

Vonyó András Zoltán

Biológia Bsc III. évfolyam

Változott virulenciájú baktériumvonalak érzékenységének vizsgálata az immunrendszer nem-sejtes komponenseivel szemben

37. OTDK Biológia Szekció

Témavezetők:

Dr. Juhász Szilvia

Dr. Szili Petra Éva



SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

Magyar Molekuláris Medicina Kiválósági Központ

2025

Szeged

1	Tartalomjegyzék	
2	Rövidítésjegyzék	2
3	Irodalmi áttekintés	4
3.1	Antibiotikumrezisztencia okozta kihívások, és globális hatásai	4
3.2	Az antibiotikumrezisztencia genetikai mechanizmusai és terjedése	7
3.3	A fejlesztés alatt álló antibiotikumok kihívásai és jövőbeli lehetőségei	8
3.4	Antimikrobiális peptidek, mint potenciális antibiotikumok	9
3.5	Az antibiotikumrezisztencia költsége és hatása a bakteriális populációkra	11
3.6	Antibakteriális immunválaszok	12
3.7	A veleszületett immunrendszer válasza a bakteriális fertőzésre	12
3.8	Komplement rendszer szerepe a baktériumokkal szembeni védekezésben	13
3.9	A humán immunrendszer antimikrobiális peptidjei.....	15
4	Célkitűzések	17
5	Anyagok és módszerek.....	18
5.1	Felhasznált baktérium törzsek és vonalak:	18
5.2	A kísérletekben felhasznált tápoldatok:.....	19
5.3	Minimális gátlási koncentráció meghatározás.....	19
5.4	Vérszérum-rezisztencia mérés	20
6	Eredmények.....	22
6.1	A virulenciában változást mutató baktériumvonalak AMP érzékenysége	22
6.2	A növekedett virulenciájú vonalak gyakran mutatnak keresztrezisztenciát humán AMP-kre.....	23
6.3	A csökkent virulenciát mutató vonalak több mint 80%-a érzékenyebb lett legalább egy humán AMP-re.....	24
6.4	A változott virulenciát mutató baktériumvonalak érzékenysége humán vérszérumra	25
6.5	Az adaptált <i>Klebsiella pneumoniae</i> vonalak érzékenysége vérszérumra	26
6.6	Változott virulenciájú <i>Escherichia coli</i> vonalak érzékenysége vérszérumra ...	27
6.7	A baktériumok virulenciáját befolyásolja az immunrendszerre mutatott érzékenység.....	28
7	Diszkusszió	29
8	Köszönetnyilvánítás.....	32
9	Irodalomjegyzék	33

2 Rövidítésjegyzék

AC	<i>Acinetobacter baumannii</i>
ALE	adaptív laboratóriumi evolúció
AMP	antimikrobiális peptid
APR	apramicin
CEP	cefepim
CID	cefiderokol
DEL	delafloxacin
DOX	doxiciklin
EC	<i>Escherichia coli</i>
ERA	eravaciklin
FoR	Frequency of Resistance assay
GEN	gentamicin
GEP	gepotidacin
HBD-3	humán β -defenzin 3
KP	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
LL37	LL-37 katelicidin
LPS	lipopoliszacharid
MAC	membránkárosító komplex
MASP	MBL-asszociált szerin proteáz
MBL	mannóz-kötő lektin
MDR	multidrog-rezisztens
MER	meropenem
MHB2	Mueller-Hinton Broth 2 tápoldat
MIC	minimum gátlási koncentráció
MOX	moxifloxacin
MS	Minimal Salt tápoldat

OD	optikai denzitás
OMA	omadaciklin
PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PBS	foszfáttal pufferolt sóoldat
PMB	polimixin B
POL	POL-7306
SCH	SCH-79797
SEN	szenzitív
SPR	SPR-206
SUO	szulopenem
TRD	tridecaptin M152-P3
ZOL	zoliflodacin

3 Irodalmi áttekintés

3.1 Antibiotikumrezisztencia okozta kihívások, és globális hatásai

Az antibiotikumok vitathatatlanul az orvostudomány egyik legnagyobb vívmányai közé tartoznak. Ezen anyagok nagy része talajlakó baktériumokból és gombákból izolált másodlagos metabolitok. A forrásokért egymással versenyző mikroorganizmusoknak kompetíciós előnyt jelent mind az antimikrobiális anyagok termelése, mind az ellenük megszerzett rezisztencia. (Durand és mtsai., 2019)

Bár a legkézenfekvőbb felhasználási területe az antibiotikumoknak a humán gyógyászatban való terápiás alkalmazás bakteriális fertőzések ellen, ez a teljes előállított antibiotikum mennyiség felhasználásának kevesebb mint felét teszi ki. Kiemelten fontos szerepe van az antimikrobiális szerek alkalmazásának a nagyüzemi állattartásban, mint növekedésserkentők, de hatalmas mennyiségben kerülnek felhasználásra az agrárszektorban és az akvakultúrában (más néven vízművelésben) is. (Davies & Davies, 2010) A hatalmas mennyiségekben előállított és felhasznált antibiotikumok kikerülnek a környezetbe, a vízhálózaton keresztül elterjednek az ökoszisztémában, ahol komoly ökológiai problémákat okozhatnak. (Gothwal & Shashidhar, 2015)

Az antibiotikumok fontos tulajdonsága a szelektivitás, tehát úgy kell végezniük a baktériumokkal, hogy közben a gazdaszervezetben ne tegyenek kárt. Az eukarióta és prokarióta sejtek felépítésében szignifikáns különbségek vannak. Antibiotikum fejlesztés során olyan genetikailag konzervált struktúrákat vagy bioszintetikus útvonalakat kell találni, amelyek a baktériumok sajátosságai. Ezeket az egyedi célpontokat kell valamilyen biokémiai úton megzavarni, vagy működésképtelenné tenni, hogy elpusztíthassuk a patogén baktériumokat. Ilyen célpontok, amik gyakran szolgálnak antibiotikumok támadáspontjaiként, például a bakteriális sejtfal szintézis, fehérjeszintézis (riboszómák), nukleinsav szintézis, membrán integritás és különböző anyagcsere útvonalak. (Projan, 2002)

A baktériumok általában rendelkeznek egy peptidoklikán vagy más néven murein tartalmú sejtfallal. Ez a folyamatosan dinamikus változásban lévő struktúra védelmet biztosít az organizmusnak a különböző fizikai és kémia hatásokkal szemben. (Dmitriev és mtsai., 2005) Az, hogy a bakteriális sejtfal ennyire egyedi és a sejt normál működéséhez elengedhetetlen, az antimikrobiális készítmények kiváló célpontjává teszi. (T. Schneider & Sahl, 2010) Nagy eltérés van még a baktériumok riboszómái és az eukariótákban megtalálható riboszómák felépítése között. A bakteriális riboszóma 30S és 50S alegység rRNS gazdag régióin is

találhatók inhibitor kötőhelyek. (Poehlsgaard & Douthwaite, 2005) Egy másik ígéretes célpont a baktériumok sejtmembránja. A negatív töltöttségű felszín és az olyan egyedi motívumok, mint a lipopoliszacharidok (LPS) megkülönböztetik a gazdaszervezet sejtjeitől. (Erand és mtsai., 2016)

A β -laktám típusú antibiotikumok mindegyike rendelkezik egy nitrogén tartalmú β -laktám gyűrűvel, mely a baktériumok transzpeptidáz enzimjéhez köt hozzá, ezzel megzavarva a sejtfal képződését osztódás közben. Ebbe a csoportba tartoznak a penicillinek, monobaktámok, cefalosporinok és a karbapenémek. (Kong és mtsai., 2010) A makrolidok a prokariótákra jellemző 50S nagyságú nagy riboszóma alegységhez kötődnek, ezzel hátráltatva a sejt fehérjetermelését. (Retsema & Fu, 2001) A makrolidokhoz hasonlóan a tetraciklinek és az aminoglikozidok is a riboszómához kötődve befolyásolják a fehérjeszintézist. (Chopra & Roberts, 2001; Krause és mtsai., 2016) Egy másik támadható célpont a baktériumok sajátos DNS szintézisében résztvevő fehérjék gátlása. Ilyen fehérjék a DNS giráz és a topoizomeráz IV, melyeknek feladata a bakteriális DNS szerkezetének befolyásolása a replikáció során. A kinolonok ezen két fehérje működését befolyásolják, ezzel károsítva a bakteriális genomot. (Bisacchi & Manchester, 2015) A polimixinek olyan antibiotikumok, melyek a bakteriális membránra hatva pusztítják el a kórokozókat. A baktériumokra jellemző lipopoliszacharidok lipid A részéhez kötnek, így megváltoztatva a membrán permeabilitását. (Dijkmans és mtsai., 2015)

Az antibiotikumok ellen kialakult rezisztencia mögött különböző mechanizmusok állnak. A target-mediált rezisztenciák esetében az egyik bakteriális célponton történik olyan módosulás, melynek hatására az adott hatóanyag hatástalanná vagy kevésbé hatékonyá válik. Ezek általában specifikus ellenállóképességet jelentenek egy konkrét antibiotikumra vagy antibiotikum osztályra. A β -laktám vegyületek ellen a baktériumok elkezdhetnek β -laktamáz enzimet termelni, melyek képesek a nitrogént tartalmazó gyűrűt szétnyitni, ezzel együtt azt hatástalanná tenni. (Poole, 2004) Ezek ellen a rezisztens baktériumok ellen védekezhetünk kombinált terápiával, melynek során az antibiotikum mellett β -laktamáz inhibitorokat alkalmazunk. Azonban a baktériumok az inhibitorokhoz is képesek alkalmazkodni a transzpeptidáz enzim megnövekedett termelésével vagy egy megváltozott szerkezetű transzpeptidáz előállításával. (Drawz & Bonomo, 2010) A tetraciklinek elleni rezisztencia létrejöhet a riboszómális RNS gén mutációjával, vagy tetraciklin riboszómális védőfehérjék révén, melyek eltávolítják a tetraciklineket a riboszómális kötőhelyükről. (Grossman, 2016)

Szélesebb körű rezisztenciát okoz az efflux pumpák túlzott expressziója. Ezek a fehérjék képesek a sejt számára nemkívánatos anyagokat a környezetbe pumpálni aktív transzporttal. (Webber & Piddock, 2003) Ide tartoznak az ABC (ATP-binding cassette) transzporterek melyeknek működéséhez ATP hasítás biztosítja az energiát (elsődleges aktív transzport). A baktériumokban azonban a legtöbb efflux pumpa másodlagos aktív transzportot folytat, tehát a vegyületek kipumpálásával párhuzamosan ionok be-, vagy kiáramlása is végbemegy. (Van Bambeke és mtsai., 2000) Egy represszor génben történő mutáció könnyedén okozhatja ezen fehérjék túlzott kifejeződését. A pumpák nem az antibakteriális szer célpontjára hatnak közvetlenül, hanem „off-target” a sejten kívülre juttatják a baktérium számára kártékony molekulákat. A megnövekedett számú kevésbé specifikus pumpáknak többféle antibiotikum vagy más antibakteriális vegyület is lehet szubsztrátja, tehát egy adott antibiotikumnak való kitettség is okozhat multidrog-rezisztenciát. (Webber & Piddock, 2003) Egy kiváló példa erre, hogy egy gyakori biocidhoz, a triklozánhoz adaptált *Pseudomonas aeruginosa* törzsekben a megnövekedett efflux pumpa kifejeződés rezisztenciát eredményezett több különböző antibiotikumra is. (Chuanchuen és mtsai., 2001)

A különféle hatásmechanizmusú antibiotikumoknak való kitettség hatására olyan törzsek jelennek meg, melyek több antibakteriális anyagra nézve is rezisztensek. Multidrog-rezisztenciáról (MDR) beszélünk, amikor az adott baktérium legalább 3 különböző kategóriájú antibiotikumra rezisztens. Gyakran hallhatjuk még az extenzív gyógyszer rezisztencia (XDR) és a pánrezisztencia (PDR) kifejezéseket. Előbbi, definíció szerint, olyan baktériumokra utal, melyek egy vagy két csoporton kívül minden antibiotikum osztályból legalább egy hatóanyagra rezisztensek. A pánrezisztens baktériumok az összes antibiotikum osztály összes hatóanyagának ellenállnak. (Magiorakos és mtsai., 2012)

A klinikumban hatalmas problémát okoznak az egyre többféle rezisztenciát felhalmozó baktériumok. Jelentős veszélyforrást jelentenek például a meticillin-rezisztens *Staphylococcus aureus* (MRSA), a karbapenem-rezisztens *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *E. coli* és a *Pseudomonas aeruginosa* okozta bakteriális fertőzések is a multidrog-rezisztenciának hála. Többek között ezen felsorolt kórokozók is szerepelnek a WHO által 2024-ben frissített elsőbbséget élvező bakteriális kórokozók listáján. Erre a listára azon multidrog-rezisztens baktériumok kerültek fel kritikus prioritásúként, amelyek a legnagyobb veszélyt jelentik az egészségügyben, magas halálozási aránnyal rendelkeznek, és jelenleg nem, vagy csak nagyon kevés gyógyszer van ellenük fejlesztésben. (*WHO Bacterial Priority Pathogens List 2024*, 2024)

3.2 Az antibiotikumrezisztencia genetikai mechanizmusai és terjedése

Kétféleképpen alakulhat ki rezisztencia egy adott antibiotikumra: vertikális evolúcióval és horizontális géntranszferrel. Vertikális evolúció során történik egy random mutáció mely szelekciós nyomás hatására elterjed a populációban. Horizontális géntranszferről akkor beszélünk, amikor baktériumok között genetikai információ átadása történik. Ennek hátterében állhat plazmid átadás konjugációval, transzformáció, vagy transzdukciónak vírus vektorral. (Sommer és mtsai., 2017) Gyógyszerfejlesztés során a horizontális génátadás okozta rezisztencia vizsgálatát elhanyagolják, ugyanakkor kutatások bizonyították, hogy igen jelentős mértékben hozzájárul a klinikumban jelentkező rezisztens törzsek kialakulásához. (Gilmore és mtsai., 2013)

A plazmidok, mint önreplikálódó extrakromoszómális genetikai elemek, a bakteriális genom szerves részét képezik. Ezeken a cirkuláris duplaszálú genetikai elemeken fel tudnak halmozódni különböző rezisztencia gének, melyek így együtt adódhatnak át akár különböző fajok között is. (Sun és mtsai., 2019) A rezisztencia géneken kívül ezek a plazmidok kódolhatnak olyan virulenciafaktorokat is, mint például citotoxinok vagy adhéziós faktorok. (Carattoli, 2011) Plazmidok az egyik fő közvetítői olyan rezisztencia géneknek, mint a karbapenémek ellen kialakuló rezisztenciát okozó blaKPC gén vagy az mcr-1, mely kolisztin rezisztenciát okoz. Az előbb említett mindkét antibiotikumot utolsó lehetőségként alkalmazzák bakteriális fertőzések során, de a hatásosságuk egyre csökken, ahogy az ellenük kialakult rezisztencia terjedése tovább folytatódik. (Huang és mtsai., 2018; Skov & Monnet, 2016)

Az antibiotikumrezisztencia evolúcióját szintén befolyásolja a keresztrezisztencia és járulékos érzékenység. Keresztrezisztencia kialakulása során egy adott antibakteriális szerre kialakult rezisztencia mutáció más antibiotikumokkal szemben is csökkenti a baktérium érzékenységét. Ennek hála az adott patogén, ha alacsonyabb koncentrációk mellett is, képes lesz túlélni több antibiotikum jelenlétében is, sőt nagyobb sikerrel szerezhet fokozottabb rezisztenciát ellenük a jövőben. Járulékos érzékenységről akkor beszélünk, amikor adott antibiotikummal szemben kialakult rezisztencia összefüggésbe hozható egy másik antibiotikumra mutatott növekedett érzékenységgel. Ennek a két gyakori jelenségnek hatalmas szerepe van a rezisztenciák terjedésének befolyásolásában, így megértésük elengedhetetlen a felelősségteljesebb antibiotikum kezelési stratégiák és az új hatóanyagok kifejlesztéséhez. (Sommer és mtsai., 2017)

3.3 A fejlesztés alatt álló antibiotikumok kihívásai és jövőbeli lehetőségei

A huszadik század első felében sorra fedezték fel a különböző antibiotikumokat, míg ez a lendület az 1960-as évekre alábbhagyott. Az új hatóanyagok izolálása egyre nehezebb és költségesebb, miközben a baktériumok növekvő ütemben adaptálódnak a meglévő arzenálunkhoz. (Lewis, 2020) A fejlesztés alatt álló antibiotikumokra rendkívül hamar megjelenhet a rezisztencia, és már a természetben is jelen lehetnek az ezekért felelős gének. (Durand és mtsai., 2019)

Mivel az antibiotikum fejlesztés rettentő költséges és a rezisztencia akár pár éven belül megjelenhet ellene, a nagy gyógyszergyártó cégeknek nem éri meg az új hatóanyagok fejlesztése. Az ígéretes molekulák csupán töredéke jut el a preklinikai fázistól a klinikai alkalmazásig. Érthető tehát, hogy az antibiotikumok fejlesztése túl nagy pénzügyi kockázatot jelent az ipar számára. (Projan, 2003)

Az egyre elterjedtebb rezisztens törzsek miatt rendkívül fontos az új antibiotikumok fejlesztése, melyek hatásosak lehetnek a rezisztens és multidrog-rezisztens bakteriális fertőzésekkel szemben. A nemrég forgalomba hozott, vagy jelenleg klinikai tesztek alatt álló hatóanyagoknak valamilyen módon meg kell kerülniük az elterjedt rezisztenciák mögötti mechanizmusokat, vagy új támadható célpontokat kell gátolniuk.

A 2017 és 2021 között megjelent antibiotikumok több mint 80%-a már használatban lévő antibiotikum osztályokba tartozik, vagy azok módosított változatai. Ezen hatóanyagok nagy része nem hatásos olyan kiemelten veszélyes rezisztens baktériumtörzsek ellen, mint a karbapeném rezisztens *Acinetobacter baumannii* (CRAB) és *Pseudomonas aeruginosa* (CRPA). A jelenleg 27 klinikai fázisban lévő antibiotikum közül 12 β -laktám típusú molekula és β -laktamáz inhibitor kombinált alkalmazásán alapszik. Nagyon kevés az olyan fejlesztés alatt álló hatóanyag, melyekkel az egyre gyakoribb multidrog-rezisztens baktériumok okozta fertőzéseket lehetne kezelni. Ha az antibiotikum fejlesztés továbbra is követni fogja ezeket a trendeket, akkor az antibiotikumrezisztencia krízis csak súlyosbodni fog a jövőben. (2021 *Antibacterial Agents in Clinical and Preclinical Development*, é. n.)

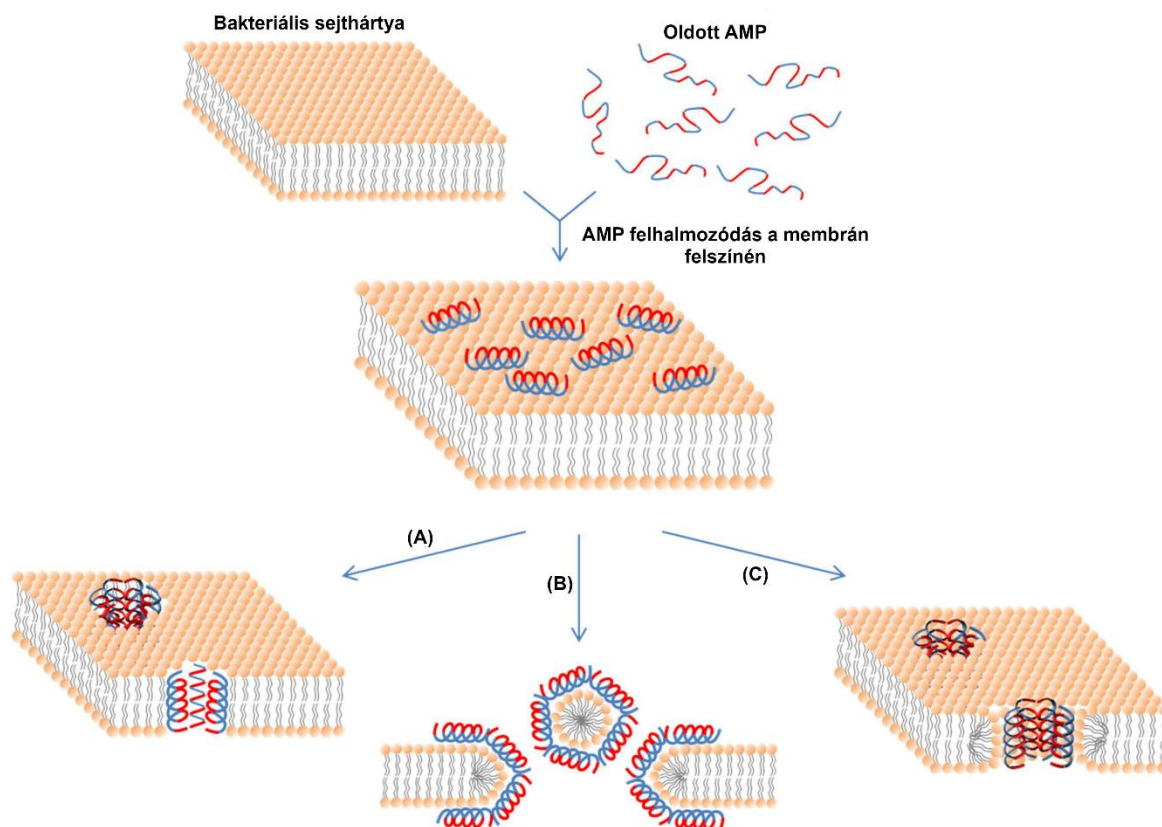
Az egyik fejlesztés alatt álló antibiotikum az omadaciklin, ami egy félszintetikus tetraciklin vegyület, mely olyan kémiai módosításokkal rendelkezik, amelyek képessé teszik a riboszómális védőféhérjék és a tetraciklin-specifikus efflux pumpák legyőzésére. (Karlowsky és mtsai., 2019) 2018-ban engedélyezték a szintén tetraciklinekből származtatható eravaciklin intravénásan alkalmazható antibiotikumot. (Zhanel és mtsai., 2016) Ezt a molekulát már a

glicilciklinek közé sorolják, melyek fejlesztésénél a tetraciklinek ellen már elterjedt rezisztencia mechanizmusok leküzdése volt a cél. (Noskin, 2005) Egy ígéretes csoportot képviselnek az új generációs membrántargetáló antibiotikumok. Ide tartozik a POL-7306 preklinikai fázisban lévő, Gram-negatív baktériumok ellen fejlesztett széles spektrumú peptidomimetikus molekula. A hatóanyag tartalmaz egy polimixin részt és egy hozzá csatolt β -hajtűt. A bakteriális membránon található lipopoliszacharidokhoz, és a fehérjéket a külső membránba ágyazó BAM komplex egyik alegységéhez köt. (Sader és mtsai., 2020) Az SCH-79797 nevet viselő antibiotikumnak a bakteriális membránon kívül van egy intracelluláris célpontja is, a folsav bioszintézis. Ennek a kettős hatásmechanizmusnak hála nagy sikerrel képes elpusztítani a Meticillin-rezisztens *Staphylococcus aureus* törzseket is. (Martin és mtsai., 2020) Szintén a membránt célozza az SPR-206 nevű polimixin-B származék, amelynek jelenleg az I. fázisú klinikai tesztjei folynak. (Zhang és mtsai., 2020)

3.4 Antimikrobiális peptidek, mint potenciális antibiotikumok

Az antimikrobiális peptidek, vagy röviden AMP-k, a veleszületett immunrendszer rövid, általában kationos polipeptidjei. Az élővilágban rendkívül elterjedtek. Megtalálhatóak állatokban, növényekben, gombákban és prokariótákban is. Nem csak bakteriális, de virális és gombás fertőzések elleni immunválaszban is részt vesznek. Pozitív töltésüknek és amfipatikus tulajdonságuknak hála képesek elektrosztatikusan megkötődni a baktériumok negatív töltésű membránján és megnövelni annak áteresztőképességét. (Nguyen és mtsai., 2011)

Ha az AMP koncentráció elég magas szintet ér el, megindul a pórus képződés. A „hordódonga” modell szerint az egyes peptidek egymás mellé rendeződnek a lipid rétegben úgy, hogy hidrofób részük a kettős hártya felé néz, a hidrofil rész pedig közrefogja a pórust. A „szőnyeg” modellnél a membrán felszínével párhuzamosan terülnek el az AMP-k. Megfelelő koncentrációnál a membrán egyes darabjai micellát képezve kilépnek a sejthártyából. A harmadik modell a „tőrusz-pórus” modell, mely szerint az aggregálódó peptidek visszahajtják a membránt alkotó lipideket. A pórust az AMP-k és a foszfolipidek hidrofil feje határolja. (1. ábra) A membránon kívül gátolhatják még a sejt felszín szintézist, de intracelluláris célpontokat is támadhatnak, gátolva a fehérje-, illetve a nukleinsav-szintézist. Az AMP-k antibakteriális hatásának sikerét növeli, hogy képesek egyszerre több célpontjukat is támadni egy adott sejten, legyen az a membrán vagy egy intracelluláris célpont. (Le és mtsai., 2017)



1. ábra Antimikrobiális peptidek hatásmechanizmusai. (Bahar & Ren, 2013) Az AMP-k felhalmozódnak a sejthártyán, majd megindul a pórusképződés. **(A)** hordódonga modell, **(B)** szőnyeg modell, **(C)** törusz-pórus modell. Az AMP-k hidrofíli részzeit piros, a hidrofób részeket kék színnel jelölték.

Az antibiotikum rezisztencia elleni harcban az előzőleg felsorolt tulajdonságaik miatt ígéretes lehet az AMP-k alkalmazása. Fontos azonban kiemelni a hátrányait is. Hatásuk nagyban függ a környezeti körülményektől. Figyelembe kell venni a közeg pH-ját, az oldott ionokat és az egyéb fehérjéket, hiszen ezek mind befolyásolhatják az AMP-k hatásosságát. A másik nagy problémát a molekulák gyors degradációja jelenti. Ezek a peptidek könnyen lebomlanak a szervezet különböző enzimeinek hatására. Ezen hátrányok különböző kémiai módosításokkal kiküszöbölhetők. (Falanga és mtsai., 2016)

Az AMP-k további vizsgálata és működésük megértése figyelemre méltó eredményekhez vezethet új antibakteriális szerek kifejlesztésében. Több antimikrobiális peptid is van preklinikai vagy klinikai fázisban, mint például a humán eredetű LL-37. (Koo & Seo, 2019) A fertőző betegségek leküzdésén túl olyan betegségek kezelésére is alkalmasak lehetnek, mint a rák, vagy a cukorbetegség. (Divyashree és mtsai., 2020)

Az AMPk-kel szemben kialakuló rezisztencia kevésbé ismert. Általában nehezebben alakul ki ellenük rezisztencia, mint a legtöbb antibiotikum ellen, feltételezhetően a több célpont miatt. Azonban ennek mértéke erősen függ az adott AMP tulajdonságaitól. (Spohn és mtsai., 2019) A kolisztin, vagy más néven polimixin E egy olyan peptid antibiotikum, melyet a legvégső esetben használnak tüdőgyulladásos betegeknél. Kolistinre rezisztens *Acinetobacter baumannii* klinikai izolátumokban figyelték meg, hogy a kolisztin mellett humán AMP-kre, például LL-37-re is csökkent a törzsek érzékenysége. (Napier és mtsai., 2013) Az AMP-k széleskörű alkalmazásának hatására elterjedhetnek olyan rezisztens patogén baktériumok, melyek érzékenysége a humán immunrendszer antimikrobiális peptidjeire is csökkenhet keresztrezisztencia révén, ha azok hatásmechanizmusa nagyon hasonló. (Kintsés és mtsai., 2019)

3.5 Az antibiotikumrezisztencia költsége és hatása a bakteriális populációkra

Mivel a rezisztenciát okozó mutációk jól konzervált, fontos funkciókat érintenek, így a rezisztens baktériumoknak ez valamilyen formában általában növekedési hátrányt jelent a vad típushoz képest. Egy megváltozott fehérje nem tudja ugyanakkora sikerrel elvégezni a feladatát, mint az eredeti. Ha túl nagy költsége van egy rezisztenciának, akkor nem tud fennmaradni a populációban. (Andersson & Hughes, 2010) Ez alapján antibiotikum használat hiányában a rátermettebb érzékeny törzsek terjednének el a rezisztens törzsek rovására. Azonban előfordulhat, hogy antibiotikummentes környezetben is jelen maradnak a rezisztens egyedek a populációban, sőt gyakoribbá is válhatnak. (Melnik és mtsai., 2015)

A vad típusú és a rezisztens baktériumoknak össze kell hasonlítani azon tulajdonságát, hogy különböző antibiotikummentes közegekben hogyan tudnak nőni, így információt szerezhetünk a relatív fitnessükről. Ha egy rezisztenciát okozó mutáció túl nagy fitness költséggel jár, akkor valószínűleg nem fog tudni elterjedni. De ugyanez a gén társulhat egy másik mutációval, ami képes ellensúlyozni a rezisztencia fenotípusos költségét. *Salmonella typhimurium* baktériumban a plazmid hordozta AmpC típusú β -laktamáz kódoló gén jelenléte számottevő fertőzőképesség és növekedőképesség csökkenést okoz. Ha ezen gén mellett az ampR regulátor gén is jelen van, akkor a rezisztencia indukálhatósága csökkenti a fitness költséget. (Andersson & Hughes, 2010)

A másik fontos tulajdonsága a baktériumoknak a virulenciájuk, tehát annak a mértéke, hogy mennyire csökkentik a gazdaszervezet fitnessét, milyen mértékben betegítik meg azt. Ezt különböző virulenciafaktorok (VF) befolyásolják. Ezek a faktorok segítenek a baktériumoknak

bejutni a gazdaszervezetbe és ott túlélni, hogy aztán sikerrel kolonizálhassák azt. (Chen és mtsai., 2005)

Virulenciafaktorok lehetnek különböző membrán asszociált struktúrák, amelyek segítik a bakteriális adhéziót és a biofilm képzést. Erre jó példa az *E. coli* 1-es típusú, P- és S-fimbriái, melyek a gazda sejtjein jelen lévő manno-oligoszacharidokat ismerik fel. (Emődy és mtsai., 2003) Az említett biofilm egy baktériumok által a környezetükbe juttatott anyagok segítségével létrejövő helyhez kötött közösség, melyben többféle mikroorganizmus is élhet. A biofilm kialakulásához szükség van többféle szekréciós faktorra, melyek szintén lehetnek virulenciafaktorok. Ezek a sejt által szekretált anyagok segíthetnek a megtapadásban vagy az erőforrások sikeresebb kiaknázásában. Utóbbira példák a sziderofórok. Az emberi szervezet a baktériumok számára vasszegény környezetet jelent. A sziderofórok nagy affinitással rendelkeznek a Fe^{3+} -ionok felé, együtt kelátot képeznek. Ezeket a vaskelátokat a baktériumok már fel tudják venni. (Saha és mtsai., 2013) Ilyen sziderofór például a *Pseudomonas aeruginosa* által termelt floureszcens pioverdin, vagy az enterobactin, melyet többek között *Escherichia coli* és *Klebsiella pneumoniae* is képes előállítani. (Kang és mtsai., 2019; Zhu és mtsai., 2021) Fontos virulencia faktor Gram-negatív baktériumoknál az LPS. Ezen molekula hidrofób lipid A része sokféle módosításon áteshet, a baktérium genomjától függően. A mutációk egy részét kapcsolatba hozták virulencia növekedéssel is. (Needham & Trent, 2013)

3.6 Antibakteriális immunválaszok

A patogén baktériumok, mint más kórokozók is, környezetünkben mindenhol megtalálhatóak. Ott vannak a bőrünkön, emésztőrendszerünkben, együtt élnek a szervezet számára hasznos vagy megtűrt mikroorganizmusokkal. Az emberbe jutva hatalmas károkat képesek okozni, és tekintve, hogy mindenhol jelen vannak, komoly kihívást jelentenek a szervezet számára. Az immunrendszer a szervezet saját komplex, több egymással együttműködő egységből felépülő védelmi rendszere. Óvja a szervezet saját sejtjeit és szöveteit az idegen anyagoktól, kórokozóktól és a rák kialakulásától. Két fő része a veleszületett és az adaptív immunrendszer. Ezek egymástól nem elkülönülő egységek, hanem egymással folyamatosan kommunikálnak és együttműködnek. (Parkin & Cohen, 2001)

3.7 A veleszületett immunrendszer válasza a bakteriális fertőzésre

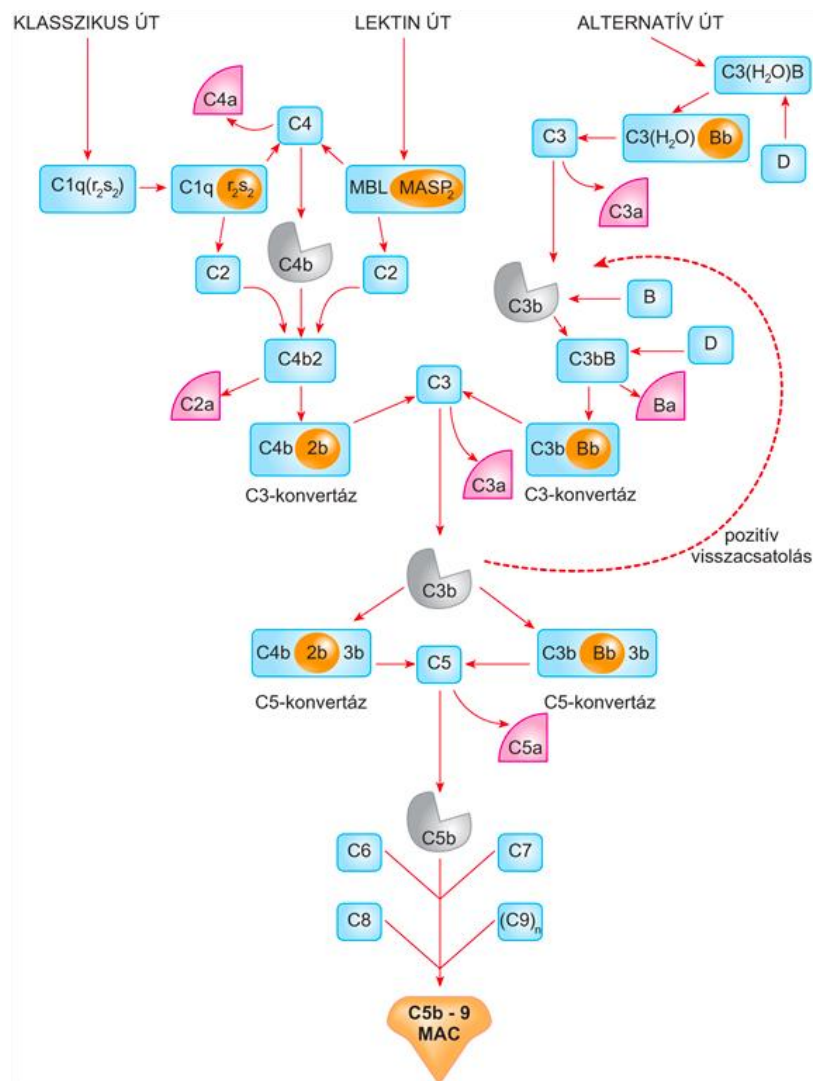
Ha egy baktérium bejut a szervezetbe az első védelmi vonalat jelentő valamelyik hámszöveten keresztül, először a gyorsan aktiválódó veleszületett immunválasz veszi fel vele a harcot. Mivel a specifikus immunválaszra több napot kell várni, így a veleszületett immunitás univerzálisabb védekező mechanizmusai rendkívül fontosak a fertőzés kezdeti szakaszaiban.

(Medzhitov & Janeway, 2000) A fertőzés helyszínén a makrofág sejtek receptorai (integrinek, Toll-szerű receptorok, scavenger receptorok) felismerik a baktériumokra jellemző antigéneket. Olyan molekulák tartoznak ide, mint a sejtfalat felépítő peptidoglikán, a flagellumokat alkotó flagellinek, vagy Gram-negatív baktériumok esetében a lipopoliszacharidok, Gram-pozitívoknál pedig a teichonsavak. Felismerés után a makrofágok elkezdik bekebelezni a kórokozókat. (Plüddemann és mtsai., 2006) A makrofágok által felszabadított citokin jelmolekulák odavonzzák a veleszületett immunrendszer további sejtjes elemeit. Központi szerepet játszanak az ilyenkor aktiválódó neutrofil granulociták. Ezek a könnyen mozgósítható sejtek nagy számban érkeznek, hogy felvegyék a harcot a patogén baktériumokkal. A neutrofilek bekebelezik a megfelelő felszíni molekulákkal rendelkező kórokozókat, majd intracellulárisan enzimek és oxidatív szabad gyökök segítségével megemésztik azokat. (Parkin & Cohen, 2001) A kezdeti gyors immunválaszban részt vesznek még olyan sejtek, mint az eosinophilok, a hízósejtek és az NK sejtek (natural killer cells), melyek citotoksikus és gyulladásfokozó anyagokat bocsátanak ki az intracelluláris térbe. (Turvey & Broide, 2010)

A veleszületett immunrendszer rendelkezik nem-sejtjes elemekkel is. Ide tartoznak az általunk vizsgált komplement rendszer, és a különböző antimikrobiális peptidek.

3.8 Komplement rendszer szerepe a baktériumokkal szembeni védekezésben

A komplement rendszer a veleszületett immunrendszer egyik fontos része, de az adaptív immunrendszer folyamataiban is részt vesz. Szerepe van a patogén baktériumok kiiktatásában, az apoptotikus sejtek eltávolításában és az opszonizációban, tehát a kórokozók antitestekkel történő megjelölésében a fagocitózishoz. (Merle, Noe, és mtsai., 2015) Működéséhez több mint 30 fehérje szükséges, melyek különböző aktivációs útvonalakon fejtik ki hatásukat a vérben. Az aktivációs kaszkád fehérjéinek nagy része zimogén (inaktív enzim prekursor) formában van jelen. Ebben az összetett kapcsolatrendszerben három kaszkád különül el, melyek a klasszikus útvonal (Classical pathway, CP), a lektin útvonal (Lectin pathway, LP) és az alternatív útvonal (Alternative pathway, AP). (Sarma & Ward, 2011)



2. ábra A komplement rendszer komponensei és az aktivációs útvonalak. (Erdei Anna - Sármai Gabriella - Prechl József (szerkesztők), *é. n.*) A különböző komponensek három különböző útvonalon képesek megindítani a rendszer aktivációját. Mind a három útvonal a C3 komponens hasítását eredményezi, létrehozva a C5 konvertázt. A kaskádfolyamat végén a MAC okozza a bakteriális membrán egységének megbontását.

Ez az úgynevezett „klasszikus útvonal” a szervezetben akkor játszódik le, amikor a kórokozók felszínén lévő antigénekhez kötött antitestek (IgG vagy IgM) kölcsönhatásba lépnek a C1q komponenssel, amely egy sor biokémiai reakciót indít el. A C1q emellett képes felismerni és kötődni más ligandumokhoz is, mint a C-reaktív fehérjéhez, a szérum amiloid P-hez és a pentraxin 3-hoz, amelyek apoptotikus vagy mikrobiális sejteken vannak jelen. Ez a kötődés aktiválja a C1r és C1s szerinproteázokat, amelyek ezt követően a C4 és C2 komplementfehérjéket hasítják a C3 konvertáz komplex (C4bC2a) kialakításához. Ez a konvertáz döntő szerepet játszik a C3-nak C3a-ra és C3b-re történő hasításában, ami viszont további komplementaktivációhoz és a kórokozó opszonizációjához vezet. (Merle, Church, és mtsai., 2015; Sarma & Ward, 2011)

A lektin útvonal aktivációjának első lépése a mannóz-kötő lektin (MBL) vagy a fikolinok a kórokozók (köztük élesztők, baktériumok, paraziták és vírusok) felszínén lévő specifikus szénhidrátstruktúrákhoz történő kötődése. Ezek a fehérjék a szérumban található MBL-asszociált szerin proteázokkal (MASP-k) alkotnak komplexeket. Az MBL-hez kötődik a MASP1 és a MASP2, mely aktiváció után már képes hasítani a C4-et és a C2-t, ezzel ugyanazt a C3-konvertázt (C4bC2a) képezve, mint a klasszikus útvonalban. (Sarma & Ward, 2011)

A klasszikus és a lektin útvonallal ellentétben, amelyeket konkrét ligandok aktiválnak, az alternatív útvonal mindig alacsony aktivitási szinten van. Ez az alacsony szint azonban a kórokozók különböző felszíni struktúráinak jelenlétében fokozódik. A szérumban a C3 faktor kismértékben folyamatosan hidrolizálódik C3b faktorrá a „tick-over” néven ismert folyamat során. A C3b, B és D faktorok együttesen hozzák létre a C3bBb komplexet, amely szintén egy C3 konvertáz. A folyamatban kiemelt szerepe van a vészérumban található properdin glikoproteinek. Ez a fehérje stabilizálja a C3bBb komplexet és köt a kórokozó felszínéhez. (Sarma & Ward, 2011)

Mindhárom útvonal a C3 komponenshez fut össze. Ebből C5 konvertáz enzimek képződnek, melyek a C5 hasításáért felelősek. Az így keletkező C5b fehérje 4 másik komponens (C6, C7, C8, C9) segítségével létrehozza a MAC komplexet (membrane attack complex). Ez a kórokozó felszínén egy csatornaként szerelődik össze, és így a sejt lízisét okozza. (Sarma & Ward, 2011)

3.9 A humán immunrendszer antimikrobiális peptidjei.

A humán antimikrobiális peptidek a veleszületett immunitás egyik legelső védelmi vonala. Többféle sejt képes ezen molekulákat előállítani, majd szekretálni rendszerint a bőrre vagy különböző nyálkahártyákra. Egyik nagy csoportjuk, a defenzinek, három további kategóriára osztható: a főleg vékonybélben jelen lévő α -defenzinek (például HNP1 - HNP4), a β -defenzinek, melyek a légutak, az emésztőrendszer és a bőr védelméért felelősek, és a θ -defenzinek, de ez utóbbi termelése az emberi szervezetben nem jellemző. (Lehrer, 2004)

Az emberben legjobban leírt 4 β -defenzin a HBD-1 – HBD-4. Ezen peptidek antimikrobiális hatást mutatnak gram-negatív baktériumokkal szemben. A HBD-3 ezen felül aktivitást mutat Gram-pozitív multidrog-rezisztens baktériumokkal szemben is. (J. J. Schneider és mtsai., 2005) Az antimikrobiális peptidek nem csak közvetlenül hatnak a kórokozóra, hanem fontos immunregulációs hatással is rendelkeznek. A GKY25 peptid például baktericid tulajdonságain túl gátolja a lipopoliszacharid indukálta proinflammatorikus reakciókat, ezzel védve a szervezetet a túlzott immunreakció okozta szöveti károsodástól. (Hansen és mtsai., 2015)

Az emberi szervezetben jelen lévő AMP-ket is felhasználják gyógyszerfejlesztés szempontjából. HBD-1 és egy humanizált θ -defenzinből származtatott mesterséges hatóanyag a HBtD-1, ami kevésbé érzékeny a magas sókoncentrációra, és igen ígéretes jelöltnek tűnik. (Olli és mtsai., 2014) Egy másik ígéretes molekula a már korábban említett humán eredetű LL-37. Ez a peptid az antimikrobiális peptidek másik nagy csoportjába, a katelicidinek közé tartozik. Más katelicidinekhez hasonlóan az LL-37 is proprotein, ebben az esetben hCAP-18 formájában raktározódik a sejtekben. Aktivációjához szerin proteázok kellenek, melyek hasítják a proproteint. (Burton & Steel, 2009)

4 Célkitűzések

A rezisztencia terjedése egy rendkívül komplex probléma, amelynek részleteit átfogóan kell tanulmányozni. Daruka és munkatársai azt vizsgálták, hogyan és milyen ütemben alakulhat ki rezisztencia frissen forgalomba hozott vagy még fejlesztés alatt álló antibiotikumokra. Munkájuk során arra a következtetésre jutottak, hogy mivel ezek az antibiotikumok már régóta használt hatóanyagokkal azonos célpontokat támadnak, így környezetünkben már jelen vannak ezen szerek ellen a rezisztenciát okozó gének. Az új antibiotikumoknak ellenálló patogének tehát hamar képesek lesznek elterjedni. (Daruka és mtsai., 2023)

További, még folyamatban lévő munkájukban megvizsgálták azt is, hogy az így megjelenő rezisztencia mutációk hogyan változtatják meg a különböző patogén baktériumfajok fitneszt és virulenciáját. Ahogy a korábbiakban kiemelttem, az adott mutáció fitneszköltsége nagyban befolyásolja, hogy a jövőben képes lesz-e elterjedni. A virulencia változást *Galleria mellonella* lárva modellben vizsgálták, melyben a rezisztens törzsek közel 10 százaléknál szignifikánsan megemelkedett virulenciát figyeltek meg a vad típushoz képest. A virulencianövekedés főleg az új generációs membráncélzó antibiotikumokhoz alkalmazkodott *Klebsiella pneumoniae* törzsek esetében volt jellemző. Ezen vonalak mutációi ráadásul többnyire elhanyagolható fitnesz költséget jelentettek a baktériumok számára. (Ezen kutatási eredmények közzlése folyamatban van.)

Az antibiotikumrezisztens baktériumok tehát nem csak azért jelentenek veszélyt egészségünkre, mert a jól bevált kezelésekkel szemben védettek, hanem bizonyos esetekben még magasabb virulenciával is rendelkezhetnek az érzékeny törzsekhez képest.

Munkám során arra voltam kíváncsi, hogy ezen megváltozott virulenciájú vonalaknak változott-e az érzékenységük az emberi immunrendszer nem-sejtes komponenseivel, azaz az emberi antimikrobiális peptidekkel és a komplement rendszerrel szemben. Ennek vizsgálatára az alábbi kísérleteket végeztem el:

33 növekedett és 34 csökkent virulenciájú baktériumvonal érzékenységét vizsgáltam 4 humán eredetű antimikrobiális peptidre nézve. Ehhez az egyes vonalak adott AMP-re mutatott minimális gátló koncentráció (minimal inhibitory concentration, MIC) értékeit mértem meg, és hasonlítottam össze a vad típusú baktériumokéval. A második kísérlet során aktív és inaktívált humán vérszérum hatásait vizsgáltam 25 csökkent és 25 emelkedett virulenciájú vonalon, hogy kiderítsem, változott-e az érzékenysége ezeknek a vonalaknak a komplement rendszerrel szemben.

5 Anyagok és módszerek

5.1 Felhasznált baktérium törzsek és vonalak:

A kísérleteim során klinikai szempontból releváns, Gram-negatív patogén baktériumtörzsekből származtatott, különböző antibiotikumokhoz adaptált vonalakkal dolgoztam. A 6 eredeti törzs szolgált vad típusként a mérések során. (1. táblázat)

Törzs	ATCC szám	Törzs rövid ismertetése
<i>Escherichia coli</i> Seattle 1946 törzs	ATCC 25922	Jól leírt, irodalomban gyakran használt <i>E. coli</i> törzs.
<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> PCI 602	ATCC 10031	Fertőző bakteriális betegségek vizsgálatában gyakran alkalmazott törzs.
<i>Klebsiella quasipneumoniae</i> K6	ATCC 700603	Vizeletből izolált, SHV-18 β -laktamázt termelő törzs.
<i>Acinetobacter baumannii</i> 5377	ATCC 17978	Négy hónapos ember agyhártyagyulladásának halálos kimenetelű esetéből izolált törzs.
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC BAA-1605	ATCC BAA-1605	Köpetből izolált multidrog-rezisztens törzs.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC BAA-3107	ATCC BAA-3107	Jól leírt, antibiotikumrezisztens klinikai izolátum.

1. táblázat Az adaptált vonalak őseül szolgáló baktériumtörzsek. A kísérletek során vizsgált vonalak az itt látható 6 törzsből lettek előállítva adaptív laboratóriumi evolúció (ALE) és rezisztencia gyakorisági vizsgálat (frequency-of-resistance analysis, FoR assay) segítségével. A mérések során ez a 6 törzs szolgált a vad típusként.

Az általam vizsgált vonalakat adaptív laboratóriumi evolúcióval (ALE) és rezisztencia gyakorisági vizsgálattal (frequency-of-resistance analysis, FoR assay) adaptálták különböző régóta használatban lévő, nemrég forgalomba hozott és még fejlesztés alatt álló antibiotikumokhoz. A vonalak teljes genom szekvenálásnak lettek alávetve, így a bekövetkezett mutációk összevethetők a vad típus genomjával.

5.2 A kísérletekben felhasznált tápoldatok:

A baktériumok felneveléséhez használt kation-korrigált Mueller-Hinton Broth 2 tápoldat összetétele: 17,5 g/L savas kazein-hidrolizátum, 3 g/L marhahúskivonat, 1,5 g/L keményítő. Ezt előre bekeverten szereztük be a gyártótól (Merck Millipore).

Az MIC méréshez kiegészített Minimal Salt (MS) médiumot használtunk. Ennek összetétele: 0,2% glükóz, 0,2% kazamínosav, 1 µg/mL tiamin, 0,54 µg/mL FeCl₃, 0,1 mM MgSO₄, 7 g/L K₂HPO₄, 3 g/L KH₂PO₄, és 1 g/L (NH₄)₂SO₄.

A vérszérum rezisztencia mérések során AB típusú, férfiatól származó humán vérszérumot alkalmaztunk, melyet a Sigma-Aldrich vállalattól szereztünk be.

A sejtek mosásához foszfáttal pufferolt sóoldatot használtunk (PBS).

5.3 Minimális gátlási koncentráció meghatározás

AMP	forrás	AMP rövid leírása
Polimixin B	baktérium	Klinikumban régóta használt, utolsó lehetőségként alkalmazott antibiotikum.
HBD-3	humán	Humán β-defenzin 3.
GKY25	humán	Trombin eredetű humán antimikrobiális peptid.
HBtD-1	félszintetikus	Humán eredetű β-defenzinből és humanizált θ-defenzinből származtatható antimikrobiális peptid.
LL-37	humán	Humán katelicidin.

2. táblázat A kísérletek elvégzéséhez felhasznált antimikrobiális peptidek. A kísérletek során 4 humán AMP-re nézve vizsgáltuk meg a baktériumok érzékenységét. Ezek közül két α-helikális felépítésű (GKY25, LL-37) és két β-defenzin (HBD-3, HBtD) peptidet találunk. A mérések során csak a peptidek direkt antibakteriális hatását vizsgáltuk, a különböző immunmoduláló hatásaikat nem. A 4 humán AMP-n kívül kontrollként megmértük a vonalak érzékenységét polimixin B peptid alapú antibiotikumra nézve is.

Az MIC (minimális gátló koncentráció) megállapítására egy standard folyadékhígításos eljárást alkalmaztunk. (Wiegand és mtsai., 2008) A kísérlet során felhasznált AMP-eket a Proteogenix cég szintetizálta. Hamilton Star Workstation robotizált folyadékkezelő segítségével 11 lépéses hígítási sorokat készítettünk az AMP-kből kiegészített MS médiumot tartalmazó 384 lyukú lemezekre. Egy lyuk 60 µl tápot tartalmazott. A legnagyobb AMP

koncentráció 256 µg/ml volt, ez lépésenként feleződött. A lemezek legelső oszlopa növekedési kontrollként szolgált, ebbe AMP nem került.

A baktériumtenyészetek felnevesztése MHB 2 tápoldatban történt két replikátumban 37 °C-on 18 órán keresztül folyamatos rázás (300RPM) mellett. A baktériumokat megfelelő koncentrációra hígítottuk lyukanként 100 µl kiegészített MS médiumot tartalmazó 96 lyukú lemezekbe. Ezekből a lemezekből végül egy Gilson Platemaster segítségével oltottunk át az automata folyadékkezelő által előkészített hígítási sorokra, lyukanként 2 µl térfogatnyit, így a baktériumok végső koncentrációja 5×10^5 sejt/ml lett.

A lemezeket 18 órán keresztül inkubáltuk 37 °C-on folyamatos rázás mellett 900 RPM-en. Az inkubáció után egy Biotek Synergy microplate reader segítségével mértük meg a sejtek mennyiségét (OD600 értékek). Azt a koncentrációt vettük MIC-nek ahol a háttér kivonása után az OD érték nem érte el a növekedési kontroll 10%-át.

5.4 Vérsérum-rezisztencia mérés

A vérsérum-rezisztencia méréseket az ATCC 25922 *Escherichia coli* és az ATCC 10031 *Klebsiella pneumoniae* törzsekből adaptált emelkedett és csökkent virulenciájú vonalakon végeztük el. Mivel a két faj szérumra mutatott érzékenysége nagymértékben eltér, ezért különböző koncentrációjú vérsérum kezeléssel és különböző inokulummérettel dolgoztunk mindkét esetben. Az előzetes mérések során megállapítottak alapján *E. coli* vonalából 10^5 CFU/ml inokulumot oltottunk le 100 térfogatszázalékos szérumba. *K. pneumoniae* vonalak esetében 10^7 CFU/ml inokulummérettel és 6 térfogatszázalékos szérumkoncentrációval dolgoztunk.

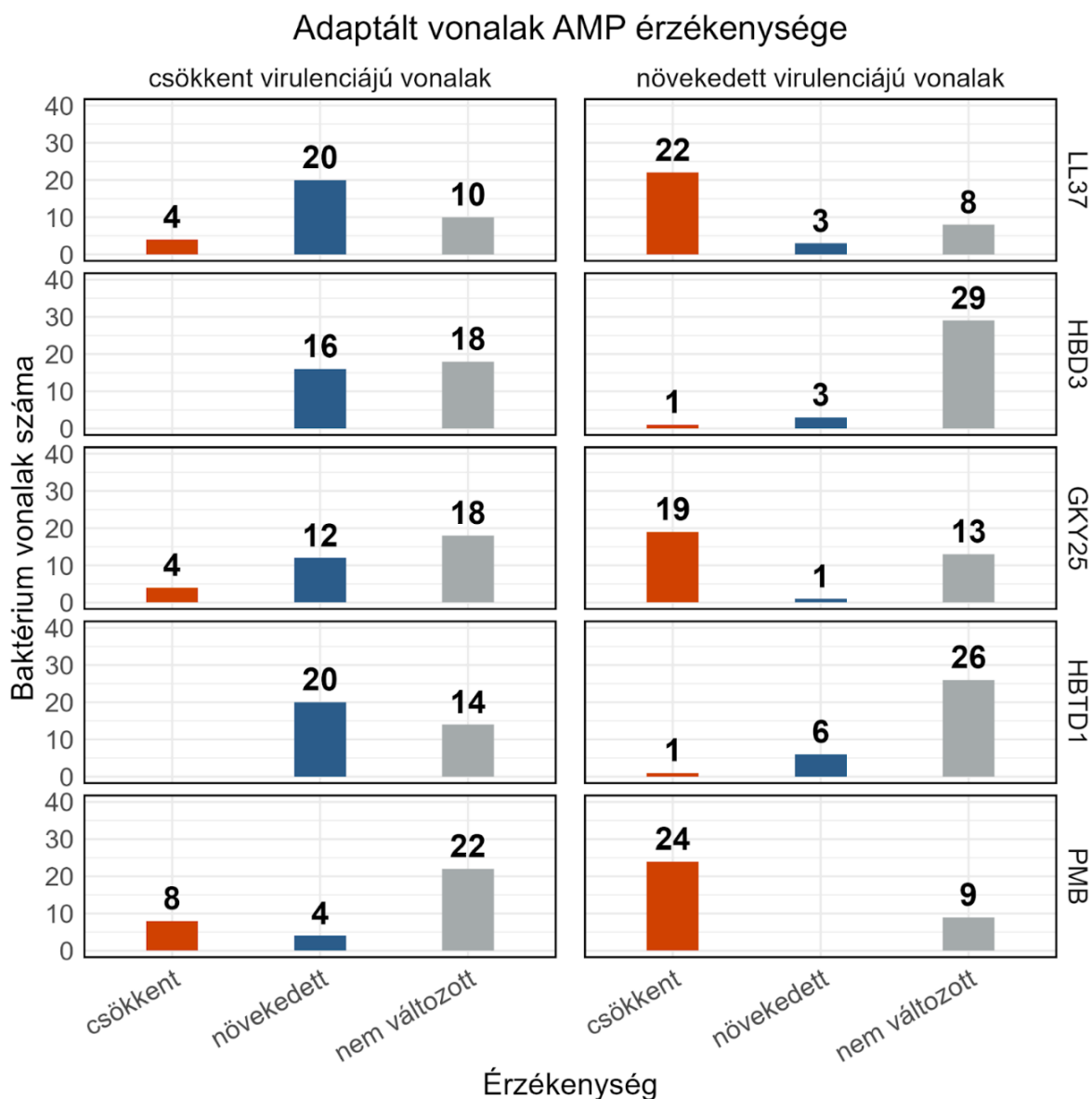
A baktériumtenyészetek felnevesztése MHB 2 tápoldatban történt két replikátumban 37 °C-on 18 órán keresztül folyamatos rázás (300RPM) mellett. A baktériumokat PBS-ben mostuk, hogy eltávolítsuk a tápoldat összetevőit. Ehhez a baktériumtenyészeteket először lecentrifugáltuk 4500 RPM-en 4 °C-on. A felülúszó eltávolítása után a mintákat PBS-ben felszuszpendáltuk. A második centrifugálás után a megfelelő koncentrációban aktív és inaktivált humán vérsérumba hígítottuk a baktériumokat. Mivel az egyes törzsek érzékenysége a vérsérumra különböző, ezért törzsenként eltérő, az előzetes optimalizálás során meghatározott baktérium és vérsérum arányt alkalmaztunk. A szérum inaktiválása 56 °C-on történt 30 percig. Négy óra inkubációt követően, hogy teljes mértékben eltávolítsuk a vérsérumot, ami megzavarná a további kísérleteket, a baktériumokat kétszer PBS-ben mostuk. Mosás után a sejteket lecentrifugáltuk és eltávolítottuk a felülúszót.

Ezután a Logos Biosystems protokollját követtük az élő sejtek megszámlálásához QUANTOM Tx mikrobiális sejtszámlálóval. A mérés során a QUANTOM Viable Cell Kit-et használtuk. Első lépésként a 500 µl kultúrából lecentrifugált sejteket felszuszpendáltuk 10 µl QUANTOM Viable Cell Dilution Buffer-el. Ezután a mintákhoz 2 µl QUANTOM Viable Cell Staining Dye festéket adtunk. Ezt egy 30 perces inkubáció követte 37 °C-on sötétben. Az inkubáció után a mintákat QUANTOM Cell Loading Buffer I-el kevertük el, majd ezekből mintánként 6 µl térfogatot töltöttünk QUANTOM M50 sejtszámláló lemezekre. A lemezeket QUANTOM Tx Centrifugában 10 percig 300 RCF-en centrifugáltuk. A lemezeken lévő sejtek megszámlálása a QUANTOM Tx mikrobiális sejtszámlálóval történt. (Bainbridge-Sedivy és mtsai., 2023)

6 Eredmények

6.1 A virulenciában változást mutató baktériumvonalak AMP érzékenysége

Kutatásunk során összesen 67 változott virulenciájú (33 növekedett, 34 csökkent), klinikailag releváns Gram-negatív patogén baktériumvonal érzékenységét vizsgáltuk meg 4 humán eredetű AMP-vel szemben és a kapott értékeket összehasonlítottuk a vonalak őseinek értékeivel. A méréseket szintén elvégeztük polimixin B-vel, amely egy a klinikumban már régóta alkalmazott membráncélzó peptid antibiotikum.



3. ábra A változott virulenciájú adaptált vonalak AMP érzékenysége. A 34 csökkent (bal oldali panelek) és 33 növekedett (jobb oldali panelek) virulenciájú vonalak számának eloszlása aszerint, hogy a vad típushoz képest nőtt vagy csökkent az érzékenységük az 5 vizsgált antimikrobiális peptiddel szemben. A vad típus értékéhez képest kétszeres csökkenést és növekedést tekintettük az alsó határnak. A piros színnel jelölt oszlopok a csökkent, a kék

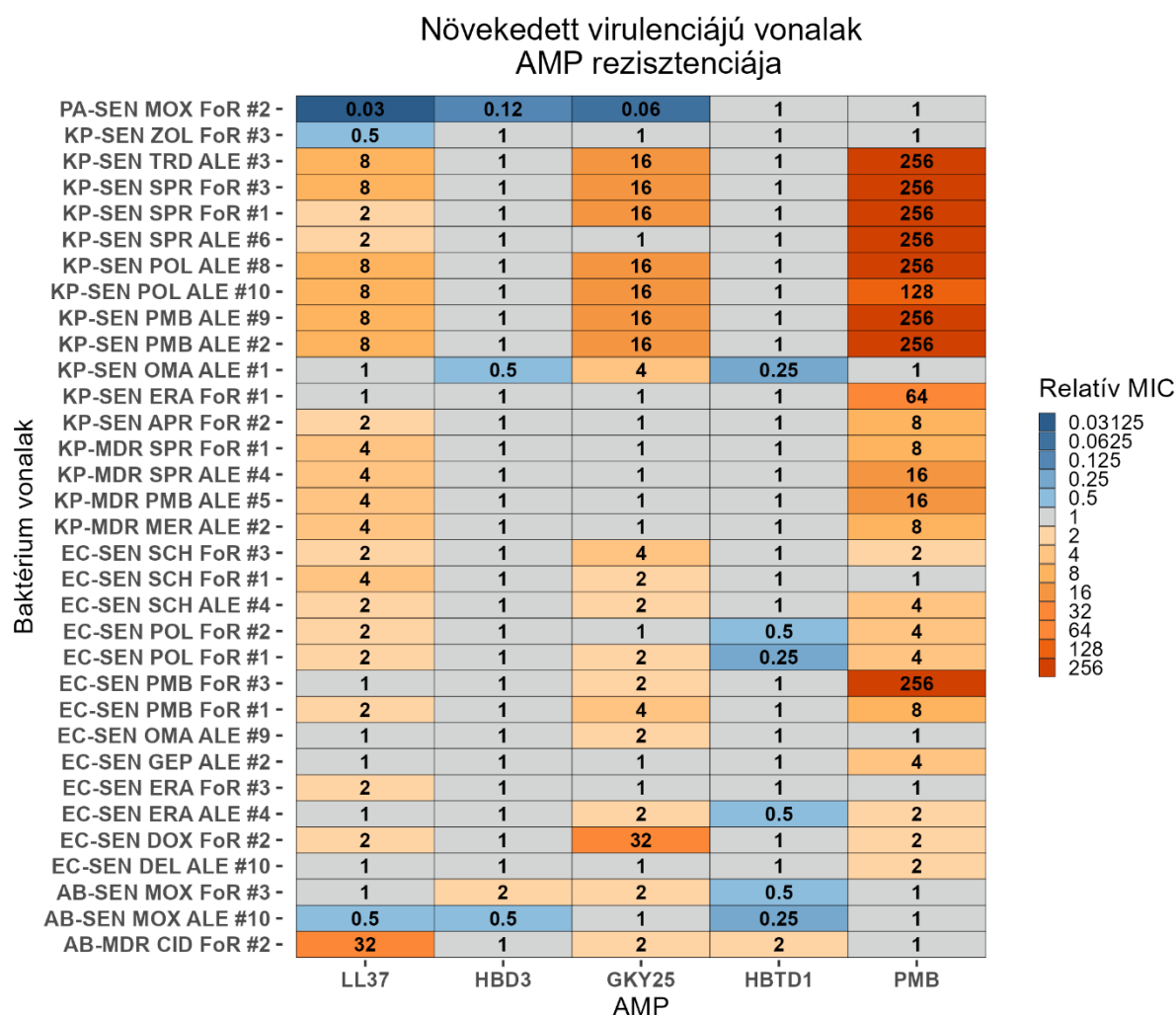
oszlopok pedig a növekedett érzékenyséű vonalak számát jelzik. Azon vonalakat számát, melyek nem mutattak változást az érzékenységet tekintve, a szürke színnel jelöltük.

LL-37-re nézve a csökkent virulenciájú vonalak több mint fele érzékenyebb lett, mint a vad típus, rezisztencia csak 4 vonalnál mutatkozott. A növekedett virulenciájú vonalaknál azonban az esetek kétharmadában csökkent az LL-37-re mutatott érzékenység. Hasonló tendenciát mutattak a baktériumok a GKY25 AMP-vel szemben. Csökkent virulenciát mutató baktériumok közül 12 vonalnál nőtt az érzékenység és csak 4 vonalnál figyeltük meg érzékenység csökkenést. A virulensebb fenotípusú vonalaknál itt is inkább a csökkent érzékenység volt jellemző. A HBD3 és a HBtD1 esetében figyelemre méltó, hogy mindkét esetben gyakoribb volt az érzékenység növekedése az adott hatóanyaggal szemben, mint a rezisztencia kialakulása. Csökkent virulenciájú vonalaknál mindkét β defenzin esetében majdnem a vonalak fele érzékenyebb lett. (3. ábra)

6.2 A növekedett virulenciájú vonalak gyakran mutatnak keresztrezisztenciát humán AMP-kre

A 33 növekedett virulenciájú vonal jellemzően két AMP-re mutatott keresztrezisztenciát: az LL-37-re és a GKY25-re. Ennek köze lehet ahhoz, hogy ez a két AMP lineáris, α -helikális szerkezetet vesz fel, ellenben a HBD3 és a HBtD peptidekkel, melyek több diszulfid kötéssel összekapcsolt antiparallel β -redőből állnak. (Burton & Steel, 2009; Hansen és mtsai., 2015; J. J. Schneider és mtsai., 2005) Érdekes, hogy ennél a két helikális AMP-nél a legmagasabb rezisztenciát azok a vonalak mutatták, amelyeknél a polimixin B antibiotikumra is nagymértékű rezisztenciát mértünk. A *Galleria mellonella* modellszervezetben ezek a baktériumok mutatták a legnagyobb virulencia növekedést. Ezek a vonalak általában olyan membráncélzó antibiotikumokhoz lettek adaptálva, mint a régóta használt polimixin B és a hozzá hasonló újabb POL-7306, SCH-79797 és az SPR-206. Ennek oka valószínűleg az, hogy az LL-37 és a GKY25 hatásmechanizmusa nagyon hasonlít polimixin típusú antibiotikumokéhoz.

Az LL-37 esetében szinte az összes *Klebsiella pneumoniae* vonal ellenállóbb lett. A két humán β defenzinre (HBD3 és HBtD1) mutatott rezisztencia viszont nem volt jellemző. A vonalak nagy része a vad típusával megegyező érzékenységet mutatott, tehát feltételezhető, hogy összefüggés van az érzékenység megváltozása és az immunrendszer peptidjeinek szerkezete között. (4. ábra) Korábbi kutatások már rávilágítottak, hogy mennyire fontos szempont a különböző az AMP-k közötti keresztrezisztenciára nézve a peptidek közötti fizikai és kémiai különbségek. (Kintses és mtsai., 2019)

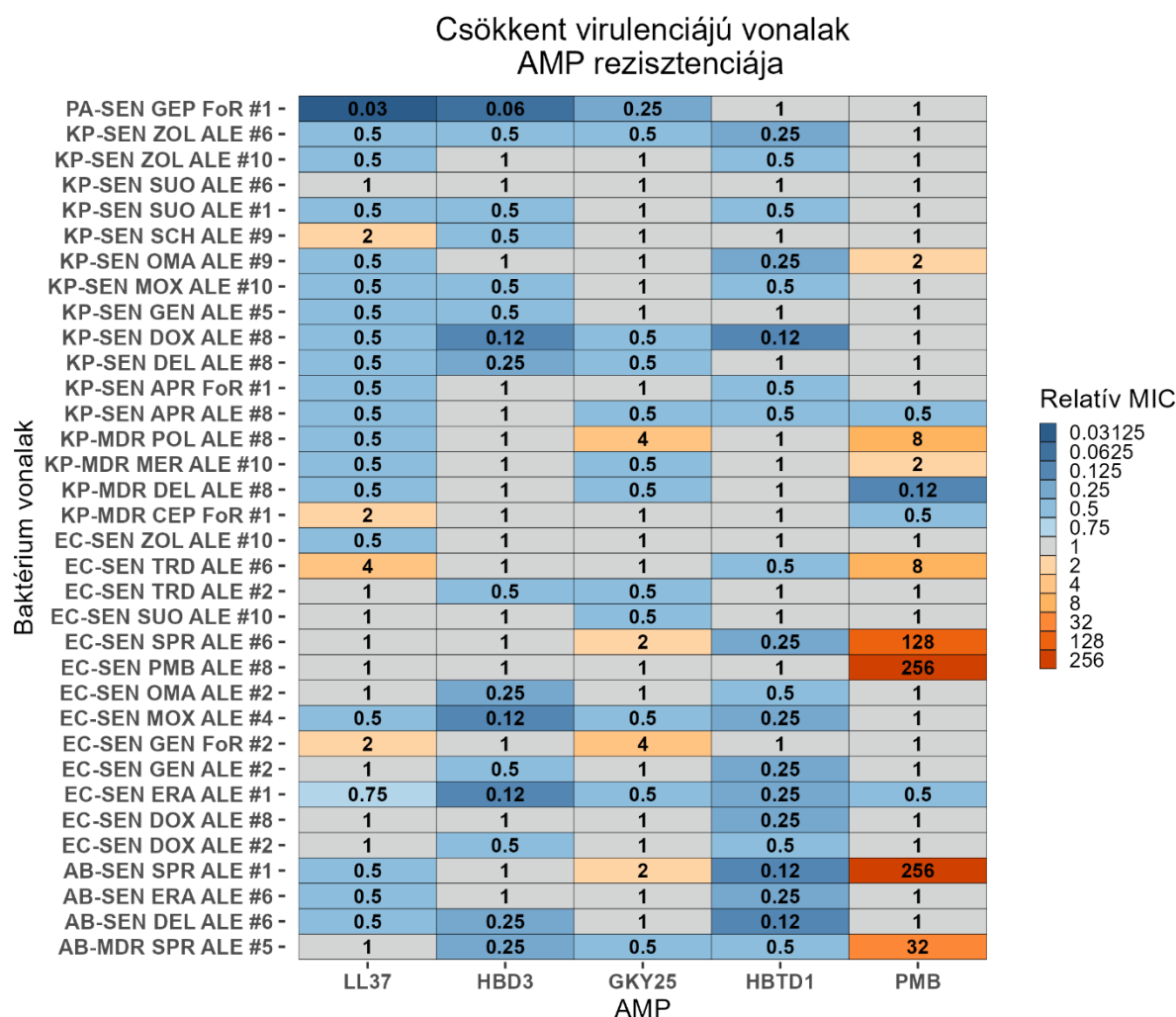


4. ábra A növekedett virulenciát mutató vonalak AMP rezisztenciája. A 33 növekedett virulenciát mutató vonal (y tengely) érzékenységét a minimum gátló koncentráció (MIC) megmérésével határoztuk meg az 5 vizsgált antimikrobiális peptidre (x tengely) nézve. Az egyes csempék színe a vad típushoz viszonyított MIC-t jelképezi. A humán AMP-k közül az LL-37 és a GKY-25 peptidekre több esetben is keresztrezisztencia (piros csempék) kialakulása volt jellemző. Az érzékenyedés (kék csempék) egyik AMP-re sem voltak jellemzőek. A szürke színű csempék a vad típusal megegyező MIC értéket jelölik.

6.3 A csökkent virulenciát mutató vonalak több mint 80%-a érzékenyebb lett legalább egy humán AMP-re

A vonalak, melyek csökkent virulenciát mutattak a vártan megfelelően érzékenyedtek a humán AMP-kkel szemben. A növekedett érzékenység nem volt specifikus AMP-re, mint a csökkent érzékenység a növekedett virulenciájú vonalak esetében, hanem minden humán eredetű antimikrobiális peptidnél jellemző volt. Elmondható azonban, hogy a két humán β defenzinre magasabb fokú érzékenységet mutattak, mint az LL-37 és GKY-25 peptidekre. Ennek a jelenségnek az oka is valószínűleg a β defenzinek humán antimikrobiális peptidek közötti egyedi szerkezetében keresendő. Ezt a magyarázatot támasztja alá az is, hogy nem volt

összefüggés a humán AMP-re és a polimixin B-re mutatott érzékenyedés között. A polimixin B-vel szemben nem volt jellemző az emelkedett érzékenység. (5. ábra)



5. ábra A csökkent virulenciát mutató vonalak AMP rezisztenciája. A 34 növekedett virulenciát mutató vonal (y tengely) érzékenységét a minimum gátló koncentráció (MIC) megmérésével határoztuk meg az 5 vizsgált antimikrobiális peptidre (x tengely) nézve. Az egyes csempék színe a vad típushoz viszonyított MIC-t jelképezi. Három vonal kivételével, minden vonal érzékenysége legalább egy antimikrobiális peptiddel szemben nőtt (kék csempék). A legmagasabb érzékenységet a humán β defenzinokkal szemben mértük. Keresztrezisztencia (piros) nem volt kifejezetten jellemző. A szürke színű csempék a vad típussal megegyező MIC értéket jelölik.

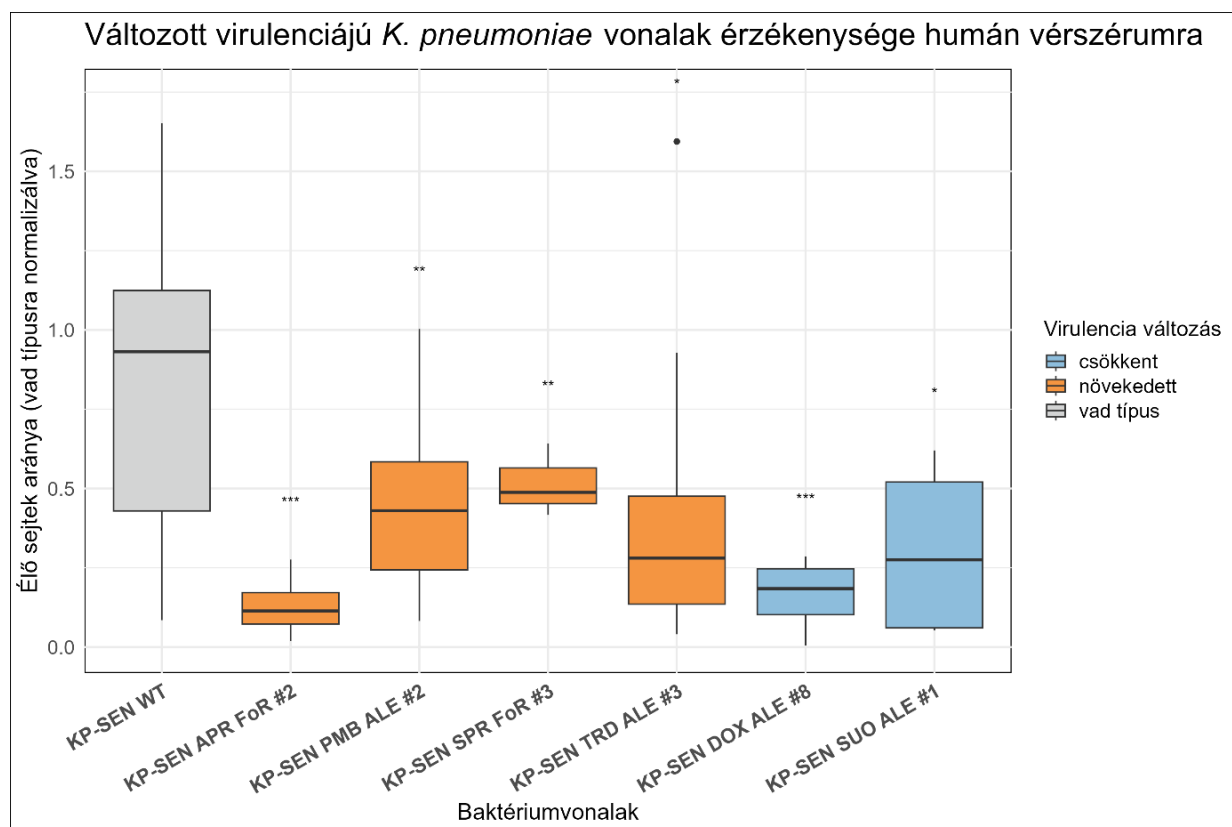
6.4 A változott virulenciát mutató baktériumvonalak érzékenysége humán vérszérumra

A változott virulenciájú *Klebsiella pneumoniae* és *Escherichia coli* vonalaknak megmértük az érzékenységét a humán vérszérummal szemben. Ehhez aktív és inaktív vérszérumos kezelés után megmértük a minták élő baktériumsejt koncentrációját. A változott virulenciájú vonalak

kapott értékeit ezután összehasonlítottuk az ős értékeivel. Összesen 50 változott virulenciájú vonal közül 13 vonalnál mértünk szignifikáns különbséget a vérszérumra mutatott érzékenységükben az eredeti vad típusú vonalakhoz képest. Minden esetben érzékenyedtek az őshöz képest, rezisztenciát egyik mért baktériumvonallal sem mutatott.

6.5 Az adaptált *Klebsiella pneumoniae* vonalak érzékenysége vérszérumra

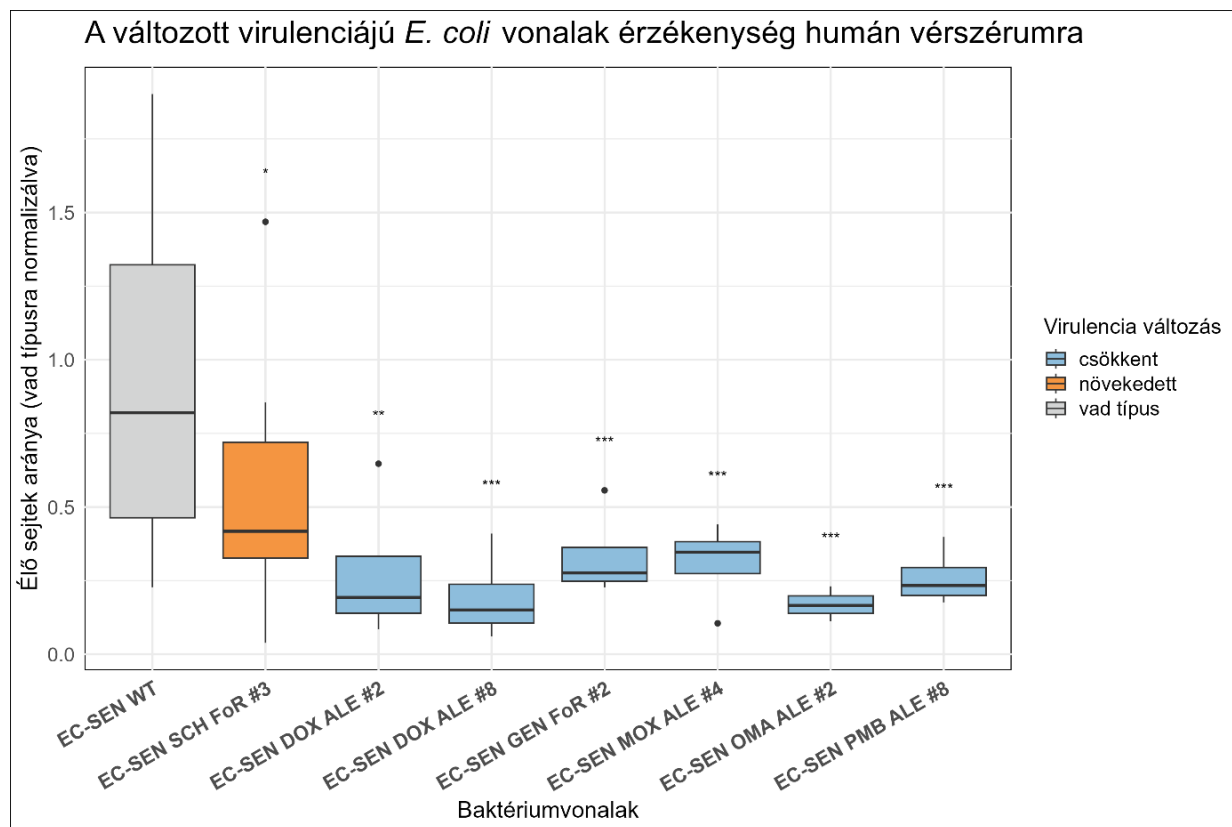
A 12 növekedett virulenciájú vonalnál a vártakkal szemben nem tapasztaltunk csökkent érzékenységet. Négy vonalnál növekedett érzékenységet mértünk a vad típushoz képest. A 12 csökkent virulenciájú vonal közül kettőnél tapasztaltunk érzékenyedést. A szignifikáns eltérést mutató vonalak közül három membráncélzó antibiotikumhoz adaptálódott (polimixin B, SPR-206, tridecaptin M152-P3). A másik három esetben találunk egy tetraciklin (doxiciklin), egy aminoglikozid (apramicin) és egy karbapenem (Sulopenem) antibiotikumhoz adaptált vonalat. (6. ábra)



6. ábra A változott virulenciájú *Klebsiella pneumoniae* vonalak érzékenysége a humán vérszérumra nézve. A 24 megmért adaptált *K. pneumoniae* vonal közül csak a szignifikáns változást mutató vonalak érzékenysége van feltüntetve. Az y tengelyen feltüntetett érték az élő sejtek aránya aktív és inaktív szérumban az azonos kísérleti napon mért vad típus értékeire normalizálva. A narancssárga színnel jelölt baktériumok emelkedett, a kék színnel jelöltek csökkent virulenciát mutattak *Galleria mellonella* modellben. A kísérlet során csak növekedett érzékenységet tapasztaltunk a humán vérszérumra nézve.

6.6 Változott virulenciájú *Escherichia coli* vonalak érzékenysége vérszérumra

A 26 megmért (13 emelkedett és 13 csökkent virulenciájú) vonal közül 7 esetben találtunk szignifikáns csökkenést. A növekedett virulenciát mutató baktériumok közül csak egy vonalnak az érzékenysége csökkent, míg a csökkent virulenciájú baktériumoknál már 6 ilyen vonalat találtunk. Ezen vonalak között találunk membráncélzó, tetraciklin, aminoglikozid, és topoizomeráz inhibitor típusú antibiotikumhoz szoktatott baktériumokat. A *K. pneumoniae* baktériumokhoz hasonlóan itt sem mértünk csökkent érzékenységet. (7. ábra)



7. ábra A változott virulenciájú *Escherichia coli* vonalak érzékenysége a humán vérszérumra nézve. A 26 megmért adaptált *E. coli* vonal közül csak a szignifikáns változást mutató vonalak érzékenysége van feltüntetve. Az y tengelyen feltüntetett érték az élő sejtek aránya aktív és inaktív szérum kezelés után az azonos kísérleti napon mért vad típus értékeire normalizálva. A narancssárga színnel jelölt baktériumok emelkedett, a kék színnel jelöltek csökkent virulenciát mutattak *Galleria mellonella* modellben. A kísérlet során csak növekedett érzékenységet tapasztaltunk a humán vérszérumra nézve.

A fenti példákön látszik, hogy a vérszérummal szembeni érzékenyedés kevésbé volt specifikus a rezisztencia mutációra szelektáló antibiotikum szempontjából. A 13 vonal közül, melyek érzékenysége nőtt, 5 vonal membráncélzó antibiotikumhoz volt adaptálva. Ezeknél az eseteknél az érzékenyedés oka lehet az, hogy a megváltozott sejtmembrán kevésbé ellenálló a komplement rendszerrel szemben.

6.7 A baktériumok virulenciáját befolyásolja az immunrendszerre mutatott érzékenység

Összegezve az eredményeket, azt figyeltük meg, hogy a rezisztencia mutáció kialakulása utáni virulencia változás és az immunrendszer nem-sejtes elemeire mutatott érzékenység között van összefüggés. A membrántargetáló antibiotikumok hatására szelektálódott vonalak keresztrezisztenciát mutattak a szerkezetileg hasonló humán antimikrobiális peptidekre. A csökkent virulenciájú vonalak az esetek nagy részében azonban érzékenyebbek lettek a legtöbb AMP-vel szemben, és a vérszérummal szemben is több esetben tapasztaltunk érzékenyedést. Összefüggést véltem felfedezni továbbá az immunrendszerrel szembeni érzékenység és baktériumokra szelektáló antibiotikum hatásmechanizmusa között. Az immunrendszer bakteriális membránt célzó komponenseinek hatékonyságát befolyásolják a rezisztenciát okozó mutációk, ha az általuk okozott változás a membrán szerkezetében történik. Ez a változás okozhat érzékenyedést, vagy nagyobb ellenállóképességet és ezzel együtt virulensebb fenotípust.

7 Diszkusszió

Az immunrendszer egy rendkívül változatos védelmi vonal, ami többféle módon interaktál a baktériumokkal. Ezekre a kölcsönhatásokra elsősorban jelentéktelennek tűnő változásoknak is hatalmas hatásai lehetnek. A fentebb bemutatott kísérletekkel bemutattuk, hogy a membráncélzó antibiotikumok (legyenek régóta alkalmazottak, vagy új molekulák) jelentette szelekciós nyomás hogyan szelektálhat olyan baktériumokra, melyek rezisztensek lesznek az immunrendszer azon komponenseire, melyek szintén a bakteriális membránt célozzák.

Korunk egyik legnagyobb kihívása a rezisztens baktériumok okozta fertőzések kezelésére új és hatásos hatóanyagok előállítása. Egy korábbi kutatás során kimutatták, hogy az antibiotikumrezisztens *E. coli* baktériumok járulékos érzékenységet szereztek antimikrobiális peptidekre. Azonban az ott vizsgált vonalak között egyik sem volt membránt célzó antibiotikumra adaptálva. (Lázár és mtsai., 2018) Ahogy kísérletünkéből kiderült, a membráncélzó antibiotikumokhoz adaptált vonalak már rezisztenciát mutattak LL-37-re és GKY25-re is. Az LL-37, mint potenciális gyógyszerjelölt egy még specifikusabb szelekciót eredményezhet a jövőben a baktériumok számára. Azonban a szerkezetileg nagy eltérést mutató HBD-3-ra és HBtD-1-re nézve nem tapasztaltunk keresztrezisztenciát. Ha a jövőben ezekhez hasonló hatóanyagokat kezdenek hatalmas mennyiségekben alkalmazni, akkor a humán β defenzinek is egy megkerülhető akadállyá válhatnak a patogén baktériumok számára.

Azonban fontos kiemelni, hogy a csökkent virulenciájú vonalak szinte mindegyikénél mértünk érzékenyedést humán antimikrobiális peptidekre és a komplement rendszerrel szembeni növekedett érzékenységre is volt példa. A csökkent virulencia és az immunrendszerrel szemben tanúsított kisebb ellenállóképesség között van összefüggés. Ennek oka lehet az, hogy a mutáció olyan változást idézett elő a baktérium membránjában, ami érzékenyebbé tette a humán AMP-kre. Egy másik lehetőség, hogy nem a membrán lett érzékenyebb, hanem a mutáció költsége mellett az AMP jelentette stressz már túl sok volt a baktériumoknak. Utóbbinak ellentmond, hogy a polimixin B antibiotikumra nem történt érzékenyedés.

A jövő antibiotikumainak fejlesztése és tervezése közben számolni kell azzal, hogy az ellenük kialakuló rezisztencia milyen változásokat okozhat a patogén baktériumok és az emberi szervezet természetes védelmére szolgáló molekulák közötti kölcsönhatásokban. A humán AMP-k hatásukat tekintve és szerkezetileg sokfélék lehetnek, ezért fontos, hogy megértsük milyen hatással vannak az antibiotikumkitettség okozta genetikai változások a humán antimikrobiális peptidekre mutatott érzékenységre. Nem mindegy, hogy keresztrezisztenciát

vagy járulékos érzékenységet okoznak-e az új mutációk, melyek a jövőben potenciálisan elterjedhetnek.

A vérszérum rezisztencia méréssel meg tudtuk állapítani, hogy a vérszérum milyen arányban ölte meg a baktériumokat, de nem szolgáltatott információt arról, hogy a komplement rendszer mely útvonalai és mely komponensei milyen mértékben aktiválódtak. A jövőben szeretnénk különböző fluoreszcencia alapú, enzim aktivitást mérő eljárásokat, például ELISA vizsgálatot alkalmazni, hogy átfogóbb képet kaphassunk arról, milyen interakciók mehetnek végbe a baktériumok és a komplement rendszer komponensei között.

Ez a dolgozat kifejezetten a humorális immunitás elemeire fókuszált, de érdemes lenne megvizsgálni az immunsejtek és a változott virulenciájú baktériumok közötti interakciókat. Elképzelhető, hogy a patogén baktériumokban jelen lévő mutációk másképp viselkednek a makrofágokkal, vagy egyéb fagocitáló sejtekkel szemben. Például van-e olyan rezisztenciát okozó mutáció, ami egyben a baktérium oxidatív stressztűrését növeli? Egy ilyen baktériumvonal ellenállóbb lenne fagocitáló immunsejtek által termelt szabad gyökökkel szemben, ezzel növelve virulenciáját.

A megnövekedett virulencia hátterében természetesen nem csupán az immunrendszerrel szembeni nagyobb ellenállóképesség állhat. Ahogy már korábban említésre került, a virulenciafaktorok rendkívül változatosak. A virulenciaváltozásnak sokkal közvetlenebb oka is lehet, mint az immunrendszerrel szemben mutatott nagyobb ellenállóképesség. Ilyen például a baktériumok által a gazdaszervezet sejtjeire kifejtett citotoxikus hatások vagy az inváziós képesség megváltozása. A jövőben szeretnénk tovább vizsgálni ezen vonalak cito- és genotoxikus hatásait, hogy jobban megértsük, miként okozhatnak közvetlen károsodást a humán szervezetben, és hogy esetleg hozzájárulhatnak-e a rák kialakulásához.

A fejlesztés alatt álló membránt célzó antibiotikumok piacra bocsátása magában hordozza azt a kockázatot, hogy emberi eredetű szelekciós nyomásra hipervirulens baktériumtörzsek terjednek majd el világszerte. A jövőben nagyobb figyelmet kell fordítani arra, hogy a rezisztenciát okozó mutációk széleskörű hatásait feltérképezzük és megértsük. Egy új molekula tesztelésénél például lényeges kérdés, hogy az adaptáció során elterjedő mutációk milyen hatással vannak a különböző patogén törzsek virulenciájára. Mérlegelni kell tehát egy adott hatóanyag használatát olyan szempontból is, hogy a rezisztencián kívül milyen egyéb változást eredményezhet a baktériumoknál, és hosszútávon megéri-e az ár, amit ez jelenthet.

Azok a mutációk, melyek gyógyszerrezisztencia mellett virulencia növekedést okoznak, nem biztos, hogy minden fajban hasonló fenotípust eredményeznek. Ezért lenne fontos minél több patogén fajnál izolálni az adott szerekre megjelenő gyakori mutációkat, és megvizsgálni milyen változásokat okoznak egyéb fajokban. Nem mindegy, hogy egy adott fertőzést milyen antibiotikummal kezelünk, mert egy rossz párosítás olyan szelekciós nyomást jelenthet, ami antibiotikumrezisztens és egyidejűleg hipervirulens patogéneknek kedvezhet.

Egyetlen pontmutáció tehát jelentős változásokat okozhat egy baktérium tulajdonságaiban. Az emberiség által gyakorolt felelőtlen antibiotikumhasználat a jelenleg használt kezelésekkel, és az immunrendszerrel szemben ellenállóbb patogének elterjedését eredményezheti, aminek a jövőben hatalmas pénzben és emberéletekben mérhető ára lesz, hacsak nem változtatunk a mostani bevett szokásainkon.

8 Köszönetnyilvánítás

Köszönetet szeretnék mondani a laborvezetőmnek és témavezetőmnek, Dr. Juhász Szilviának a szakmai fejlődésemért, a laboratóriumban szerzett tapasztalatokért és hogy betekintést nyerhettem ebbe a kutatási területbe.

Szeretném megköszönni a segítséget és iránymutatást Dr. Szili Petra Évának. Köszönöm a felkészítést, a szakmai tudást és a rám áldozott munkát.

Köszönettel tartozom HCEMM Cancer Microbiome Core Group tagjainak a segítségért és hogy lehetővé tették a kísérletek elvégzését.

Szeretném megköszönni Pál Csabának és a Lendület Kísérleti Evolúcióbiológiai Csoport tagjainak a munkáját. Külön köszönetet érdemel Csernyák Milán, aki rengeteget segített a kísérletekben.

9 Irodalomjegyzék

2021 antibacterial agents in clinical and preclinical development: An overview and analysis. (é. n.). Elérés 2024. szeptember 18., forrás <https://www.who.int/publications/i/item/9789240047655>

Andersson, D. I., & Hughes, D. (2010). Antibiotic resistance and its cost: Is it possible to reverse resistance? *Nature Reviews Microbiology*, 8(4), 260–271. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2319>

Bainbridge-Sedivy, R., Naushad, S., Firth, I., Gymnionova, I., El-Azouni, M., Edissi, S., Kang, M., Thantrige-Don, N., Lam, C., & Huang, H. (2023). A protocol to enumerate total and viable bacterial cells using QUANTOM Tx™ Microbial Cell Counter. <https://doi.org/10.21203/rs.3.pex-2210/v1>

Bisacchi, G. S., & Manchester, J. I. (2015). A New-Class Antibacterial—Almost. Lessons in Drug Discovery and Development: A Critical Analysis of More than 50 Years of Effort toward ATPase Inhibitors of DNA Gyrase and Topoisomerase IV. *ACS Infectious Diseases*, 1(1), 4–41. <https://doi.org/10.1021/id500013t>

Burton, M. F., & Steel, P. G. (2009). The chemistry and biology of LL-37. *Natural Product Reports*, 26(12), 1572. <https://doi.org/10.1039/b912533g>

Carattoli, A. (2011). Plasmids in Gram negatives: Molecular typing of resistance plasmids. *International Journal of Medical Microbiology*, 301(8), 654–658. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2011.09.003>

Chen, L., Yang, J., Yu, J., Yao, Z., Sun, L., Shen, Y., & Jin, Q. (2005). VFDB: A reference database for bacterial virulence factors. *Nucleic Acids Research*, 33(suppl_1), D325–D328. <https://doi.org/10.1093/nar/gki008>

Chopra, I., & Roberts, M. (2001). Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65(2), 232–260. <https://doi.org/10.1128/mmbr.65.2.232-260.2001>

Chuanchuen, R., Beinlich, K., Hoang, T. T., Becher, A., Karkhoff-Schweizer, R. R., & Schweizer, H. P. (2001). Cross-Resistance between Triclosan and Antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* Is Mediated by Multidrug Efflux Pumps: Exposure of a Susceptible Mutant Strain to Triclosan Selects *nfxB* Mutants Overexpressing MexCD-OprJ. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(2), 428–432. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.2.428-432.2001>

Daruka, L., Czikkely, M. S., Szili, P., Farkas, Z., Balogh, D., Maharramov, E., Vu, T.-H., Sipos, L., Vincze, B. D., Grézal, G., Juhász, S., Dunai, A., Daraba, A., Számel, M., Sári, T., Stirling, T., Vászrhelyi, B. M., Ari, E., Christodoulou, C., ... Pál, C. (2023). Antibiotics of the future are prone to resistance in Gram-negative pathogens (o. 2023.07.23.550022). bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/2023.07.23.550022>

Davies, J., & Davies, D. (2010). Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(3), 417–433. <https://doi.org/10.1128/mmbr.00016-10>

Dijkmans, A. C., Wilms, E. B., Kamerling, I. M. C., Birkhoff, W., Ortiz-Zacarias, N. V., van Nieuwkoop, C., Verbrugh, H. A., & Touw, D. J. (2015). Colistin: Revival of an Old Polymyxin Antibiotic. *Therapeutic Drug Monitoring*, 37(4), 419. <https://doi.org/10.1097/FTD.0000000000000172>

Divyashree, M., Mani, M. K., Reddy, D., Kumavath, R., Ghosh, P., Azevedo, V., & Barh, D. (2020). Clinical Applications of Antimicrobial Peptides (AMPs): Where do we Stand Now? *Protein and Peptide Letters*, 27(2), 120–134. <https://doi.org/10.2174/0929866526666190925152957>

Dmitriev, B., Toukach, F., & Ehlers, S. (2005). Towards a comprehensive view of the bacterial cell wall. *Trends in Microbiology*, 13(12), 569–574. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2005.10.001>

Drawz, S. M., & Bonomo, R. A. (2010). Three Decades of β -Lactamase Inhibitors. *Clinical Microbiology Reviews*, 23(1), 160–201. <https://doi.org/10.1128/cmr.00037-09>

Durand, G. A., Raoult, D., & Dubourg, G. (2019). Antibiotic discovery: History, methods and perspectives. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 53(4), 371–382. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.11.010>

Emődy, L., Kerényi, M., & Nagy, G. (2003). Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 22, 29–33. [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(03\)00236-X](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(03)00236-X)

Epand, R. M., Walker, C., Epand, R. F., & Magarvey, N. A. (2016). Molecular mechanisms of membrane targeting antibiotics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1858(5), 980–987. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.10.018>

Erdei Anna - Sármay Gabriella - Prechl József (szerkesztők): *Immunológia*. (é. n.). Elérés 2024. október 26., forrás https://bookline.hu/product/home.action?_v=Erdei_Anna_Sarmay_Gabriella_Prechl_J&type=20&id=1015669

Falanga, A., Lombardi, L., Franci, G., Vitiello, M., Iovene, M. R., Morelli, G., Galdiero, M., & Galdiero, S. (2016). Marine Antimicrobial Peptides: Nature Provides Templates for the Design of Novel Compounds against Pathogenic Bacteria. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(5), Article 5. <https://doi.org/10.3390/ijms17050785>

Gilmore, M. S., Lebreton, F., & van Schaik, W. (2013). Genomic transition of enterococci from gut commensals to leading causes of multidrug-resistant hospital infection in the antibiotic era. *Current Opinion in Microbiology*, 16(1), 10–16. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2013.01.006>

Gothwal, R., & Shashidhar, T. (2015). Antibiotic Pollution in the Environment: A Review. *CLEAN – Soil, Air, Water*, 43(4), 479–489. <https://doi.org/10.1002/clen.201300989>

Grossman, T. H. (2016). Tetracycline Antibiotics and Resistance. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(4), a025387. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025387>

Hansen, F. C., Kalle-Brune, M., van der Plas, M. J. A., Strömdahl, A.-C., Malmsten, M., Mörgelin, M., & Schmidtchen, A. (2015). The Thrombin-Derived Host Defense Peptide GKY25 Inhibits Endotoxin-Induced Responses through Interactions with Lipopolysaccharide and Macrophages/Monocytes. *The Journal of Immunology*, 194(11), 5397–5406. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1403009>

Huang, J., Ding, H., Shi, Y., Zhao, Y., Hu, X., Ren, J., Huang, G., Wu, R., & Zhao, Z. (2018). Further Spread of a blaKPC-Harboring Untypeable Plasmid in Enterobacteriaceae in China. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01938>

Kang, D., Revtovich, A. V., Chen, Q., Shah, K. N., Cannon, C. L., & Kirienko, N. V. (2019). Pyoverdine-Dependent Virulence of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates From Cystic Fibrosis Patients. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02048>

Karlowsky, J. A., Steenbergen, J., & Zhanel, G. G. (2019). Microbiology and Preclinical Review of Omadacycline. *Clinical Infectious Diseases*, 69(Supplement_1), S6–S15. <https://doi.org/10.1093/cid/ciz395>

Kintsés, B., Jangir, P. K., Fekete, G., Számel, M., Méhi, O., Spohn, R., Daruka, L., Martins, A., Hosseinnia, A., Gagarinova, A., Kim, S., Phanse, S., Csörgő, B., Györkei, Á., Ari, E., Lázár, V., Nagy, I., Babu, M., Pál, C., & Papp, B. (2019). Chemical-genetic profiling reveals limited cross-resistance between antimicrobial peptides with different modes of action. *Nature Communications*, 10(1), 5731. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13618-z>

Kong, K.-F., Schneper, L., & Mathee, K. (2010). Beta-lactam antibiotics: From antibiosis to resistance and bacteriology. *APMIS*, 118(1), 1–36. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2009.02563.x>

Koo, H. B., & Seo, J. (2019). Antimicrobial peptides under clinical investigation. *Peptide Science*, 111(5), e24122. <https://doi.org/10.1002/pep2.24122>

Krause, K. M., Serio, A. W., Kane, T. R., & Connolly, L. E. (2016). Aminoglycosides: An Overview. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(6), a027029. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a027029>

Lázár, V., Martins, A., Spohn, R., Daruka, L., Grézal, G., Fekete, G., Számel, M., Jangir, P. K., Kintsés, B., Csörgő, B., Nyerges, Á., Györkei, Á., Kincses, A., Dér, A., Walter, F. R., Deli, M. A., Urbán, E., Hegedűs, Z., Olajos, G., ... Pál, C. (2018). Antibiotic-resistant bacteria show widespread collateral sensitivity to antimicrobial peptides. *Nature Microbiology*, 3(6), 718–731. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0164-0>

- Le, C.-F., Fang, C.-M., & Sekaran, S. D. (2017). Intracellular Targeting Mechanisms by Antimicrobial Peptides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(4), 10.1128/aac.02340-16. <https://doi.org/10.1128/aac.02340-16>
- Lehrer, R. I. (2004). Primate defensins. *Nature Reviews Microbiology*, 2(9), 727–738. <https://doi.org/10.1038/nrmicro976>
- Lewis, K. (2020). The Science of Antibiotic Discovery. *Cell*, 181(1), 29–45. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.056>
- Magiorakos, A.-P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., Harbarth, S., Hindler, J. F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D. L., Rice, L. B., Stelling, J., Struelens, M. J., Vatopoulos, A., Weber, J. T., & Monnet, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(3), 268–281. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>
- Martin, J. K., Sheehan, J. P., Bratton, B. P., Moore, G. M., Mateus, A., Li, S. H.-J., Kim, H., Rabinowitz, J. D., Typas, A., Savitski, M. M., Wilson, M. Z., & Gitai, Z. (2020). A Dual-Mechanism Antibiotic Kills Gram-Negative Bacteria and Avoids Drug Resistance. *Cell*, 181(7), 1518-1532.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.05.005>
- Medzhitov, R., & Janeway, C. (2000). Innate Immunity. *New England Journal of Medicine*, 343(5), 338–344. <https://doi.org/10.1056/NEJM200008033430506>
- Melnyk, A. H., Wong, A., & Kassen, R. (2015). The fitness costs of antibiotic resistance mutations. *Evolutionary Applications*, 8(3), 273–283. <https://doi.org/10.1111/eva.12196>
- Merle, N. S., Church, S. E., Fremeaux-Bacchi, V., & Roumenina, L. T. (2015). Complement System Part I – Molecular Mechanisms of Activation and Regulation. *Frontiers in Immunology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00262>
- Merle, N. S., Noe, R., Halbwachs-Mecarelli, L., Fremeaux-Bacchi, V., & Roumenina, L. T. (2015). Complement System Part II: Role in Immunity. *Frontiers in Immunology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00257>
- Napier, B. A., Burd, E. M., Satola, S. W., Cagle, S. M., Ray, S. M., McGann, P., Pohl, J., Lesho, E. P., & Weiss, D. S. (2013). Clinical Use of Colistin Induces Cross-Resistance to Host Antimicrobials in *Acinetobacter baumannii*. *mBio*, 4(3), 10.1128/mbio.00021-13. <https://doi.org/10.1128/mbio.00021-13>
- Needham, B. D., & Trent, M. S. (2013). Fortifying the barrier: The impact of lipid A remodelling on bacterial pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology*, 11(7), 467–481. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3047>
- Nguyen, L. T., Haney, E. F., & Vogel, H. J. (2011). The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends in Biotechnology*, 29(9), 464–472. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.05.001>
- Noskin, G. A. (2005). Tigecycline: A New Glycylcycline for Treatment of Serious Infections. *Clinical Infectious Diseases*, 41(s5), S303–S314. <https://doi.org/10.1086/431672>
- Olli, S., Nagaraj, R., & Motukupally, S. R. (2014). A Hybrid Cationic Peptide Composed of Human β -Defensin-1 and Humanized θ -Defensin Sequences Exhibits Salt-Resistant Antimicrobial Activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(1), 217–225. <https://doi.org/10.1128/aac.03901-14>
- Parkin, J., & Cohen, B. (2001). An overview of the immune system. *The Lancet*, 357(9270), 1777–1789. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)04904-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)04904-7)
- Plüddemann, A., Mukhopadhyay, S., & Gordon, S. (2006). The interaction of macrophage receptors with bacterial ligands. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 8(28), 1–25. <https://doi.org/10.1017/S1462399406000159>

- Poehlsgaard, J., & Douthwaite, S. (2005). The bacterial ribosome as a target for antibiotics. *Nature Reviews Microbiology*, 3(11), 870–881. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1265>
- Poole, K. (2004). Resistance to β -lactam antibiotics. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 61(17), 2200–2223. <https://doi.org/10.1007/s00018-004-4060-9>
- Projan, S. J. (2002). New (and not so new) antibacterial targets – from where and when will the novel drugs come? *Current Opinion in Pharmacology*, 2(5), 513–522. [https://doi.org/10.1016/S1471-4892\(02\)00197-2](https://doi.org/10.1016/S1471-4892(02)00197-2)
- Projan, S. J. (2003). Why is big Pharma getting out of antibacterial drug discovery? *Current Opinion in Microbiology*, 6(5), 427–430. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2003.08.003>
- Retsema, J., & Fu, W. (2001). Macrolides: Structures and microbial targets. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 18, 3–10. [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(01\)00401-0](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(01)00401-0)
- Sader, H. S., Rhomberg, P. R., Duncan, L. R., Locher, H. H., Dale, G. E., & Flamm, R. K. (2020). Antimicrobial activity of POL7306 tested against clinical isolates of Gram-negative bacteria collected worldwide. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 75(6), 1518–1524. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa020>
- Saha, R., Saha, N., Donofrio, R. S., & Bestervelt, L. L. (2013). Microbial siderophores: A mini review. *Journal of Basic Microbiology*, 53(4), 303–317. <https://doi.org/10.1002/jobm.201100552>
- Sarma, J. V., & Ward, P. A. (2011). The complement system. *Cell and Tissue Research*, 343(1), 227–235. <https://doi.org/10.1007/s00441-010-1034-0>
- Schneider, J. J., Unholzer, A., Schaller, M., Schäfer-Korting, M., & Korting, H. C. (2005). Human defensins. *Journal of Molecular Medicine*, 83(8), 587–595. <https://doi.org/10.1007/s00109-005-0657-1>
- Schneider, T., & Sahl, H.-G. (2010). An oldie but a goodie – cell wall biosynthesis as antibiotic target pathway. *International Journal of Medical Microbiology*, 300(2), 161–169. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2009.10.005>
- Skov, R. L., & Monnet, D. L. (2016). Plasmid-mediated colistin resistance (mcr-1 gene): Three months later, the story unfolds. *Eurosurveillance*, 21(9), 30155. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.9.30155>
- Sommer, M. O. A., Munck, C., Toft-Kehler, R. V., & Andersson, D. I. (2017). Prediction of antibiotic resistance: Time for a new preclinical paradigm? *Nature Reviews Microbiology*, 15(11), 689–696. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.75>
- Spohn, R., Daruka, L., Lázár, V., Martins, A., Vidovics, F., Grézal, G., Méhi, O., Kintsés, B., Számel, M., Jangir, P. K., Csörgő, B., Györkei, Á., Bódi, Z., Faragó, A., Bodai, L., Földesi, I., Kata, D., Maróti, G., Pap, B., ... Pál, C. (2019). Integrated evolutionary analysis reveals antimicrobial peptides with limited resistance. *Nature Communications*, 10(1), 4538. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12364-6>
- Sun, D., Jeannot, K., Xiao, Y., & Knapp, C. W. (2019). Editorial: Horizontal Gene Transfer Mediated Bacterial Antibiotic Resistance. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01933>
- Turvey, S. E., & Broide, D. H. (2010). Innate immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2, Supplement 2), S24–S32. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.07.016>
- Van Bambeke, F., Balzi, E., & Tulkens, P. M. (2000). Antibiotic efflux pumps. *Biochemical Pharmacology*, 60(4), 457–470. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(00\)00291-4](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(00)00291-4)
- Webber, M. A., & Piddock, L. J. V. (2003). The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51(1), 9–11. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg050>
- WHO Bacterial Priority Pathogens List 2024: Bacterial Pathogens of Public Health Importance, to Guide Research, Development, and Strategies to Prevent and Control Antimicrobial Resistance (1st ed). (2024). World Health Organization.

Zhanel, G. G., Cheung, D., Adam, H., Zelenitsky, S., Golden, A., Schweizer, F., Gorityala, B., Lagacé-Wiens, P. R. S., Walkty, A., Gin, A. S., Hoban, D. J., & Karlowsky, J. A. (2016). Review of Eravacycline, a Novel Fluorocycline Antibacterial Agent. *Drugs*, 76(5), 567–588. <https://doi.org/10.1007/s40265-016-0545-8>

Zhang, Y., Zhao, C., Wang, Q., Wang, X., Chen, H., Li, H., Zhang, F., & Wang, H. (2020). Evaluation of the in vitro activity of new polymyxin B analogue SPR206 against clinical MDR, colistin-resistant and tigecycline-resistant Gram-negative bacilli. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 75(9), 2609–2615. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa217>

Zhu, J., Wang, T., Chen, L., & Du, H. (2021). Virulence Factors in Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.642484>

10 Tételes szerzői hozzájárulás

Részfeladat	A részvétel mértéke (ötfokozatú skálán jellemezve)
Vizsgált baktériumvonalak előkészítése	4
Vizsgált antimikrobiális peptidek előkészítése	5
Hígítási sorok elkészítése, és baktériumvonalakkal történő beoltása	5
Minimális gátlási koncentráció meghatározása, optikai denzitás mérésével	5
Baktériumok vérszérumos kezelése	2
Szérummal kezelt minták előkészítése és festése, élő sejtek megszámlálása QUANTOM Tx mikrobiális sejtszámlálóval	4
Adatok feldolgozása	5

5 – Felkészítés után a feladat teljes egészét önállóan végeztem a pályamunkához szükséges mennyiségben.

4 – Felkészítés után a feladat több mint felét önállóan végeztem a pályamunkához szükséges mennyiségben.

3 – Felkészítés után a részfeladat felét önállóan végeztem a pályamunkához szükséges mennyiségben.

2 – Felkészítés után a részfeladat kevesebb mint felét önállóan végeztem a pályamunkához szükséges mennyiségben.

1 – A részfeladatot folyamatos segítséggel végeztem a pályamunkához szükséges mennyiségben.