrigáltam a megfelelő pufferoldat háttérének levonásával, és simítottam. Bár a méréseket 420 nm-től végeztem, azokban az esetekben, amikor 270 nm felett nem észleltünk kölcsönhatást vagy indukált CD jelet, a jobb szemléltetés érdekében a spektrumokat csak 190 és 270 nm között ábrázoltuk.

5.2. Liposzómák előállítása

A liposzómák előállításához 8:2 molarányban a DOPC és DOPG lipideket mértem ki, majd egy gömblombikban feloldottam kloroform/metanol 2:1 térfogatarányú keverékében. Ezt követően 10 perc szonikálás után a desztillációs vákuumbepárló készülékkel szárazra pároltam az oldatot, majd egy éjszakára nyomás alatt, szárítószekrényben helyeztük, hogy az oldószermaradványok is eltávozzanak. A lombik alján keletkező szárazfilmet pufferoldattal hidratáltam, 12,7 mM töménységű oldatot készítve, melyet hőtornának vetettem alá. Ennek során az oldatot 40°C-os vízfürdőbe tettem kb. 5 percre, majd 30 másodpercre a -16 °C-os fagyasztószekrénybe helyeztem, ezt a folyamatot tízszer megismételttem. Minden melegítési lépés után 1 percig vortex-el kevertettem az elegyet, segítve a lipidek homogenizálását. A hőtornát követően kezdetben 200, majd 100 nm pórusátmérőjű szűrőn extrudáltam az oldatot legalább tízszer, hogy a kialakult multilamellás vezikulák unilamellás, 100 nm átmérőjű liposzómákká alakuljanak. A liposzómakészítés főbb lépéseit a 12. ábra jelzi. A kész liposzomás oldat méretét DLS méréssel ellenőriztem.



12. ábra: Liposzómakészítés sematikus rajza (az ábra a BioRender programmal készült)

5.3. Infravörös spektroszkópia (IR)

Az ATR-FTIR méréseket egy Varian 2000 FTR Scimitar Series típusú spektrométerrel (Varian Inc., USA) végeztük, amely folyékony nitrogénnel hűtött higany-kadmium-tellurid (MCT) detektorral és egy "Golden Gate" reflexiós gyémánt ATR feltétellel (Specac Ltd., Orpington, UK) volt felszerelve. A gyémánt ATR felületre 3 μ l mintát cseppentve, a pufferoldat lassú elpárolgása után (kb. 20 perc alatt) szobahőmérsékleten vettük fel a spektrumokat. A spektrumokat 2 cm^{-1} névleges felbontással és 64 ismétléssel rögzítettük. A kapott spektrumok elemzését az Origin szoftvercsomaggal (OriginLab, Northampton, MA, USA) végeztük.

5.4. Dinamikus fényszórás (DLS)

Dinamikus fényszórás mérése során a mintákat egy W130i dinamikus fényszóró készülék (DLS, Avid Nano, Ltd., High Wycombe, UK) segítségével mértem. A készülék 660 nm hullámhosszú diódalézerrel és egy fotodióda detektorral rendelkezik, a mintákat kis térfogatú, eldobható, 1 cm-es úthosszúságú küvetákban (UVette, Eppendorf, Bécs, Ausztria, GmbH) helyeztük a gépbe. A korrelációs függvényeket 10 másodpercig mértem, 10 ismétléssel, majd a mellékelt iSize 3.0 szoftverrel elemeztem. A kapott spektrumok ábrázolását az Origin szoftvercsomaggal (OriginLab, Northampton, MA, USA) készítettem el.

5.5. Transzmissziós elektronmikroszkópia (TEM)

A TEM-felvételeket Morgagni 268D műszerrel (FEI, Hollandia) készítettük. 80 μ M peptidkoncentrációjú és 80 μ M PQS-t tartalmazó PBS pufferben elkészített oldatokat vizsgáltunk. Továbbá peptidet nem tartalmazó, 200 μ M koncentrációjú PQS oldatról készítettünk felvételeket. A képek 5600x és 36000x nagyítás között készültek.

Részletesen, a PBS-ben előkészített minta egy cseppjét (2 μ l) egy 200 szemű rézrácsra pipettáztuk, amely formvarból készült hordozófilmmel volt bevonva. A felesleges folyadékot 20 s érintkezési idő után eltávolítottuk, ezt követően a kontrasztanyagként használt uranil-acetátot azonnal hozzáadtuk. 1 perc érintkezési időt követően a felesleges folyadékot ismét eltávolítottuk, majd a mintát levegőn száradni hagytuk.

6. Eredmények és értékelésük

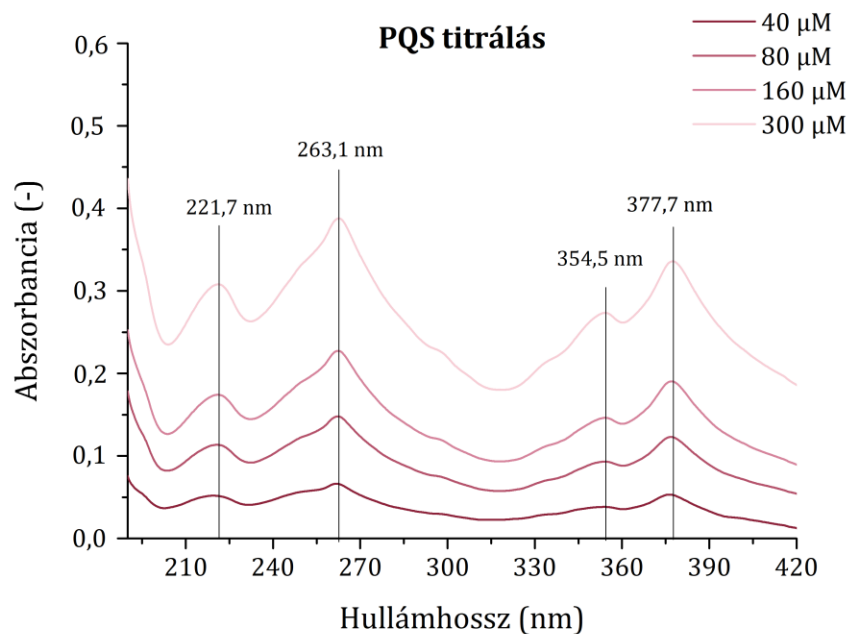
A kutatócsoport korábbi tanulmánya kimutatta, hogy a *Pseudomonas* kinolon molekula LL-37 peptid jelentlétében királis szupramolekuláris aggregátumokat képez, melyben feltételezhetően a gazdaszervezet védő peptid quorum quenchingre gyakorolt hatása játszik szerepet.^[3]

TDK dolgozatomban három, az elővizsgálataink alapján a jelátvivő molekulákkal (*pseudomonas* kinolon, decénsav, piocianin) erős kölcsönhatást mutató peptidet (LL-37, FK-16, Dhvar4) vizsgáltam CD-vel, DLS-el és IR-rel. Vizsgálataink során DOPC/DOPG liposzómát is adtunk a rendszerhez. Ezáltal lehetőségünk nyílt a peptid, valamint peptid-QS molekula aggregátumok kölcsönhatását megfigyelni sejtmembrán modellekkel is.

6.1. *Pseudomonas* kinolon kölcsönhatása antimikrobiális peptidekkel

A PQS jelátvivő molekula mind Tris-HCl, mind PBS pufferoldatban felvett abszorpciós spektrumát (13. ábra) több csúcs jellemzi. TRIS pufferben a legintenzívebb csúcs 263 nm-nél található, 221 nm-nél van egy váll, 300nm felett megjelenik egy széles sáv, amelynek két maximuma 354 és 377 nm-nél található. A PBS pufferben változik a spektrum lefutása, a csúcsok kismértékben eltolódnak, és egy váll jelenik meg a 219 és 260 nm-es csúcsok között (Függelék, 1. ábra). A PQS szerkezete alapján a csúcsok a kinolongyűrű π -elektroinjainak gerjesztéséből származnak. Mindkét pufferoldatban a PQS-koncentráció növelésével valamennyi csúcs intenzitása nő, míg az alapvonal eltolódik a nullától, ami aggregátumok kialakulására utal (13. ábra). A PQS-aggregátumokat elsősorban az aromás gyűrűk π -elektronjainak kölcsönhatása stabilizálja, ami delokalizált gerjesztett állapotokat eredményez az összes kromofór csoport között, ezt a jelenséget exciton csatolásnak nevezzük.

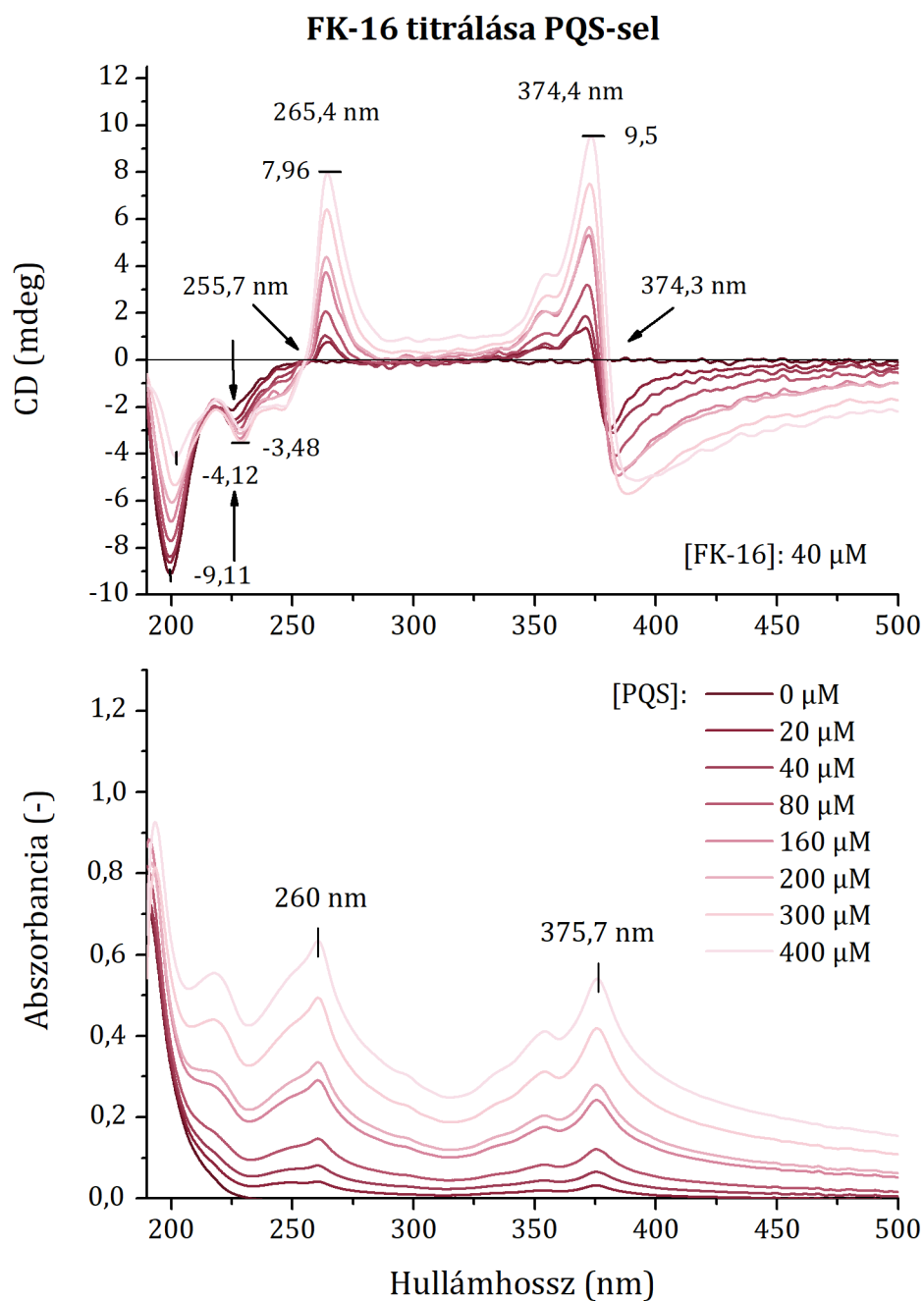
A PQS CD-spektrumai a molekula akirális jellege miatt azonosak a pufferoldat spektrumokkal (Függelék, 1. ábra). A kiválasztott antimikrobiális peptidek hozzáadása azonban több csúcs megjelenését indukálja. Az FK-16 peptid önmagában, PQS nélkül egy negatív jelet mutat ~ 200 nm-en, amely a π - π^* átmenethez rendelhető, és egy nagyon gyenge, széles vállat ~ 225 nm-en, amely az n - π^* átmenetnek felel meg (14. ábra). A Dhvar4 távoli UV-görbéje egy negatív csúcsot mutat ~ 197 nm-en (15. ábra), ami a peptidlánc rendezetlen állapotára utal.



13. ábra: PQS abszorbancia spektruma TRIS-HCl pufferben

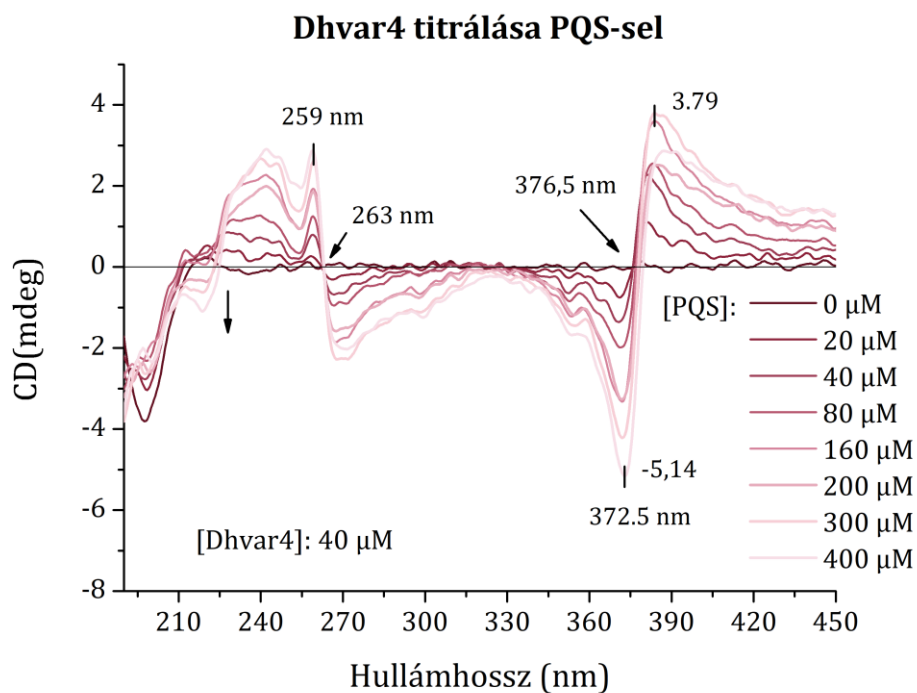
A PQS fokozatosan növekvő koncentrációban FK-16 peptidhez történő hozzáadására indukált CD jelek jelentek meg ~ 265 és 375 nm-en (14. ábra). Indukált spektrum akkor jelentkezik, amikor egy királis és egy akirális molekula lép kölcsönhatásba egymással. Érdekes módon a két megjelenőcsúcs nagy intenzitású indukált jelet adott a PQS abszorpciós maximumai környékén, lefutásuk ellentétes irányú. A 354 nm-es váll egybeesik a monomer PQS molekulák abszorpciójával.^[3] Továbbá a fő negatív csúcs enyhén jobbra tolódik (1-3 nm-rel) és intenzitása fokozatosan csökken a PQS hozzáadásával, ami aggregátumok kialakulására utal. Ezen királis szupramolekuláris aggregátumok kialakulását feltehetően befolyásolja a peptid szerkezete. A PQS előidézheti a peptid szerkezetének részleges helikálissá alakulását, amely tulajdonságát korábban más kis molekulák, többek között élelmiszerfestékek, gyógyszerek és endogén metabolitok esetében is kimutatták.^[92]

Az FK-16 spektrum lefutása hasonlít a Zsila tanulmányában^[3] vizsgált LL-37 peptid PQS-sel történő titrálásakor kapott spektrumképehez, ahol az indukált jeleket a PQS molekula J-dimerjeinek tulajdonítják (16. ábra), melyek kölcsönhatnak az LL-37 peptidláncával.

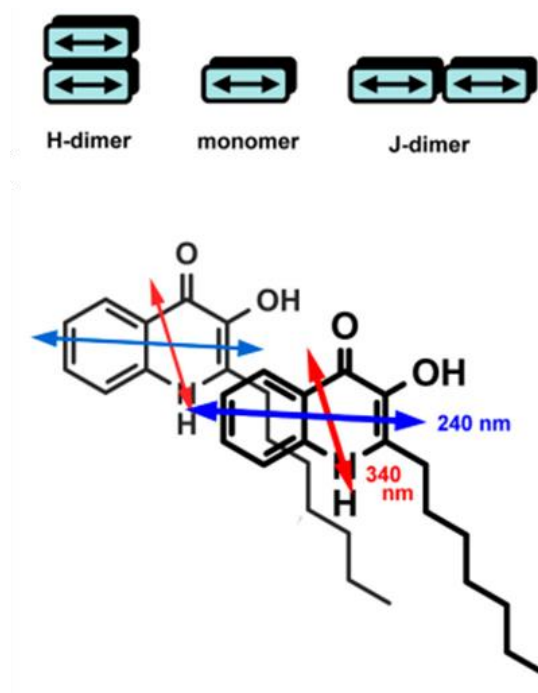


14. ábra: CD és abszorbancia spektrum az FK-16 peptid PQS-sel történő titrálásáról

A PQS hatása a Dhvar4 peptid szerkezetére hasonló titrálási görbéket eredményezett (15. ábra), a negatív csúcs intenzitása kissé csökkent, és enyhén jobbra tolódott, míg a váll hangsúlyosabbá alakult. Az itt megjelenő indukált CD-jelek az FK-16 - PQS rendszerhez képest ellentétes irányúak, tehát a kialakult aggregátum ellenkező kiralitású. Ez összhangban van a ~ 265 és 375 nm-en detektált különböző intermolekuláris aggregátumok kialakulásával.



15. ábra: Dhvar4 PQS-sel történő titrálásának CD spektruma

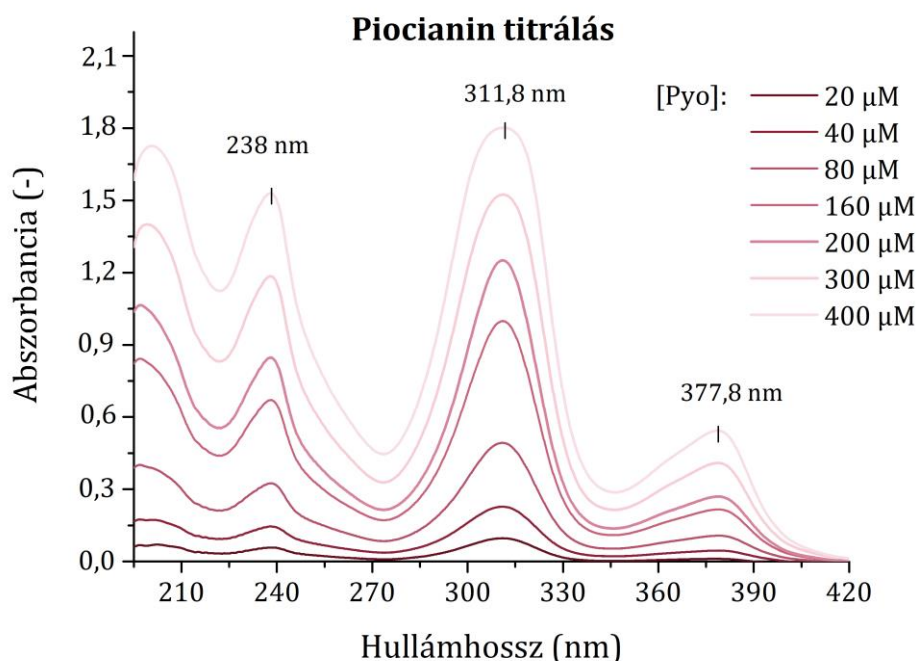


16. ábra: PQS lehetséges dimer aggregátumai^[3]

A dinamikus fényszórás adatai nagyobb méretű részecskék jelenlétét mutatták a vizsgált minták esetében, ami az aggregátumképződés különböző szintjeire utal (Függelék 3. ábra).

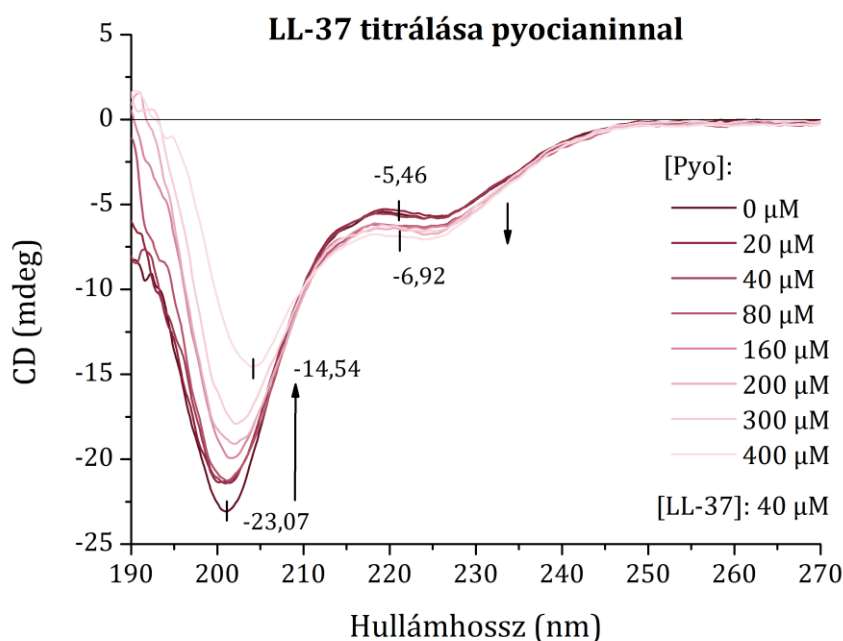
6.2. Piocianin kölcsönhatása antimikrobiális peptidekkel

A piocianin kék színű vegyület, így a látható tartományban is van spektruma, melyben több csúcs megjelenik rendre 237, 311 és 379 nm környékén (17. ábra). A PYO-koncentráció növelésével az összes csúcs intenzitása növekszik. A PYO CD-spektrumain TRIS pufferoldatban 300 μM koncentráció felett egy gyenge indukált CD-csúcs detektálható 300-320 nm között (Függelék 4. ábra), mely királis szupramolekuláris aggregátumok kialakulásának tulajdonítható.

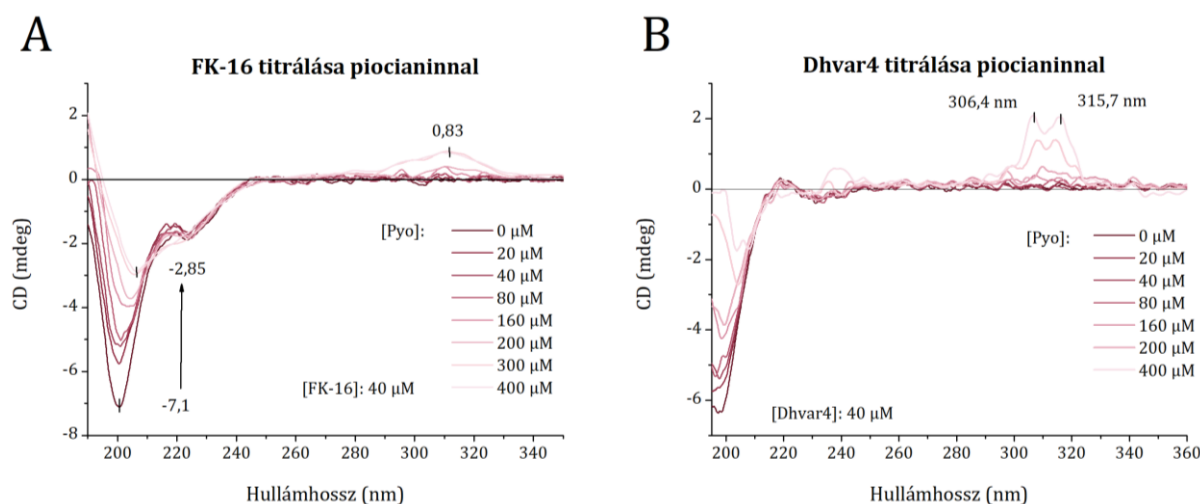


17. ábra: A piocianin UV-Vis abszorbancia spektrumai Tris-HCl pufferben különböző koncentrációkban felvéve.

A PQS-es titrálásokhoz hasonlóan, a PYO hozzáadása az LL-37 oldathoz a fő negatív csúcs csökkenését és enyhe jobbra tolódását eredményezte, amelynek középpontja 201 nm körül található, míg a váll intenzitása nagyrészt állandó maradt (18. ábra). Az FK-16 és a Dhvar4 esetében is megfigyelhető volt a CD jelintenzitások változása, a ~ 200 nm-nél lévő negatív csúcs folyamatosan csökkent a PYO koncentráció növelésének hatására, továbbá ennél a két peptidnél ~ 300 -320 nm-nél indukált CD jelet is észleltünk (19. ábra).



18. ábra: Az LL-37 PYO-val történő titrálásának CD-spektrumai Tris-HCl pufferben. A spektrumokat 40 μM peptidkoncentráció mellett vettük fel.



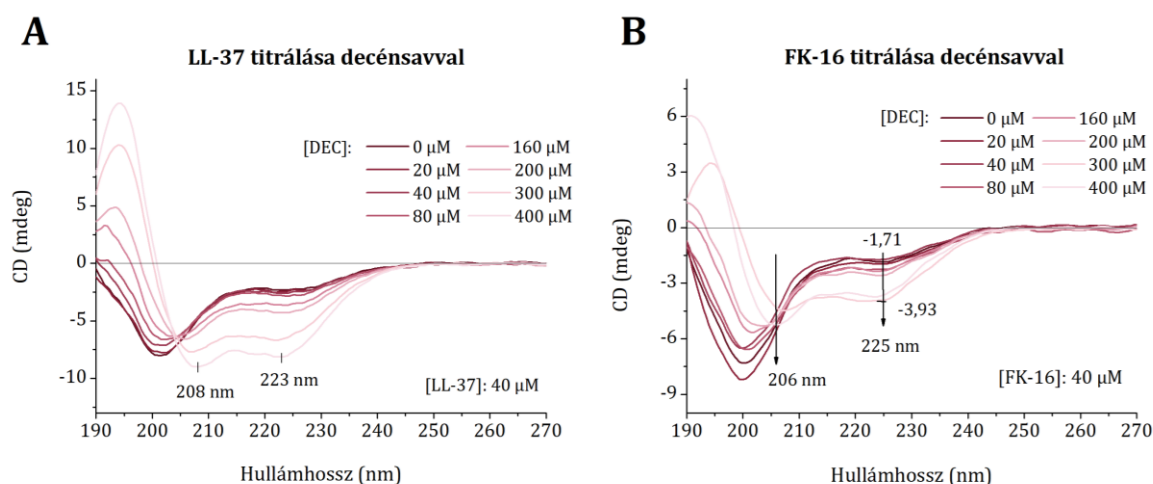
19. ábra: Az FK-16 (a) és Dhvar4 (b) peptidek PYO-val történő titrálásának CD-spektrumai Tris-HCl pufferben. A spektrumokat 40 μM peptidkoncentráció mellett vettük fel.

6.3. Decénsav kölcsönhatása antimikrobiális peptidekkel

Az LL-37 és FK-16 esetében végzett CD-mérések spektrumai azonos lefutásúak. A decénsav egyre növekvő koncentrációja előidézi a peptidek másodlagos szerkezetének megváltozását. A QS molekula koncentrációjának növekedésével a CD spektrumokban

először enyhe jobbra tolódás következik be, miközben a váll hangsúlyosabbá válik, majd 300 μM decénsav koncentráció felett mindkét peptid rendezett, α -helikális konformációt vesz fel. Az α -hélix szerkezetre jellemző CD- spektrum figyelhető meg kettős minimummal 208 és 222 nm-nél mind LL-37 (20. ábra), mind FK-16 esetében (20. ábra).

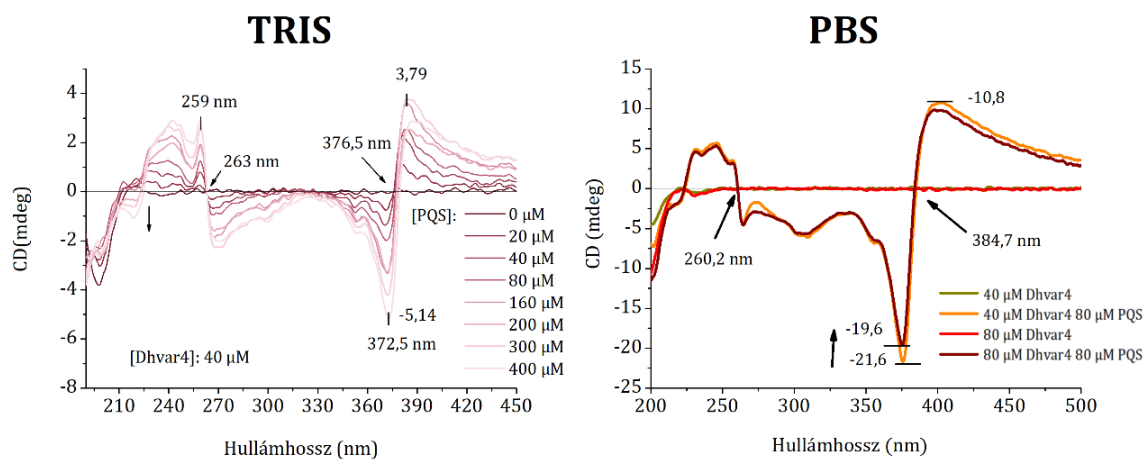
A decénsav hozzáadása a Dhvar4 peptidhez a fő negatív csúcs intenzitásának (~ 200 nm) csökkenését eredményezte (Függelék 5. ábra), míg ~ 230 nm-en található váll nem változott.



20. ábra: Az LL-37 (A) és az FK-16 (B) CD-spektrumai decénsav hozzáadásakor Tris-HCl pufferben. A spektrumokat 40 μM peptidkoncentráció mellett vettük fel.

6.4. Pufferoldat hatása

A konszekutív titrálásoknál, ahol a peptid - QS molekula kölcsönhatásának vizsgálata volt a célunk TRIS-HCl pufferoldatot alkalmaztunk. A háromkomponensű liposzómás rendszerek méréséhez egy másik, szintén 7,4-es pH-jú pufferoldatot, PBS-t használtunk. Emiatt lehetőségünk nyílt összehasonlítani a két pufferoldat hatását. A Dhvar4 - PQS rendszer esetén TRIS-ben is megjelenik az indukált CD jel, azonban intenzitása sokkal kisebb, még 400 μM PQS koncentrációnál is csupán 3,79 és -5,14 között változik az indukált jel nagysága. Ezzel szemben PBS pufferben, ahol csupán 80 μM PQS volt jelen 10,8 és -21,6 között változik a jel, miközben jobbra tolódik. A két pufferoldatban között további különbség, hogy TRIS-ben 259 nm-nél is megjelenik egy csúcs, amely sokkal hangsúlyosabb, mint PBS-ben, ahol inkább csak vállként jelenik meg a spektrumon. A PBS-ben kialakult indukált jel nagyságára az alkalmazott peptidkoncentráció (40 és 80 μM) nem volt hatással.



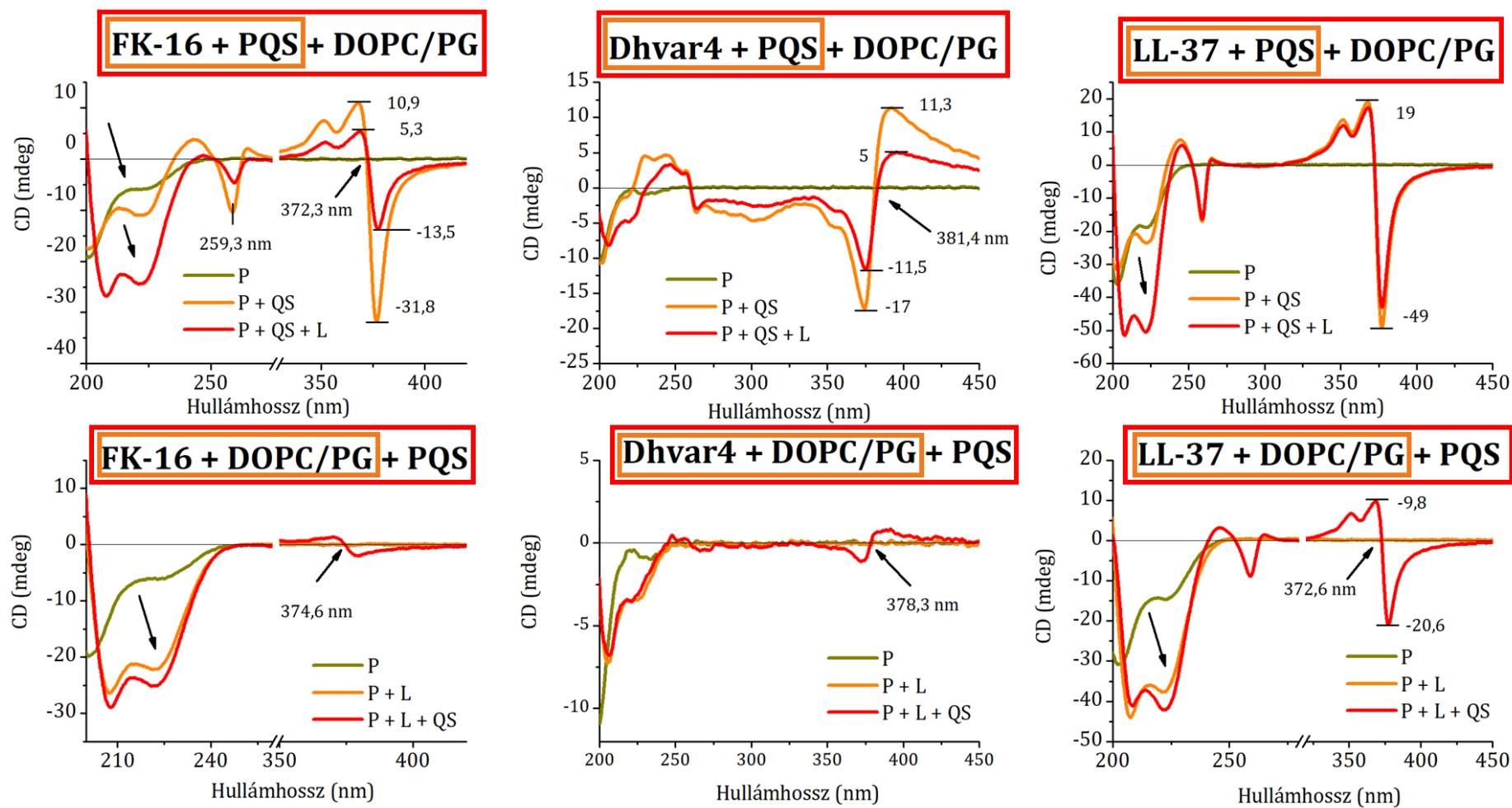
21. ábra: 40 μM Dhvar4 titrálása PQS-sel TRIS pufferben, 40 és 80 μM Dhvar4 oldathoz 80 μM PQS hozzáadása PBS pufferben

6.5. Pseudomonas kinolon kölcsönhatása liposzómákkal

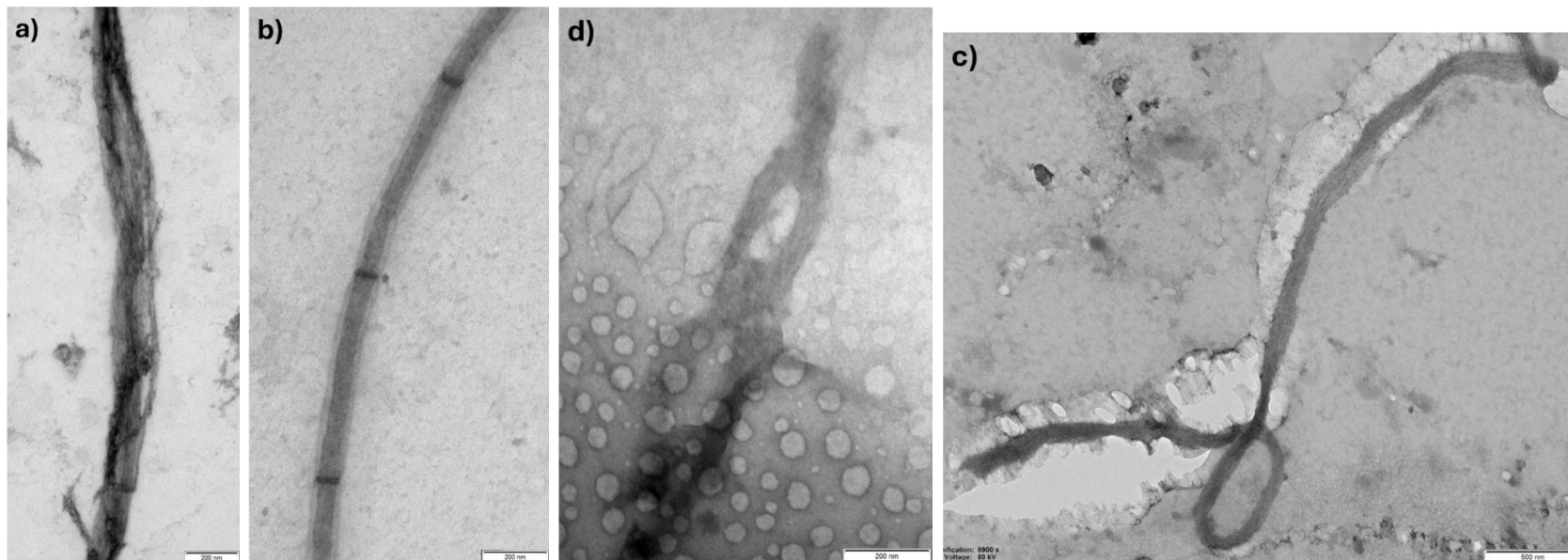
Amikor a kísérletekbe bevontuk a baktériumok sejtmembránjainak modellezésére szolgáló DOPC/DOPG liposzómát akkor lehetőségünk nyílt vizsgálni, hogy a háromkomponensű rendszer összekeverésének sorrendje befolyással van-e a kialakuló kölcsönhatásokra.

Azt tapasztaltuk FK-16 és Dhvar4 peptidek esetében, hogy ha a peptid előbb lép kölcsönhatásba a PQS-sel, akkor nagy indukált jel figyelhető meg a CD spektrumokon, és a keletkezett adduktot a liposzóma hozzákeverése nem tudja jelentősen szétbontani, a jelintenzitás körülbelül a felére csökken. Azonban, ha a peptidekhez előbb adjuk hozzá a DOPC/DOPG liposzómát, akkor a peptid nagy valószínűséggel szétterül a liposzóma felszínén, miközben az FK-16 esetében rendezett helikális szerkezet alakul ki, Dhvar4 esetében a 230 nm-nél lévő váll válik hangsúlyosabbá. A peptid hozzátapad a liposzóma felszínéhez, így kevés szabad peptid marad a rendszerben, amely a jelátvivő molekulával kölcsönhatásba tudna lépni. Ha a PQS-t adjuk hozzá utolsóként elhanyagolhatóan kis intenzitású indukált jel jelenik meg az FK-16 esetében 373 nm-nél, míg Dhavr4-nél 380 nm körül. Az indukált jel előbbinél a PQS UV-Vis spektrumának abszorbancia maximumánál (374 nm, Függelék 2. ábra) található.

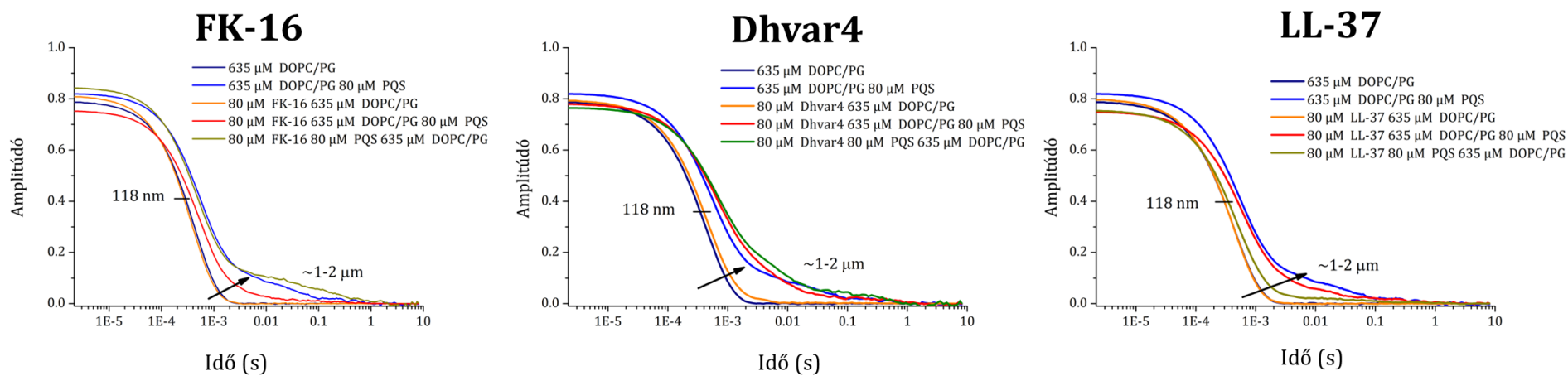
A PQS hozzáadása minden esetben aggregátumok képződését idézi elő, ezt mutatja a korrelációs függvényeken (24. ábra) fekete nyíllal jelölt plató kialakulása. Ezen 1-2 μm nagyságú aggregátumokat a PQS-ben megtalálható szálak okozhatják, melyek a TEM felvételeken láthatóak (23. ábra).



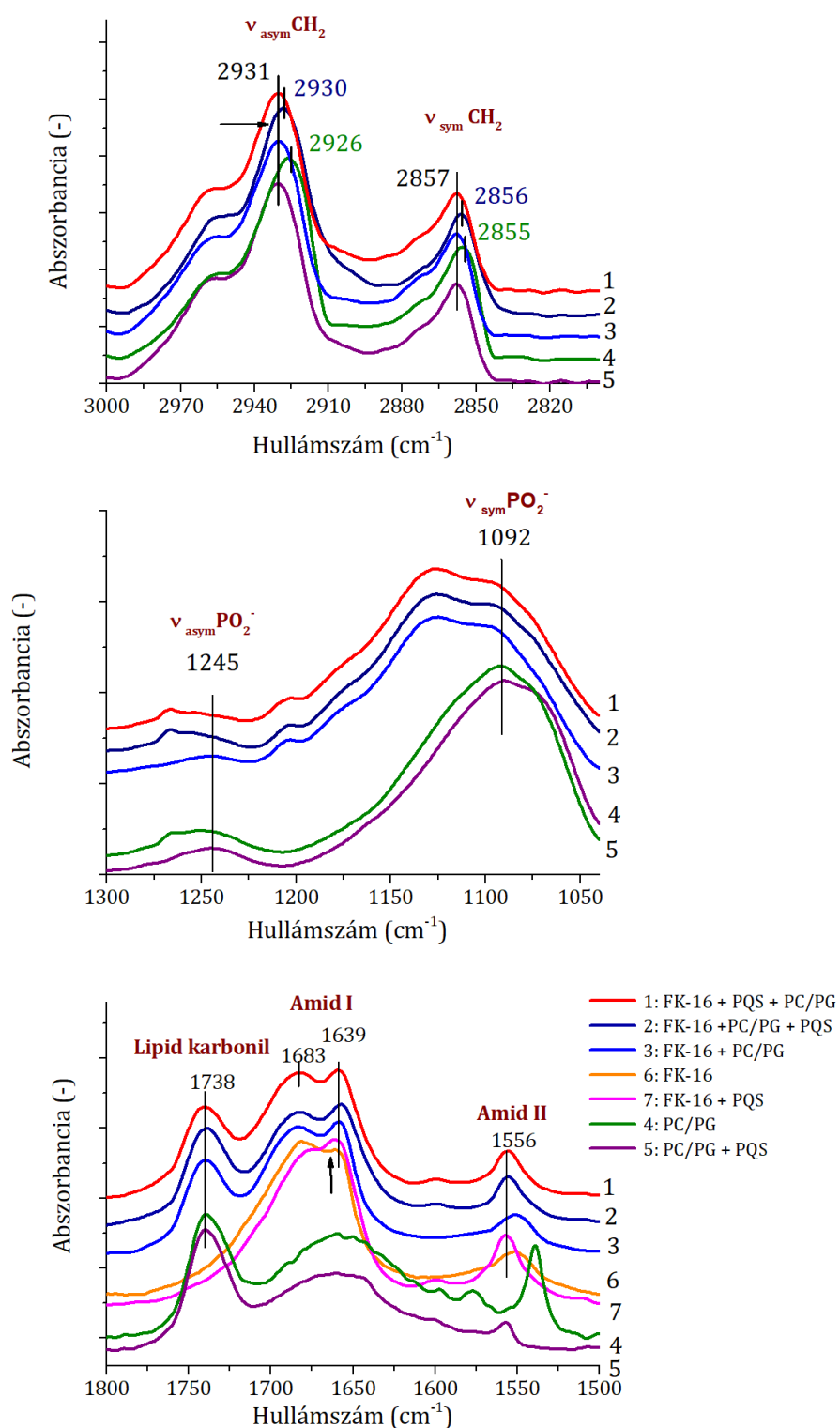
22. ábra: FK-16, Dhvar4 és LL-37 peptidek PQS-sel és DOPC/DOPG liposzómákkal alkotott háromkomponensű rendszereinek CD spektrumjai. A peptidek 80 μM koncentrációban, a PQS 80 μM , a liposzómák 635 μM koncentrációban voltak alkalmazva



23. ábra: TEM felvételek a) 200 μM PQS PBS pufferben, b) 80 μM FK-16, c) 80 μM Dhvar4 80 μM PQS, d) 80 μM LL-37 80 μM PQS



24. ábra: FK-16, Dhvar4 és LL-37 peptidek DOPC/DOPG-vel és PQS-sel alkotott rendszereinek korrelációs függvényei



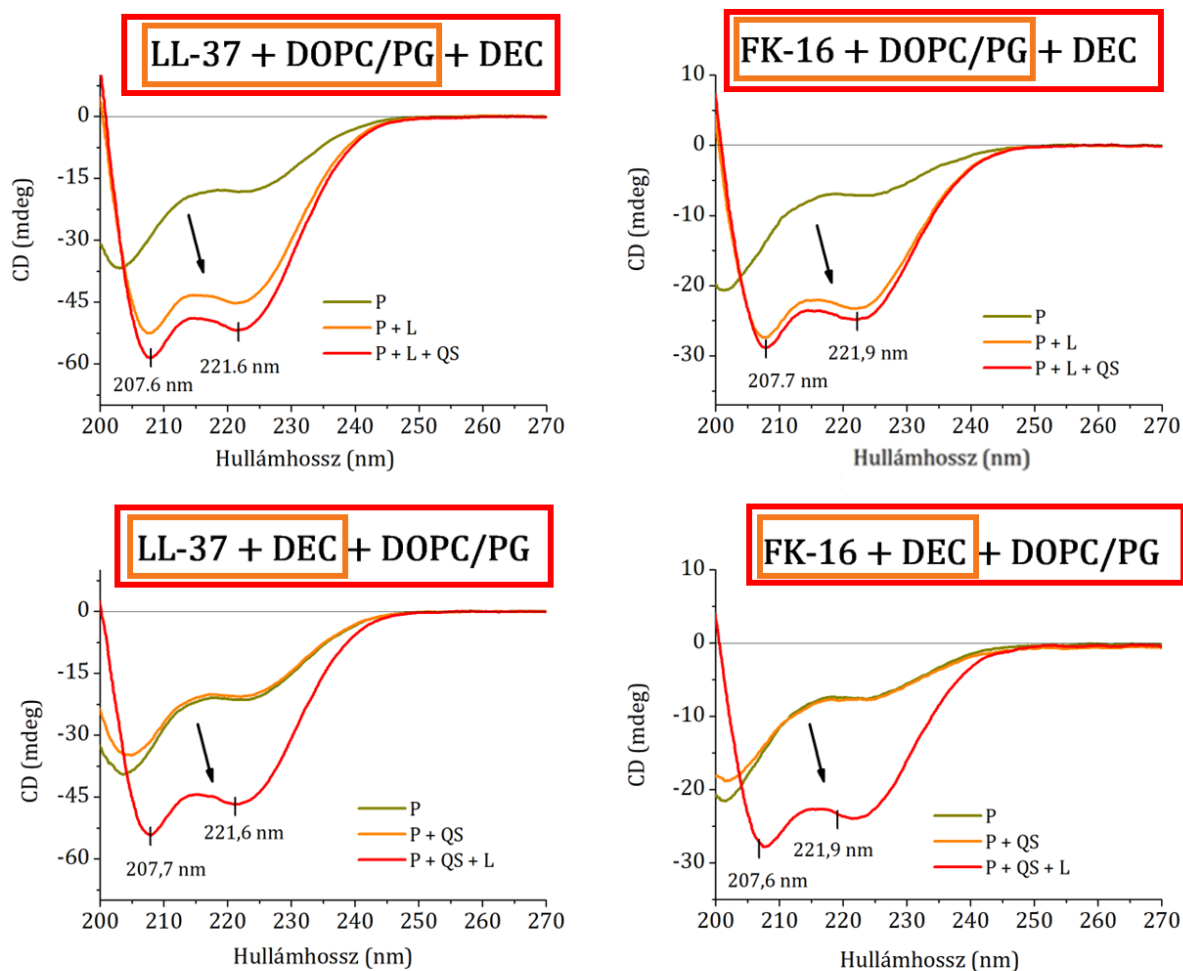
25. ábra: FK-16 peptid (P) PQS-sel (QS) és DOPC/DOPG liposzómával (L) alkotott háromkomponensű rendszereinek IR spektruma, 1: (P+QS)+L; 2: (P+L)+QS; 3: P+L; 4: L; 5: L+QS; 6: P 7: P+QS, alkalmazott koncentrációk: 80 μM FK-16 (P), 635 μM DOPC/DOPG (L), 80 μM PQS (QS)

A peptidek kölcsönhatásait ATR-FTIR spektroszkópiával is nyomonkövettük, a 25. ábrán a jellemző IR spektrumokat fogom bemutatni, az FK-16 peptid rendszerén. A CH-régióban mind a szimmetrikus, mind az aszimmetrikus CH₂ csoport sávja csak az L+QS és (P+L)+QS esetén tolódott el enyhén jobbra. Ez összhangban van a CD-méréseink eredményével, mivel, ha előbb keverjük a peptidet a QS-molekulával, akkor a kialakult addukt stabil, nem fog az utólagosan hozzáadott liposzómával kölcsönhatásba lépni. Azonban, ha a peptidhez a liposzóma van előbb hozzákeverve, akkor azok kölcsönhatásba lépnek, feltehetően a pozitív töltésű peptid hozzátapad a negatív felületi töltéssel rendelkező liposzómához. Emiatt a következő lépésként hozzáadott PQS nem tud a peptiddel kölcsönhatást kialakítani, ezért a liposzómával fog, ami a CH₂-régióban eltolódást eredményez.

Az amid-régióban 1738 cm⁻¹-nél a liposzómát tartalmazó rendszereknél jelentkezik egy csúcs, ez a lipid karbonil-csoportjának rezgéséből származik. Az amid régiója jól leírja a peptidek másodlagos szerkezetét, 1700 - 1650 cm⁻¹ közötti régióban ha a bal oldali váll a hangsúlyosabb akkor a β -redős szerkezet jelentős, 1640 cm⁻¹ nél található csúcs az α -helikális szerkezetre jellemző.

6.6. Decénsav kölcsönhatása liposzómákkal

A decénsav rendszerhez történő hozzáadása minden esetben intenzitás csökkenést okoz. Mivel ezeknél a méréseknél a decénsavat kis koncentrációban alkalmaztuk (80 μ M), ezért nem okozza a peptid helikális szerkezetének kialakulását, amikor a peptidhez elsőként van hozzáadva csak intenzitáscsökkenést idéz elő (26. ábra és Függelék 6. ábra). A liposzóma hatására az LL-37 és az FK-16 peptid helikális másodrendű szerkezetbe rendeződik akár elsőként vagy másodikként van hozzáadva a peptidoldathoz. A Dhvar4 esetében is jelentős szerkezeti változás figyelhető meg a liposzóma hozzáadását követően, de nem alakul ki ennyire szabályos helikális szerkezet, csak a váll válik hangsúlyosabbá miközben a kezdeti nagy negatív csúcs intenzitása lecsökken, és erősen jobbra tolódik (Függelék 6. ábra).



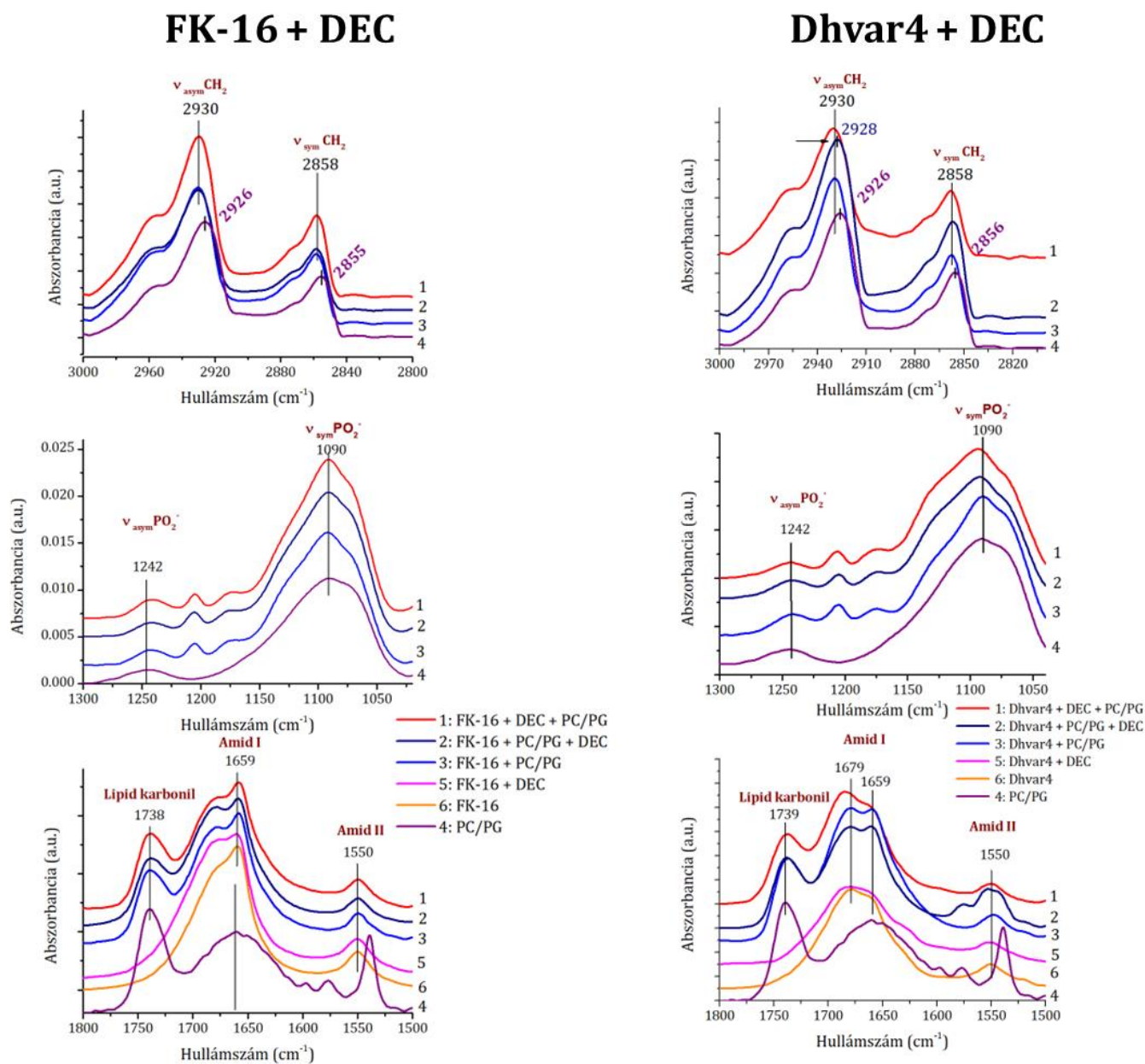
26. ábra: FK-16 és LL-37 peptidek decénsavval és DOPC/DOPG liposzómákkal alkotott háromkomponensű rendszereinek CD spektrumjai

Az IR spektrumok CH-régióiban minden peptidet tartalmazó spektrum balra tolódik a tiszta DOPC/DOPG spektrumához képest, csúcsmaximumuk egybeesik, egyedül a Dhvar4+L+QS rendszer esetében tolódik 2 cm^{-1} -el jobbra (27. ábra).

A foszfát régióban a PO_2^- szimmetrikus (1090 cm^{-1}) és aszimmetrikus (1242 cm^{-1}) csúcsainak rezgései nem tolódnak el egymáshoz képest. Dhvar4 esetében az 1090 cm^{-1} -nél lévő csúc bal oldali válla hangsúlyosabb, mint az FK-16-nál.

Az amid régiója jól leírja a peptidek másodlagos szerkezetét, $1700 - 1650\text{ cm}^{-1}$ között a bal oldali váll a hangsúlyosabb, tehát a β -redős szerkezet jelentős, 1640 cm^{-1} nél található váll a decénsav hozzáadására még hangsúlyosabbá válik. Megfigyelhető, hogy DEC + DOPC/DOPG hozzáadására az β -redőre jellemző csúc válik kiemelkedővé, míg fordított sorrendben a két csúc intenzitása hasonló. Az FK-16 esetében 1959 cm^{-1} -nél nagyobb a csúcintenzitás minden esetben, amikor a liposzóma is hozzá van adva a rendszerhez, ez

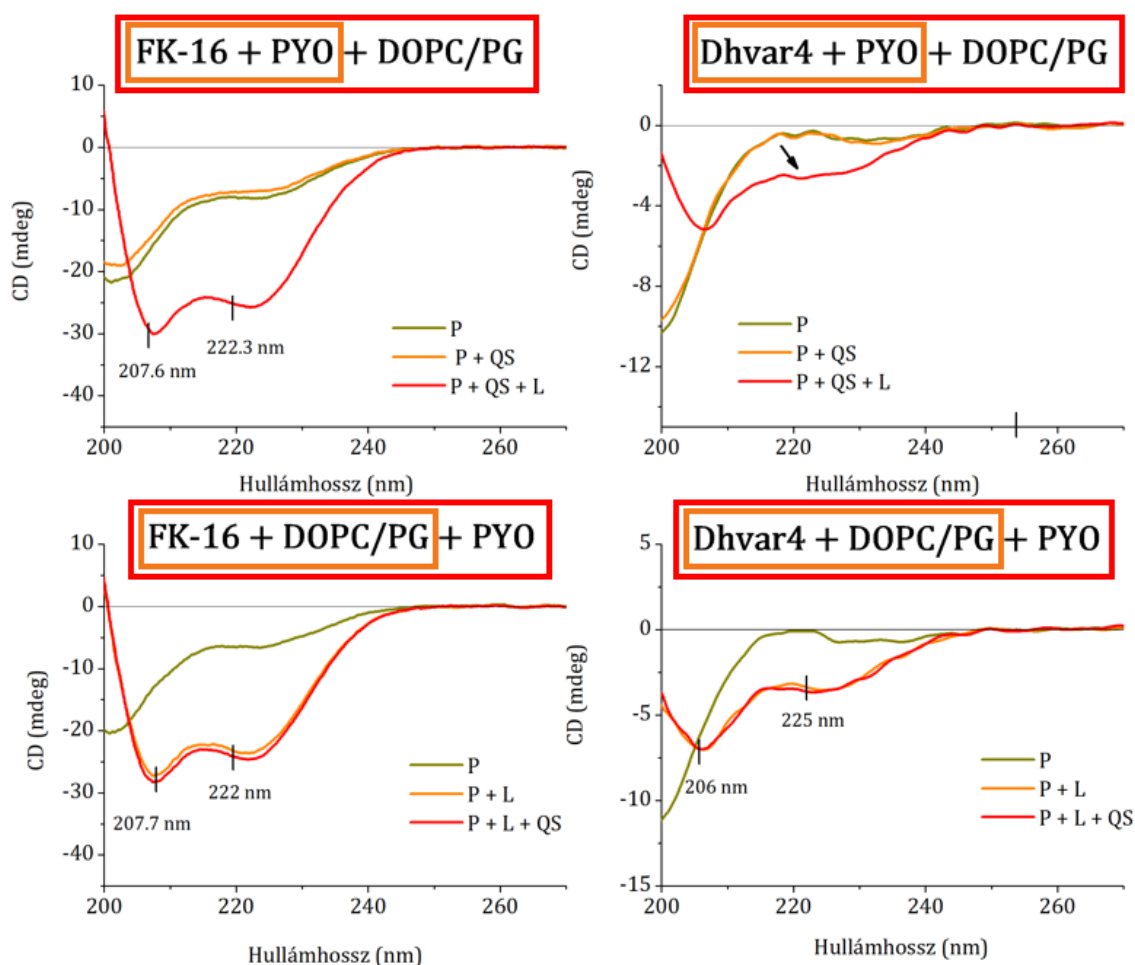
összhangban van a CD mérés során tapasztaltakkal. Az amid II régió nem változik, (Dhvar4 + L)+DEC esetén ettől balra 1575 cm^{-1} -nél megjelenik még egy csúcs, mely a többi esetben nem keletkezik.



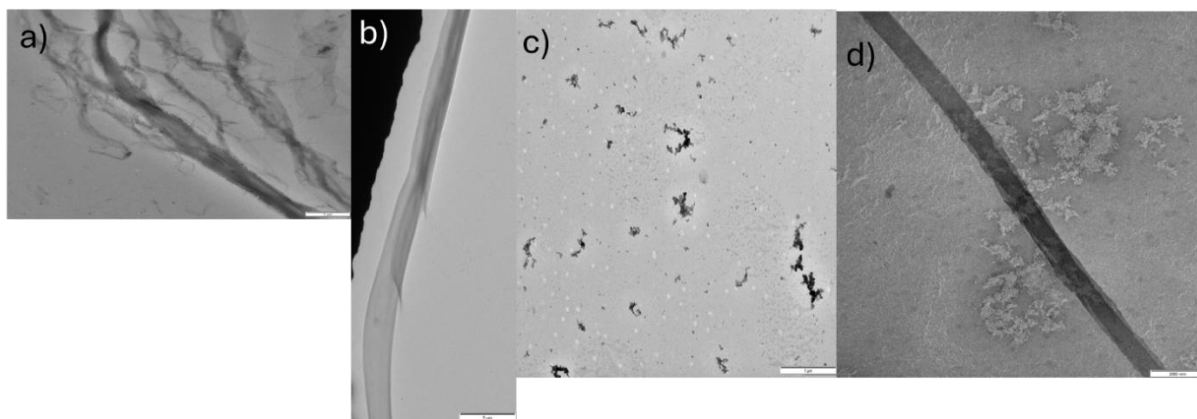
27. ábra: FK-16 és Dhvar4 peptid (P) decénsavval (QS) és DOPC/DOPG liposzómával (L) alkotott háromkomponensű rendszereinek IR spektrumai, 1: P+QS+L; 2: P+L+QS; 3: P+L; 4: L; 5: P+QS; 6: P

6.7. Piocianin kölcsönhatása liposzómákkal

A piocianint szintén vizsgáltuk háromkomponensű rendszerben, azonban itt indukált CD jel nem keletkezett a PQS-sel ellentétben, a PYO hozzáadása minden esetben kismértékű jelintenzitás csökkenést okozott, míg a liposzóma is hasonlóan viselkedett a korábban leírtakhoz, a peptidek másodlagos szerkezetére volt hatással (28. ábra).



28. ábra: FK-16 és Dhvar4 peptidek piocianinal és DOPC/DOPG liposzómákkal alkotott háromkomponensű rendszereinek CD spektrumjai



29. ábra: TEM felvételek a) 200 μM PYO PBS-ben, b) 200 μM PYO PBS-ben, c) 80 μM FK-16 80 μM PYO d) 80 μM Dhvar4 80 μM PYO

A TEM mérésekkel sikerült igazolni a képződött adduktok jelenlétét. A PYO esetén az alkalmazott 80 μM koncentrációnál nem detektálunk asszociátumokat, azonban 200 μM koncentrációnál különféle struktúrájú szálak jelennek meg. A peptid - piocianin rendszereknél a Dhvar4 esetén a szálak megtalálhatóak voltak, míg FK-16 esetén a DLS-el sem tudtunk kimutatni aggregátum jelenlétet, és a TEM-mel sem találtunk szálakat. (29. ábra) A többi vizsgált rendszer esetén a TEM mérések folyamatban vannak.

7. Összefoglalás

Kísérleteink során célunk az volt, hogy a peptid-jelátvivő molekula kölcsönhatásokat jellemezzük, valamint vizsgáljuk hogyan viselkednek liposzóma membránmodellekkel a peptid, illetve peptid-QS molekula adduktok.

A háromkomponensű rendszerek mérésekor PBS pufferoldatot használtunk, míg az előkísérletekben TRIS-HCl pufferoldat felhasználásával biztosítottuk a fiziológiai körülményeket. A peptidek CD spektrumának alakjában nem volt eltérés a 2 pufferoldat között, azonban a PQS FK-16 oldathoz keverve már sokkal kisebb, 80 μM koncentrációban is szignifikánsan nagyobb intenzitású indukált jelet adott.

Vizsgálataink során azt találtuk, hogy a PQS az FK-16 és Dhvar4 peptidekkel is királis aggregátumokat képez, melynek a szimmetriája függ az alkalmazott peptidtől. Háromkomponensű rendszerek esetén az indukált jel szintén kialakul, de annak intenzitása függ az összekeverés sorrendjétől. Ha a peptid először a QS molekulával lép kölcsönhatásba, akkor kialakul az indukált CD-jel, és ezt követően a liposzóma hozzáadására sem csökken jelentősen a jel, tehát a liposzóma nem tudja szétbontani a keletkezett peptid-PQS

aggregátumokat. Azonban, ha a QS molekula csak a liposzóma után van a rendszerhez adva, akkor az aggregátum nem tud kialakulni.

Ezeket a megfigyeléseket a quorum sensing gátlás területén lehetne alkalmazni, a jelátvivő molekulák célzottabb inhibíciója érdekében. További vizsgálataink során, együttműködésben a Szegedi Biológiai Központ kollégáival kísérletet teszünk a kialakult adduktok baktériumtenyészteten, in-vivo körülmények közötti tesztelésére.

Irodalomjegyzék

1. Murray, C. J., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Robles Aguilar, G., Gray, A., Han, C., Bisignano, C., Rao, P., Wool, E., Johnson, S. C., Browne, A. J., Chipeta, M. G., Fell, F., Hackett, S., Haines-Woodhouse, G., Kashef Hamadani, B. H., Kumaran, E. A. P., McManigal, B., ... Naghavi, M. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*, 399(10325), 629–655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)
2. Galdiero, E., Lombardi, L., Falanga, A., Libralato, G., Guida, M., & Carotenuto, R. (2019). Biofilms: Novel strategies based on antimicrobial peptides. In *Pharmaceutics* (Vol. 11, Issue 7). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11070322>
3. Zsila, F., Ricci, M., Szigyártó, I. C., Singh, P., & Beke-Somfai, T. (2021). Quorum Sensing Pseudomonas Quinolone Signal Forms Chiral Supramolecular Assemblies With the Host Defense Peptide LL-37. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.742023>
4. WHO. (n.d.). *Antimicrobial Resistance*. Retrieved September 18, 2023, from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
5. Frieri, M., Kumar, K., & Boutin, A. (2017). Antibiotic resistance. In *Journal of Infection and Public Health* (Vol. 10, Issue 4, pp. 369–378). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2016.08.007>
6. Batoni, G., Maisetta, G., & Esin, S. (2016). Antimicrobial peptides and their interaction with biofilms of medically relevant bacteria. In *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* (Vol. 1858, Issue 5, pp. 1044–1060). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.10.013>
7. WHO vaccination programme. (n.d.). Retrieved September 24, 2023, from https://immunizationdata.who.int/pages/schedule-by-country/hun.html?DISEASECODE=&TARGETPOP_GENERAL=

8. Berlanga, M., & Guerrero, R. (2016). Living together in biofilms: the microbial cell factory and its biotechnological implications. *Microbial Cell Factories*, 15(1), 165. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0569-5>
9. Donlan, R. M., & Costerton, J. W. (2002). Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. In *Clinical Microbiology Reviews* (Vol. 15, Issue 2, pp. 167–193). <https://doi.org/10.1128/CMR.15.2.167-193.2002>
10. Segev-Zarko, L., Saar-Dover, R., Brumfeld, V., Mangoni, M. L., & Shai, Y. (2015). Mechanisms of biofilm inhibition and degradation by antimicrobial peptides. *Biochemical Journal*, 468(2), 259–270. <https://doi.org/10.1042/BJ20141251>
11. Høiby, N., Bjarnsholt, T., Moser, C., Bassi, G. L., Coenye, T., Donelli, G., Hall-Stoodley, L., Holá, V., Imbert, C., Kirketerp-Møller, K., Lebeaux, D., Oliver, A., Ullmann, A. J., & Williams, C. (2015). ESCMID* guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections 2014. *Clinical Microbiology and Infection*, 21, S1–S25. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2014.10.024>
12. Davies, D. (2003). Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. In *Nature Reviews Drug Discovery* (Vol. 2, Issue 2, pp. 114–122). <https://doi.org/10.1038/nrd1008>
13. Høiby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Molin, S., & Ciofu, O. (2010). Antibiotic resistance of bacterial biofilms. In *International Journal of Antimicrobial Agents* (Vol. 35, Issue 4, pp. 322–332). <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2009.12.011>
14. Ahmed, S. K., Hussein, S., Qurbani, K., Ibrahim, R. H., Fareeq, A., Mahmood, K. A., & Mohamed, M. G. (2024). Antimicrobial resistance: Impacts, challenges, and future prospects. *Journal of Medicine, Surgery, and Public Health*, 2, 100081. <https://doi.org/10.1016/j.glmedi.2024.100081>
15. Gnanadhas, D. P., Elango, M., Datey, A., & Chakravorty, D. (2015). Chronic lung infection by *Pseudomonas aeruginosa* biofilm is cured by L-Methionine in combination with antibiotic therapy. *Scientific Reports*, 5. <https://doi.org/10.1038/srep16043>
16. Tängdén, T. (2014). Combination antibiotic therapy for multidrug-resistant Gram-negative bacteria. *Upsala Journal of Medical Sciences*, 119(2), 149–153. <https://doi.org/10.3109/03009734.2014.899279>
17. *Healthcare Improvement Scotland*. (n.d.). Retrieved September 3, 2024, from <https://rightdecisions.scot.nhs.uk/tam-treatments-and-medicines-nhs-highland/adult-therapeutic-guidelines/antimicrobial-guidance/critical-care-empiric-second-line-antibiotic-guidelines-for-level-2-and-3-antimicrobial/>

18. Silhavy, T. J., Kahne, D., & Walker, S. (2010). The bacterial cell envelope. In *Cold Spring Harbor perspectives in biology* (Vol. 2, Issue 5). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000414>
19. *Gram Stain Protocols*. (2005). www.asmscience.org
20. Jiménez-Jiménez, C., Moreno, V. M., & Vallet-Regí, M. (2022). Bacteria-Assisted Transport of Nanomaterials to Improve Drug Delivery in Cancer Therapy. In *Nanomaterials* (Vol. 12, Issue 2). MDPI. <https://doi.org/10.3390/nano12020288>
21. Francolini, I., & Donelli, G. (2010). Prevention and control of biofilm-based medical-device-related infections. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 59(3), 227–238. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2010.00665.x>
22. Sauer, K., Stoodley, P., Goeres, D. M., Hall-Stoodley, L., Burmølle, M., Stewart, P. S., & Bjarnsholt, T. (2022). The biofilm life cycle: expanding the conceptual model of biofilm formation. *Nature Reviews Microbiology*, 20(10), 608–620. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00767-0>
23. Pletzer, D., Coleman, S. R., & Hancock, R. E. W. (2016). Anti-biofilm peptides as a new weapon in antimicrobial warfare. In *Current Opinion in Microbiology* (Vol. 33, pp. 35–40). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.05.016>
24. Dunne, W. M. (2002). Bacterial adhesion: Seen any good biofilms lately? In *Clinical Microbiology Reviews* (Vol. 15, Issue 2, pp. 155–166). <https://doi.org/10.1128/CMR.15.2.155-166.2002>
25. Wingender, J., Neu, T. R., & Flemming, H.-C. (1999). What are Bacterial Extracellular Polymeric Substances? In *Microbial Extracellular Polymeric Substances* (pp. 1–19). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-60147-7_1
26. Verderosa, A. D., Totsika, M., & Fairfull-Smith, K. E. (2019). Bacterial Biofilm Eradication Agents: A Current Review. In *Frontiers in Chemistry* (Vol. 7). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00824>
27. Flemming, H.-C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8(9), 623–633. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>
28. Carpentier, B., & Cerf, O. (1993). Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. *Journal of Applied Bacteriology*, 75(6), 499–511. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1993.tb01587.x>
29. Li, Y., Xiao, P., Wang, Y., & Hao, Y. (2020). Mechanisms and Control Measures of Mature Biofilm Resistance to Antimicrobial Agents in the Clinical Context. *ACS Omega*, 5(36), 22684–22690. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c02294>

30. Chen, X., Thomsen, T. R., Winkler, H., & Xu, Y. (2020). Influence of biofilm growth age, media, antibiotic concentration and exposure time on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm removal in vitro. *BMC Microbiology*, 20(1), 264. <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01947-9>
31. Schulze, A., Mitterer, F., Pombo, J. P., & Schild, S. (2021). Biofilms by bacterial human pathogens: Clinical relevance - development, composition and regulation - therapeutical strategies. *Microbial Cell*, 8(2), 28–56. <https://doi.org/10.15698/mic2021.02.741>
32. <https://biofilmbraihub.co.uk/biofilm-structure/structure-and-matrix>. (2022, November 30).
33. Wagner, V. E., Bushnell, D., Passador, L., Brooks, A. I., & Iglewski, B. H. (2003). Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulons: Effects of growth phase and environment. *Journal of Bacteriology*, 185(7), 2080–2095. <https://doi.org/10.1128/JB.185.7.2080-2095.2003>
34. Christensen, L. D., van Gennip, M., Jakobsen, T. H., Alhede, M., Hougen, H. P., Hoiby, N., Bjarnsholt, T., & Givskov, M. (2012). Synergistic antibacterial efficacy of early combination treatment with tobramycin and quorum-sensing inhibitors against *Pseudomonas aeruginosa* in an intraperitoneal foreign-body infection mouse model. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(5), 1198–1206. <https://doi.org/10.1093/jac/dks002>
35. De La Fuente-Núñez, C., Korolik, V., Bains, M., Nguyen, U., Breidenstein, E. B. M., Horsman, S., Lewenza, S., Burrows, L., & Hancock, R. E. W. (2012). Inhibition of bacterial biofilm formation and swarming motility by a small synthetic cationic peptide. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(5), 2696–2704. <https://doi.org/10.1128/AAC.00064-12>
36. Hancock, R. E. W., & Speert, D. P. (2000). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Mechanisms and impact on treatment. *Drug Resistance Updates*, 3(4), 247–255. <https://doi.org/10.1054/drup.2000.0152>
37. Lau, G. W., Hassett, D. J., Ran, H., & Kong, F. (2004). The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. In *Trends in Molecular Medicine* (Vol. 10, Issue 12, pp. 599–606). <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2004.10.002>
38. Magill, S. S., Edwards, J. R., Bamberg, W., Beldavs, Z. G., Dumyati, G., Kainer, M. A., Lynfield, R., Maloney, M., McAllister-Hollod, L., Nadle, J., Ray, S. M., Thompson, D. L., Wilson, L. E., & Fridkin, S. K. (2014). Multistate Point-Prevalence Survey of Health

- Care-Associated Infections. *New England Journal of Medicine*, 370(13), 1198–1208. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1306801>
39. Vincent, J.-L., Sakr, Y., Singer, M., Martin-Loeches, I., Machado, F. R., Marshall, J. C., Finfer, S., Pelosi, P., Brazzi, L., Aditjaningsih, D., Timsit, J.-F., Du, B., Wittebole, X., Máca, J., Kannan, S., Gorordo-Delsol, L. A., De Waele, J. J., Mehta, Y., Bonten, M. J. M., ... Angus, D. C. (2020). Prevalence and Outcomes of Infection Among Patients in Intensive Care Units in 2017. *JAMA*, 323(15), 1478. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.2717>
40. James, G. A., Swogger, E., Wolcott, R., Pulcini, E. D., Secor, P., Sestrich, J., Costerton, J. W., & Stewart, P. S. (2008). Biofilms in chronic wounds. *Wound Repair and Regeneration*, 16(1), 37–44. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2007.00321.x>
41. IDSA. (n.d.). Retrieved September 3, 2024, from <https://www.idsociety.org/news--publications-new/articles/2020/idsa-releases-guidance-on-treatment-of-antimicrobial-resistant-infections/>
42. Guimarães, D., Cavaco-Paulo, A., & Nogueira, E. (2021). Design of liposomes as drug delivery system for therapeutic applications. In *International Journal of Pharmaceutics* (Vol. 601). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120571>
43. Műszaki, B., Egyetem, G., És, V., Kar, B., Kémia, F., & Tanszék, A. (n.d.). *HÓRVÖLGYI ZOLTÁN A NANOTECHNOLÓGIA KOLLOIDKÉMIAI ALAPJAI Egyetemi tananyag 2011*. www.tankonyvtar.hu
44. Chen, J., Hu, S., Sun, M., Shi, J., Zhang, H., Yu, H., & Yang, Z. (2024). Recent advances and clinical translation of liposomal delivery systems in cancer therapy. In *European Journal of Pharmaceutical Sciences* (Vol. 193). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2023.106688>
45. Bitounis, D., Fanciullino, R., Iliadis, A., & Ciccolini, J. (2012). Optimizing Druggability through Liposomal Formulations: New Approaches to an Old Concept. *ISRN Pharmaceutics*, 2012, 1–11. <https://doi.org/10.5402/2012/738432>
46. Krastel, P., Zeeck, A., Gebhardt, K., Fiedler, H.-P., & Rheinheimer, J. (2002). Endophenazines A-D, New Phenazine Antibiotics from the Athropod Associated Endosymbiont *Streptomyces anulatus* II. Structure Elucidation•ö. In *JOURNAL OF ANTIBIOTICS* (Vol. 55, Issue 9).
47. Remali, J., Loke, K. K., Ng, C. L., Aizat, W. M., Tiong, J., & Zin, N. M. (2017). Whole-genome shotgun sequence of phenazine-producing endophytic *Streptomyces*

- kebangsaanensis SUK12. *Genomics Data*, 13, 7–10.
<https://doi.org/10.1016/j.gdata.2017.05.015>
48. Mavrodi, D. V., & Parejko, J. A. (2013). Phenazines and bacterial biofilms. In *Microbial Phenazines: Biosynthesis, Agriculture and Health* (pp. 71–87). Springer-Verlag Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-40573-0_4
49. Salwan, R., & Sharma, V. (2020). Bioactive compounds of Streptomyces: Biosynthesis to applications. In *Studies in Natural Products Chemistry* (Vol. 64, pp. 467–491). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817903-1.00015-2>
50. Hadla, M., & Halabi, M. A. (2018). Effect of Quorum Sensing. In *Comprehensive Analytical Chemistry* (Vol. 81, pp. 95–116). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/bs.coac.2018.02.004>
51. Denning, G. M., Railsback, M. A., Rasmussen, G. T., Cox, C. D., & Britigan, B. E. (1998). *Pseudomonas* pyocyanine alters calcium signaling in human airway epithelial cells. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 274(6), L893–L900. <https://doi.org/10.1152/ajplung.1998.274.6.L893>
52. Moustafa, H., And, H., & Fridovich, I. (1980). Mechanism of the Antibiotic Action of Pyocyanine. In *JouRNAL OF BACTERIOLOGY* (Vol. 141, Issue 1).
53. Diggle, S. P., Winzer, K., Chhabra, S. R., Worrall, K. E., Cámara, M., & Williams, P. (2003). The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal molecule overcomes the cell density-dependency of the quorum sensing hierarchy, regulates rhl-dependent genes at the onset of stationary phase and can be produced in the absence of LasR. *Molecular Microbiology*, 50(1), 29–43. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03672.x>
54. Mavrodi, D. V., Bonsall, R. F., Delaney, S. M., Soule, M. J., Phillips, G., & Thomashow, L. S. (2001). Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Bacteriology*, 183(21), 6454–6465. <https://doi.org/10.1128/JB.183.21.6454-6465.2001>
55. Cao, H., Krishnan, G., Goumnerov, B., Tsongalis, J., Tompkins, R., & Rahme, L. G. (n.d.). A quorum sensing-associated virulence gene of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a LysR-like transcription regulator with a unique self-regulatory mechanism. www.pnas.org
56. Sams, T., Baker, Y., Hodgkinson, J., Gross, J., Spring, D., & Welch, M. (2016). The *Pseudomonas* Quinolone Signal (PQS). In *Israel Journal of Chemistry* (Vol. 56, Issue 5, pp. 282–294). Wiley-VCH Verlag. <https://doi.org/10.1002/ijch.201400128>

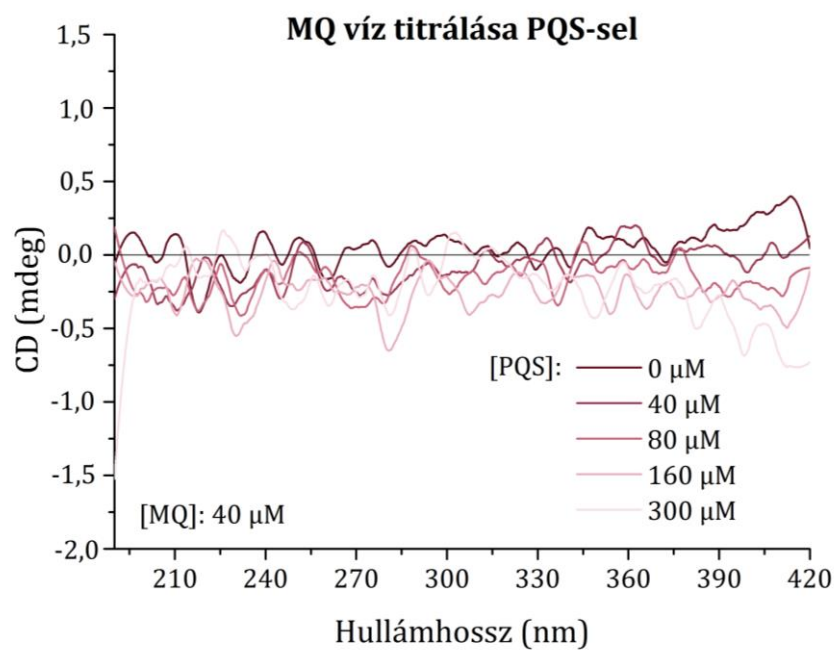
57. Lin, J., Cheng, J., Wang, Y., & Shen, X. (2018). The Pseudomonas Quinolone Signal (PQS): Not Just for Quorum Sensing Anymore. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00230>
58. Wang, J., Xue, T., Ye, H., Sang, C., Wu, S., & Li, S. (2021). Study of the common activating mechanism of apoptosis and epithelial-to-mesenchymal transition in alveolar type II epithelial cells. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 284, 103584. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2020.103584>
59. Usher, L. R., Lawson, R. A., Geary, I., Taylor, C. J., Bingle, C. D., Taylor, G. W., & Whyte, M. K. B. (2002). Induction of Neutrophil Apoptosis by the *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin Pyocyanin: A Potential Mechanism of Persistent Infection. *The Journal of Immunology*, 168(4), 1861–1868. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.4.1861>
60. Lau, G. W., Hassett, D. J., Ran, H., & Kong, F. (2004). The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Trends in Molecular Medicine*, 10(12), 599–606. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2004.10.002>
61. Reimer, Å. (2000). Concentrations of the *Pseudomonas aeruginosa* Toxin Pyocyanin in Human Ear Secretions. *Acta Oto-Laryngologica*, 120(543), 86–88. <https://doi.org/10.1080/000164800454062>
62. Montagut, E. J., Martin-Gomez, M. T., & Marco, M. P. (2021). An Immunochemical Approach to Quantify and Assess the Potential Value of the Pseudomonas Quinolone Signal as a Biomarker of Infection. *Analytical Chemistry*, 93(11), 4859–4866. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c04731>
63. Ortori, C. A., Dubern, J.-F., Chhabra, S. R., Cámara, M., Hardie, K., Williams, P., & Barrett, D. A. (2011). Simultaneous quantitative profiling of N-acyl-L-homoserine lactone and 2-alkyl-4(1H)-quinolone families of quorum-sensing signaling molecules using LC-MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 399(2), 839–850. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-4341-0>
64. Nair, M. K. M., Joy, J., Vasudevan, P., Hinckley, L., Hoagland, T. A., & Venkitanarayanan, K. S. (2005). Antibacterial effect of caprylic acid and monocaprylin on major bacterial mastitis pathogens. *Journal of Dairy Science*, 88(10), 3488–3495. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)73033-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)73033-2)
65. Davies, D. G., & Marques, C. N. H. (2009). A Fatty Acid Messenger Is Responsible for Inducing Dispersion in Microbial Biofilms. *Journal of Bacteriology*, 191(5), 1393–1403. <https://doi.org/10.1128/JB.01214-08>

66. Rahmani-Badi, A., Sepehr, S., Mohammadi, P., Soudi, M. R., Babaie-Naiej, H., & Fallahi, H. (2014). A combination of cis-2-decenoic acid and antibiotics eradicates pre-established catheter-associated biofilms. *Journal of Medical Microbiology*, 63(11), 1509–1516. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.075374-0>
67. Huang, C. B., Alimova, Y., Myers, T. M., & Ebersole, J. L. (2011). Short- and medium-chain fatty acids exhibit antimicrobial activity for oral microorganisms. *Archives of Oral Biology*, 56(7), 650–654. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2011.01.011>
68. Hilchie, A. L., Wuerth, K., & Hancock, R. E. W. (2013). Immune modulation by multifaceted cationic host defense (antimicrobial) peptides. In *Nature Chemical Biology* (Vol. 9, Issue 12, pp. 761–768). <https://doi.org/10.1038/nchembio.1393>
69. Hancock, R. E. W., Alford, M. A., & Haney, E. F. (2021). Antibiofilm activity of host defence peptides: complexity provides opportunities. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 19, Issue 12, pp. 786–797). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00585-w>
70. Haney, E. F., Straus, S. K., & Hancock, R. E. W. (2019). Reassessing the host defense peptide landscape. In *Frontiers in Chemistry* (Vol. 7, Issue FEB). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00043>
71. van der Does, A. M., Hiemstra, P. S., & Mookherjee, N. (2019). Antimicrobial host defence peptides: Immunomodulatory functions and translational prospects. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 1117, pp. 149–171). Springer New York LLC. https://doi.org/10.1007/978-981-13-3588-4_10
72. Hancock, R. E. W., Haney, E. F., & Gill, E. E. (2016). The immunology of host defence peptides: Beyond antimicrobial activity. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 16, Issue 5, pp. 321–334). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.29>
73. Mishra, B., & Wang, G. (2017). Titanium surfaces immobilized with the major antimicrobial fragment FK-16 of human cathelicidin LL-37 are potent against multiple antibiotic-resistant bacteria. *Biofouling*, 33(7), 544–555. <https://doi.org/10.1080/08927014.2017.1332186>
74. Schlessinger, D. (1988). Failure of aminoglycoside antibiotics to kill anaerobic, low-pH, and resistant cultures. *Clinical Microbiology Reviews*, 1(1), 54–59. <https://doi.org/10.1128/CMR.1.1.54>
75. Neshani, A., Zare, H., Akbari Eidgahi, M. R., Kamali Kakhki, R., Safdari, H., Khaledi, A., & Ghazvini, K. (2019). LL-37: Review of antimicrobial profile against sensitive and

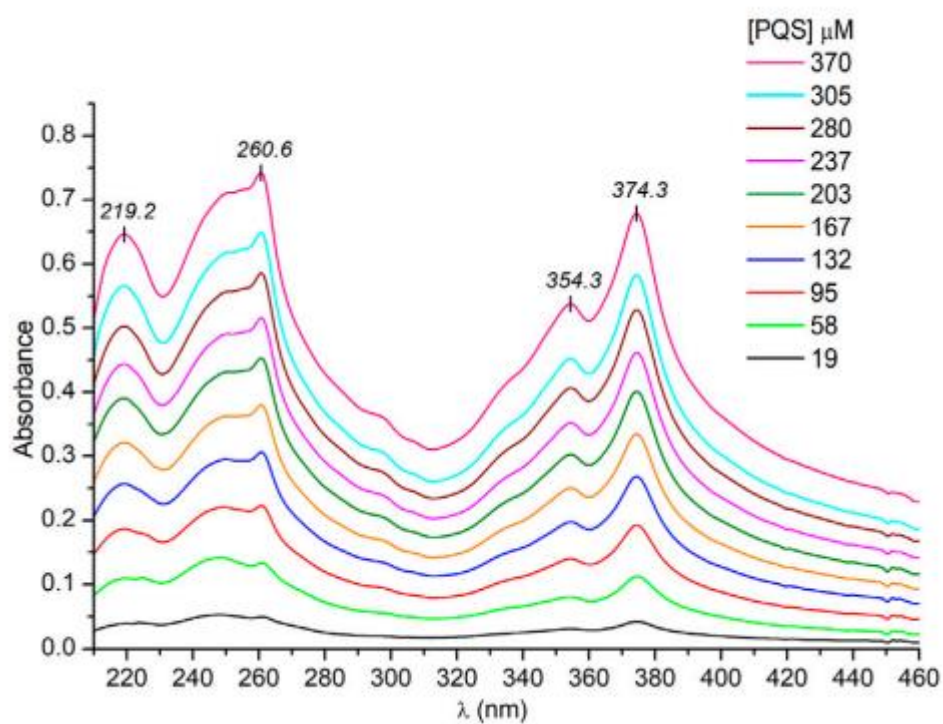
- antibiotic-resistant human bacterial pathogens. In *Gene Reports* (Vol. 17). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2019.100519>
76. Overhage, J., Campisano, A., Bains, M., Torfs, E. C. W., Rehm, B. H. A., & Hancock, R. E. W. (2008). Human Host Defense Peptide LL-37 Prevents Bacterial Biofilm Formation. *Infection and Immunity*, 76(9), 4176–4182. <https://doi.org/10.1128/IAI.00318-08>
77. Ridyard, K. E., & Overhage, J. (2021). The potential of human peptide ll-37 as an antimicrobial and anti-biofilm agent. *Antibiotics*, 10(6). <https://doi.org/10.3390/antibiotics10060650>
78. Wang, X., Junior, J. C. B., Mishra, B., Lushnikova, T., Epand, R. M., & Wang, G. (2017). Arginine-lysine positional swap of the LL-37 peptides reveals evolutionary advantages of the native sequence and leads to bacterial probes. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1859(8), 1350–1361. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.04.018>
79. Mohammed, I., Said, D. G., Nubile, M., Mastropasqua, L., & Dua, H. S. (2019). Cathelicidin-Derived Synthetic Peptide Improves Therapeutic Potential of Vancomycin Against *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02190>
80. Den Hertog, A. L., Wong Fong Sang, H. W., Kraayenhof, R., Bolscher, J. G. M., Van't Hof, W., Veerman, E. C. I., & Nieuw Amerongen, A. V. (2004). Interactions of histatin 5 and histatin 5-derived peptides with liposome membranes: surface effects, translocation and permeabilization. In *Biochem. J* (Vol. 379).
81. Ricci, M., Horváti, K., Juhász, T., Szigyártó, I., Török, G., Sebák, F., Bodor, A., Homolya, L., Henczkó, J., Pályi, B., Mlinkó, T., Mihály, J., Nizami, B., Yang, Z., Lin, F., Lu, X., Románszki, L., Bóta, A., Varga, Z., ... Beke-Somfai, T. (2020). Anionic food color tartrazine enhances antibacterial efficacy of histatin-derived peptide DHVAR4 by fine-tuning its membrane activity. *Quarterly Reviews of Biophysics*. <https://doi.org/10.1017/S0033583520000013>
82. Lu, X., Wan, L., Yang, H., Zhang, J., Li, S., Kang, M., Li, Y., & Cheng, J. (2006). Fusion of fungicidal peptide dhvar4 to enterococcal peptide pheromone increases its bactericidal activity against *Enterococcus faecalis*. *Chemical Biology and Drug Design*, 68(4), 220–224. <https://doi.org/10.1111/j.1747-0285.2006.00434.x>
83. Elving, G. J., Van der Mei, H. C., Busscher, H. J., van Nieuw Amerongen, A., Veerman, E. C. I., van Weissenbruch, R., & Albers, F. W. J. (2000). Antimicrobial activity of

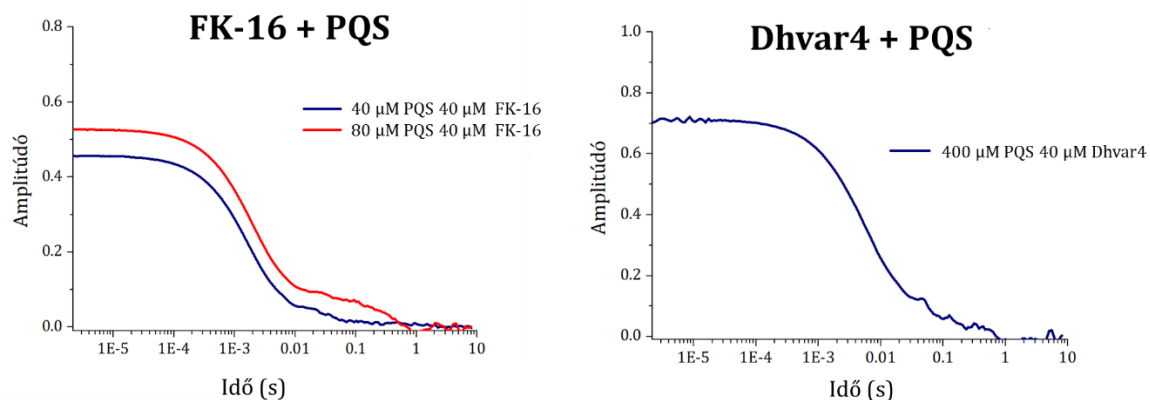
- synthetic salivary peptides against voice prosthetic microorganisms. *Laryngoscope*, 110(2), 321. <https://doi.org/10.1097/00005537-200002010-00027>
84. Li, X., Li, Y., Han, H., Miller, D. W., & Wang, G. (2006). Solution structures of human LL-37 fragments and NMR-based identification of a minimal membrane-targeting antimicrobial and anticancer region. *Journal of the American Chemical Society*, 128(17), 5776–5785. <https://doi.org/10.1021/ja0584875>
85. Nordén, B., Rodger, Alison., Dafforn, Tim., & Royal Society of Chemistry (Great Britain). (2010). *Linear dichroism and circular dichroism : a textbook on polarized-light spectroscopy*. Royal Society of Chemistry.
86. Micsonai, A., Wien, F., Kernya, L., Lee, Y. H., Goto, Y., Réfrégiers, M., & Kardos, J. (2015). Accurate secondary structure prediction and fold recognition for circular dichroism spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(24), E3095–E3103. <https://doi.org/10.1073/pnas.1500851112>
87. ATR-FTIR2. (n.d.). Retrieved September 13, 2024, from <https://wiki.anton-paar.com/en/attenuated-total-reflectance-atr/>
88. ATR_FTIR4. (n.d.). Retrieved September 30, 2024, from <https://www.collegesidekick.com/study-guides/labmethods/ftir-methods-attenuated-total-reflection-atr>
89. Stetefeld, J., McKenna, S. A., & Patel, T. R. (2016). Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. In *Biophysical Reviews* (Vol. 8, Issue 4, pp. 409–427). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s12551-016-0218-6>
90. DLS. (n.d.). Retrieved October 1, 2024, from <https://wiki.anton-paar.com/en/the-principles-of-dynamic-light-scattering/>
91. TEM. (n.d.). Retrieved October 15, 2024, from <https://www.nanoscience.com/techniques/transmission-electron-microscopy/>
92. Zsila, F., Kohut, G., & Beke-Somfai, T. (2019). Disorder-to-helix conformational conversion of the human immunomodulatory peptide LL-37 induced by antiinflammatory drugs, food dyes and some metabolites. *International Journal of Biological Macromolecules*, 129, 50–60. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.209>

Függelék

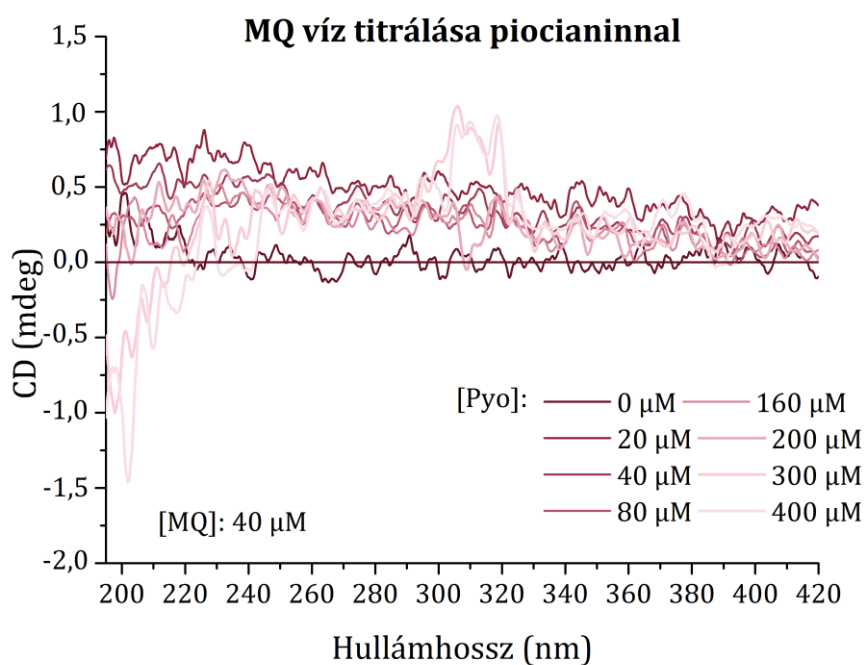


1. függelék ábra: PQS CD spektruma TRIS-HCl pufferoldatban

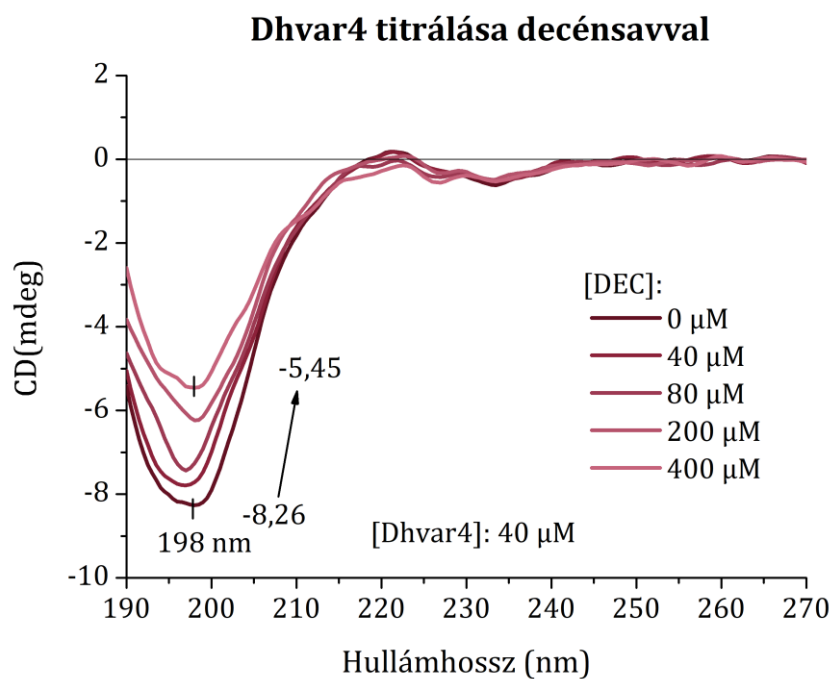
2. függelék ábra: PQS abszorbancia spektruma PBS pufferben^[3]



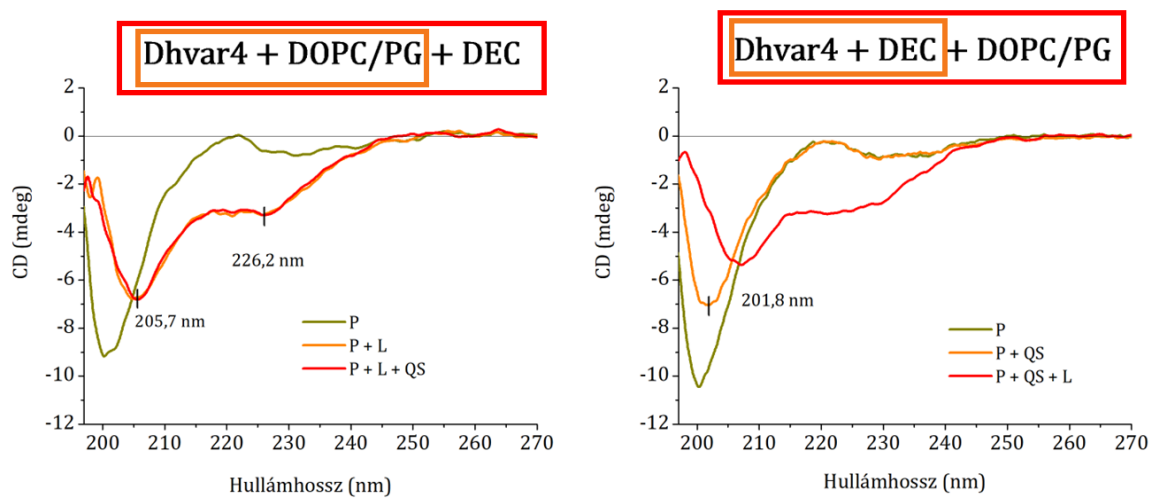
3. függelék ábra: FK-16 és Dhvar4 korrelációs függvényei



4. függelék ábra: A pyocianin CD spektrumai Tris-HCl pufferben, különböző koncentrációkban



5. függelék ábra: Dhvar4 titrálása decénsavval Tris-HCl pufferben, a spektrum 40 μM peptidkoncentráció mellett lett felvéve.



6. függelék ábra: CD spektrum Dhvar4 kölcsönhatása decénsavval és DOPC/DOPG liposzómával