

**Szegedi Tudományegyetem**

*Természettudományi és Informatikai Kar*

*Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék*



## **TUDOMÁNYOS DIÁKKÖRI DOLGOZAT**

### **Fémionok hatása a TEM-1 $\beta$ -laktamáz enzimre**

**Készítette:** Egyed Viktória  
II. vegyész MSc hallgató

**Témavezetők:** Dr. Gyurcsik Béla  
egyetemi docens

**Zeyad H. Nafae**  
PhD hallgató

**Szeged**

**2022.11.18.**

# Tartalomjegyzék

|                                                                                                                   |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>I. Bevezetés .....</b>                                                                                         | <b>4</b>  |
| <b>II. Irodalmi áttekintés .....</b>                                                                              | <b>5</b>  |
| 2.1. $\beta$ -laktamáz enzimek .....                                                                              | 5         |
| 2.2. $\beta$ -laktamáz enzimek működési mechanizmusa .....                                                        | 6         |
| 2.3. A $\beta$ -laktamáz enzimek által katalizált reakció kinetikája .....                                        | 7         |
| 2.4. A Hg(II) affinitása a $\beta$ -laktamázokhoz .....                                                           | 9         |
| <b>III. Célkitűzés.....</b>                                                                                       | <b>10</b> |
| <b>IV. Kísérleti rész .....</b>                                                                                   | <b>11</b> |
| 4.1. Fehérjetisztítás .....                                                                                       | 11        |
| 4.1.1. Első és második IMAC lépés .....                                                                           | 11        |
| 4.1.2. Anioncsere.....                                                                                            | 11        |
| 4.2. A tisztított TEM-1 $\beta$ -laktamáz vizsgálata SDS PAGE módszerrel .....                                    | 11        |
| 4.2.1. SDS PAGE alapjai .....                                                                                     | 11        |
| 4.2.2. Tisztított TEM-1 $\beta$ -laktamáz vizsgálata SDS PAGE módszerrel .....                                    | 12        |
| 4.3. Tisztított fehérje koncentrációjának meghatározása .....                                                     | 12        |
| 4.4. Cirkuláris dikroizmus spektroszkópiás vizsgálatok.....                                                       | 13        |
| 4.4.1. A cirkuláris dikroizmus spektroszkópia alapjai .....                                                       | 13        |
| 4.4.2. A CD mérés menete .....                                                                                    | 14        |
| 4.5. Fémionokat tartalmazó M9 tápoldatban szaporított baktériumsejtek ellenálló-<br>képességének vizsgálata ..... | 15        |
| 4.6. A fémionok hatása a fehérjék kifejeződésére .....                                                            | 16        |
| 4.7. TEM-1 $\beta$ -laktamáz aktivitásának meghatározása .....                                                    | 17        |
| <b>V. Eredmények bemutatása és értékelése.....</b>                                                                | <b>18</b> |
| 5.1. Fehérjetisztítás és a tisztított TEM-1 $\beta$ -laktamáz vizsgálata SDS PAGE módszerrel<br>.....             | 18        |
| 5.2. A fehérjekoncentráció meghatározása .....                                                                    | 19        |

|                                                                                                                   |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 5.3. Cirkuláris dikroizmus spektroszkópiás vizsgálatok.....                                                       | 20        |
| 5.4. Fémionokat tartalmazó M9 tápoldatban szaporított baktériumsejtek ellenálló-<br>képességének vizsgálata ..... | 21        |
| 5.5. A fémiont tartalmazó tápoldatokban kifejezett fehérjék vizsgálata<br>gélelektroforézissel .....              | 23        |
| 5.6. Kinetikai vizsgálatok .....                                                                                  | 24        |
| <b>VI. Összefoglalás .....</b>                                                                                    | <b>26</b> |
| <b>VII. Irodalomjegyzék .....</b>                                                                                 | <b>27</b> |
| <b>Köszönetnyilvánítás.....</b>                                                                                   | <b>29</b> |

## I. Bevezetés

A  $\beta$ -laktamáz enzimek felelősek a baktériumok  $\beta$ -laktám antibiotikumokkal szemben kialakított rezisztenciájáért azáltal, hogy elősegítik a  $\beta$ -laktám gyűrű hidrolízisét. Bár az antibiotikum molekulák változtatásával hatékonyabb gyógyszerek fejleszthetők, a multirezisztens baktériumok egyre nagyobb egészségügyi veszélyt jelentenek. Az EU jelentése szerint csak Európában évente ~25 ezer ember hal meg úgynevezett szuperbaktériumok (antibiotikumoknak különösen ellenálló kórokozók) okozta megbetegedésben.

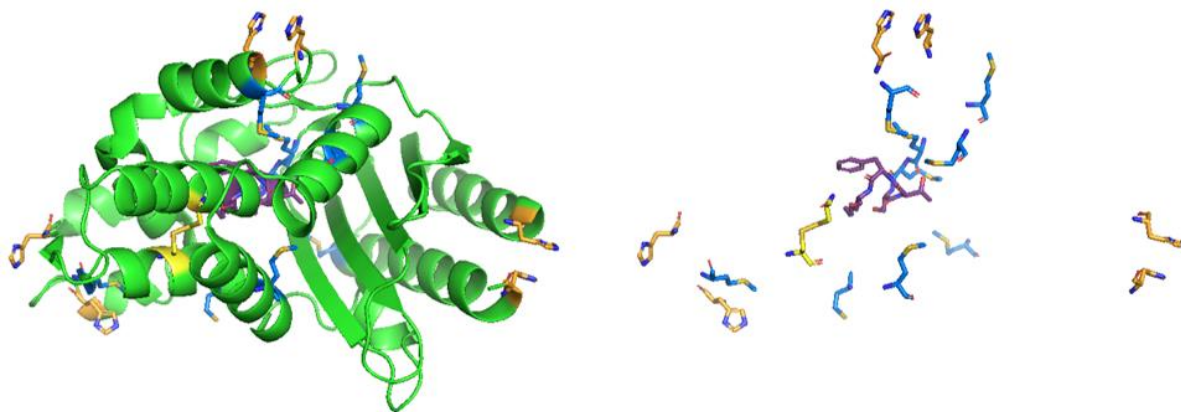
A TEM-1- $\beta$ -laktamáz, bár nem metalloenzim, rendelkezik lehetséges fémkötő helyekkel. Laboratóriumunkban ezt az enzimet nikkel(II)-affinitás kromatográfiás módszerrel sikerült tisztítani<sup>1</sup>, ami alátámasztja azt a feltételezést, hogy az enzim fémionokat köthet meg. Emiatt érdemes megvizsgálni, hogyan hatnak a különböző fémionok az enzimre, és hogyan viselkedik fémionok jelenlétében a  $\beta$ -laktám antibiotikumokkal szemben. TDK munkám során a nikkel(II), kadmium(II) és higany(II) fémionok hatását tanulmányoztam a TEM-1  $\beta$ -laktamáz enzim szerkezetére, illetve aktivitására.

## II. Irodalmi áttekintés

### 2.1. $\beta$ -laktamáz enzimek

A  $\beta$ -laktamázok a legelterjedtebb olyan enzimek, amelyek baktériumok rezisztenciáját biztosítják a béta-laktám antibiotikumokkal szemben. Az enzimek osztályozására két rendszert használnak: a Bush–Jacoby–Medeiros aktivitás-alapú rendszert és az Ambler rendszert, amely a szekvencia információkon alapul. Ez utóbbi a  $\beta$ -laktamázokat négy, A, B, C és D osztályba sorolja, amelyeket specifikus szekvencia-motívumok alapján azonosítanak, ugyanakkor a hidrolitikus mechanizmus alapvető sajátosságai is megkülönbözteti őket. Egy további felosztásban az aktív hely szerint az enzimek három osztálya (A, C és D) ún. szerin hidroláz, míg a B osztály egy vagy két fémiont igényel a katalitikus aktivitáshoz (metallo- $\beta$ -laktamázok vagy MBL-ek). Habár mind a négy osztály képviselői gyakoriak, mindegyik osztályon belül néhány enzimsalád látványosan sikeres volt, és széles körben elterjedt. Az A osztályban a TEM-1 a leggyakoribb, plazmid (cirkuláris DNS hordozó) által közvetített béta-laktamáz enzim (1. ábra), mely jelentősen hozzájárult a baktériumok béta-laktám antibiotikumokkal szembeni rezisztenciájához<sup>2-4</sup>.

MSIQHFRVALIPFFAAFCPLVFAHHPETLVKVKDAEDQLGARVGYIELDLNSGKILESFRPEERFPM~~MM~~STFKVLLGAVLSRIDAGQEQLGRRIHYSQNDLVEYSPVTEKHLTDGM  
TVREL~~S~~AAITMSDNTAANLLLTIGGPKELTAFLH~~N~~MGD~~H~~VTRLDRWEPELNEAIPNDERDTT~~M~~PVAMATT~~L~~RKLLTGELLTASRQLIDWMEADKVAGPLLR~~S~~ALPAGWF  
IADKSGAGERGSRGIIAALGPDGKPSRIVVITYTGSQATMDERNRQIAEIGASLIK~~H~~W



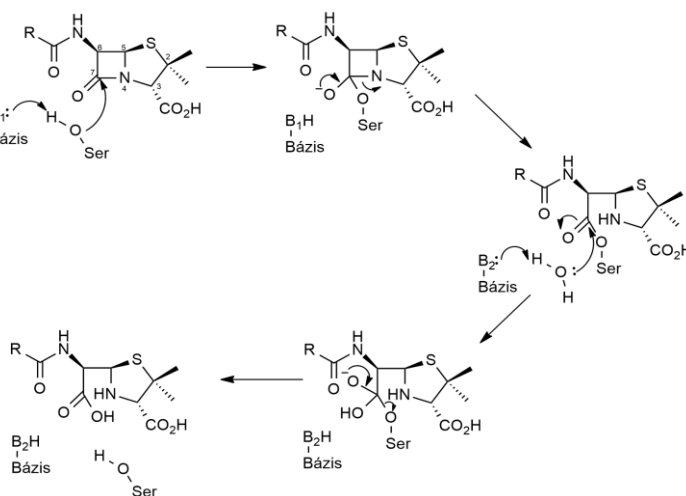
**1. ábra.** A TEM-1  $\beta$ -laktamáz enzim aminosav szekvenciája és 3D-szerkezeti ábrája. A jobb oldali ábrán kiemeltem a lehetséges fémkötő (His, Cys, Met) helyeket, és az aktív centrumot alkotó aminosavakat (PDB kód: 1zg4). Az ábra a PyMol programmal készült.

Az A osztályú  $\beta$ -laktamázok aktív helyén általában a négy jellemző motívum egyike található meg:  $S^{70}$ -X-X-K,  $S^{130}$ -X-N,  $K^{234}$ -T/S-G, és a  $\Omega$ -hurok. A TEM-1  $\beta$ -laktamázban az  $S^{70}$ -X-X-K motívum a 70. pozícióban szerin és a 73. pozícióban lizin aminosavat tartalmaz<sup>4</sup>.

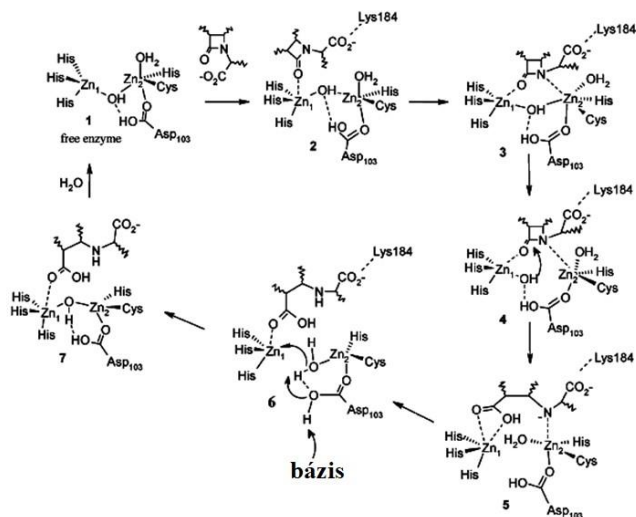
## 2.2. $\beta$ -laktamáz enzimek működési mechanizmusa

A  $\beta$ -laktamázok hatástalanítják a  $\beta$ -laktám antibiotikumokat azért, hogy katalizálják a  $\beta$ -laktám gyűrű hidrolízisét. A reakció a 2. ábrán bemutatott körfolyamatokkal írható le egy szerin, illetve egy metallo- $\beta$ -laktamáz esetében.

a)



b)

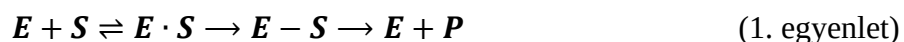


2. ábra. Egy szerin (a), illetve egy metallo- $\beta$ -laktamáz (b) működési mechanizmusának sematikus ábrája.<sup>3,5</sup>

Bár a szerin  $\beta$ -laktamázok három osztálya szekvenciában jelentősen különbözik, mindegyik egy acilezés-deacilezés mechanizmuson át segíti elő a reakció lejátszódását, ami a szerin proteázok működési mechanizmusára emlékeztet. A nukleofil tulajdonságú szerint egy bázis aktiválja, így az a hasadó  $\beta$ -laktám-amid karbonil-szenét támadja, létrehozva az acilenzim intermediert egy tetraéderes oxianion átmeneti állapoton keresztül (2. ábra (a) mechanizmusa). A következő lépésben egy vízmolekulát, az úgynevezett deacilező vizet, aktiválja egy bázis elősegítve az acilenzim hidrolízisét, és a termék felszabadulását.<sup>3</sup>

### 2.3. A $\beta$ -laktamáz enzimek által katalizált reakció kinetikája

A  $\beta$ -laktamázok legfontosabb jellemzője az, hogy képesek hidrolizálni a  $\beta$ -laktám antibiotikumokat. Mint ilyen, a hidrolitikus aktivitást (szubsztrátprofil) első vonalbeli paraméterként használták a  $\beta$ -laktamázok jellemzésében. A  $\beta$ -laktamázok ( $E$ ) úgy működnek, hogy először megkötik az  $\beta$ -laktám szubsztrátot ( $S$ ) egy nem kovalens Michaelis komplexben ( $E \cdot S$ ). Ebben a szakaszban az enzim és a szubsztrát disszociálhat, vagy a hidrolitikus reakció játszódik le úgy, hogy a legtöbb klinikailag fontos  $\beta$ -laktamáz esetében előbb egy acilenzim képződik egy szerin-hidroxilcsoportján ( $E-S$ ) keresztül, majd ennek a kovalens komplexnek a dezacilezése a felnyílt gyűrűs termék ( $P$ ) képződését eredményezi (1. egyenlet)<sup>6</sup>.

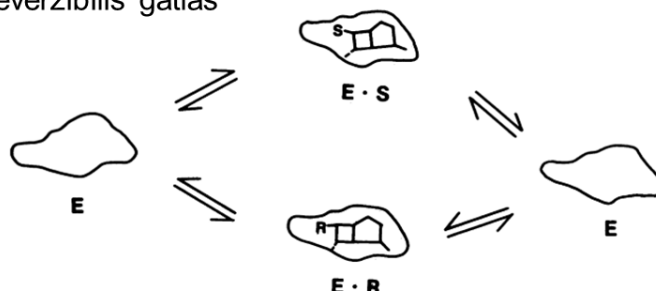


A hidrolízis sebessége meghaladhatja az egy enzim molekula által 1000 molekula hidrolizált antibiotikumot másodpercenként. Ezt az 1. egyenlet utolsó lépésére vonatkozó sebességi állandó adja meg, melyet  $k_{\text{cat}}$ -tal is szokás jelölni, és amely arányos a gyakorlatban sokszor mért  $V_{\text{max}}$  értékkel. Minden  $\beta$ -laktamáznak megvan a maga jellemző hidrolízissebesség-tartománya specifikus antibiotikum(ok)ra vonatkozóan. A létező  $\beta$ -laktamázok sokfélesége miatt szükségessé vált olyan kritériumok kidolgozása, amelyek alapján ezek az enzimek összehasonlíthatók. A  $\beta$ -laktamázok osztályainak megkülönböztetésére használható egyik fő jellemző az enzimek "szubsztrátprofilja". A szubsztrátprofilok számos olyan paraméteren alapulhatnak, amelyek a specifikus  $\beta$ -laktámok hidrolízisének sebességével kapcsolatosak.<sup>7</sup>

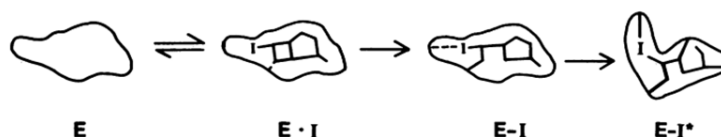
Az inhibitorok hatásának vizsgálata az enzimekre szintén alkalmas a katalitikus folyamatok jellemzésére. Az enzim inhibitor kölcsönhatás lehet reverzibilis vagy irreverzibilis. Az inhibitorok osztályának meghatározása azért fontos, mert jelzést ad a gátlás hatásának tartósságára vonatkozóan. A 3. ábrán a  $\beta$ -laktamáz inhibitorok két osztályát ábrázoló sémák láthatók. Reverzibilis inhibitorok azok, amelyek az enzimhez oly módon kötődnek, hogy az enzimaktivitás helyreállítható. A 2. egyenlet egy enzim ( $E$ ) és egy reverzibilis, nem kovalens inhibitor ( $R$ ) között létrejött egyensúlyt szemlélteti:<sup>7</sup>



Reverzibilis gátlás

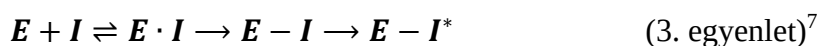


Irreverzibilis gátlás



**3.ábra.** Reverzibilis és irreverzibilis enzimgátlás sematikus ábrája<sup>7</sup>

Az aktív helyhez vagy ahhoz közel kötődő  $\beta$ -laktamázok inhibitorai gyakran  $\beta$ -laktámok. Bár ezek a molekulák inhibitorként működhetnek, szubsztrátként hidrolizálhatók is. Így sok reverzibilis inhibitor valóban gyenge szubsztrát, amelyek nagy affinitással kötődnek, de kis sebességgel hidrolizálnak. A reverzibilis inhibitorokat egy  $K_i$  egyensúlyi állandóval jellemezhetjük, amely a  $k_{-1}/k_1$  sebességi állandók arányával egyenlő. A  $K_i$  érték független a szubsztrát koncentrációjától, és az inhibitor enzimhez való affinitását jellemzi. Az irreverzibilis inhibitorok működéséhez általában véges időre van szükség. A gátlás ezen időfüggése a következő reakciósorozat eredménye:



ahol  $E$  az enzim,  $I$  az inhibitor,  $E \cdot I$  egy olyan reverzibilis komplex, amely szabad enzimmé és inhibitorra disszociálhat, vagy kovalens komplexet képezhet (acil enzim), az  $E - I$  és az  $E + I^*$  olyan inaktivált enzimet jelent, amely nem képes a szubsztrát feldolgozására.<sup>7</sup>

## 2.4. A Hg(II) affinitása a $\beta$ -laktamázokhoz

A Hg(II) főként a tiolokat (pl. cisztein), illetve a tioétereket (pl. metionin) tartalmazó fehérjékhez képes kötődni. A higanyvegyületek által kifejtett toxikus hatás leggyakrabban a Hg(II) szoros kötődésének tulajdonítható a kritikus enzimek olyan aminosavaihoz, mint a cisztein és a szelenocisztein. Az  $-SH$  csoport kulcsfontosságú az enzimaktivitás szempontjából. A Hg(II) kötődése során az  $-SH$  csoport kénatomjának nukleofilitása jelentősen lecsökken. Figyelembe kell venni, hogy a Hg(II) és más nehézfém-kationok a fehérje kitekeredését, aggregációját, és kicsapódását is okozhatják. Kén donoratomok hiányában a Hg(II) potenciális kötőhelye a hisztidin oldallánc is. A hard-soft elmélet alapján a Hg(II) soft Lewis sav, és ezáltal közepes affinitása van a N-alapú donorcsoportokhoz (1. táblázat).<sup>8</sup>

**1. táblázat.** 1:1 Hg(II):ligandum komplexek képződési állandói ( $K_f$ )<sup>8</sup>.

| S-tartalmú<br>ligandum  | $\log K_f$ | N-tartalmú<br>ligandum | $\log K_f$ |
|-------------------------|------------|------------------------|------------|
| $S^{2-}$                | 52,7       | $NH_3$                 | 8,80       |
| Merkaptoszukcinilsav    | 16,3       | $CH_3NH_2$             | 8,66       |
| Merkaptoecetsav         | 15,9       | Pirimidin              | 5,10       |
| $\beta$ -merkaptóetanol | 15,1       | Imidazol               | 3,57       |
| Cisztein                | 14,4       | Hisztidin              | 7,28       |
|                         |            | Hisztidin-Me-észter    | 5,33       |

### III. Célkitűzés

TDK munkám célja volt, hogy előállítsam és tisztítsam a TEM-1  $\beta$ -laktamáz fehérjét, valamint, hogy tanulmányozzam nikkel(II), kadmium(II) és higany(II)-ionok hatását az enzim oldatbeli szerkezetére, illetve katalitikus aktivitására. A tanulmányozni kívánt rendszerek meglehetősen bonyolultak, ezért céljaim eléréséhez kísérleteim során többféle módszert terveztem felhasználni a megfelelő részlépésekben:

- Fehérjetisztítás Ni(II)-ionaffinitás kromatográfiával, majd a tisztított fehérje koncentrációjának meghatározása UV abszorpciós spektrometriával.
- A fehérje oldatbeli szerkezetének vizsgálata cirkuláris dikroizmus spektroszkópia segítségével.
- Baktériumsejtek antibiotikum/fémion rezisztenciájának vizsgálata különböző fémionok jelenlétében M9 minimális tápoldatban.
- A különböző fémionot tartalmazó tápoldatokban növesztett baktériumtenyészetekből kinyert TEM-1  $\beta$ -laktamáz fehérje vizsgálata gélelektroforézissel.
- Ampicillin hidrolízisének vizsgálata TEM-1  $\beta$ -laktamáz enzim segítségével Hg(II) környezetében spektrofotometriás mérésekkel.

## **IV. Kísérleti rész**

### **4.1. Fehérjetisztítás**

#### *4.1.1. Első és második IMAC lépés*

A fehérjetisztításhoz Ni(II)-ionaffinitás kromatográfiát alkalmaztunk (IMAC: Immobilized metal ion affinity chromatography). A TEM-1  $\beta$ -laktamáz tartalmú sejt lizátumot kétszer tisztítottuk XK 16/20 oszlopon, amelyben Ni(II)-tartalmú IMAC Sepharose 6 FF gyanta volt. A lizátummal feltöltött oszlopot 4-5 oszloptérfogatnyi (CV) 100%-os A<sub>1</sub>(PBS: 0.14 M NaCl, 2.7 mM KCl, 10.0 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,3) pufferrel mostuk. A fehérjét a B<sub>1</sub> puffer (500 mM imidazol-t tartalmazó PBS) százalékos arányának növelésével a következő gradienssel eluáltuk: 0-50% 1,5 CV-ben (6 perc); 50% 2,0 CV esetén (8 perc); 50-100% 1,5 CV-ben (6 perc), majd 100% -on tartva 2,5 CV-ig (10 perc). A fehérjét tartalmazó frakciókban a puffert ultraszűréssel PBS-re cseréltük. A második IMAC lépésben a gyantára felvitt mintát 5 CV A<sub>2</sub> pufferrel (PBS, 250 mM NaCl) mostuk. A TEM-1  $\beta$ -laktamáz után növekvő arányú B<sub>2</sub> pufferrel (250 mM imidazol-t tartalmazó PBS) eluáltuk.

#### *4.1.2. Anioncsere*

Az utolsó tisztítási lépés anioncsere volt HiPrep QSepharose FF oszlopon (GE Healthcare/Bio-Science). A fehérjét 5 CV 20 mM Tris-HCl, pH 7,5 (A<sub>3</sub> puffer) mostuk, majd 1000 mM NaCl 20 mM Tris-HCl-ben (B<sub>3</sub> puffer), pH 7,5 gradienssel eluáltuk a következőképpen: 0-60% 4,5 CV (18 perc); 60% 2,5 CV esetén (10 perc), majd 100% 4 CV esetén (16 perc). A mérés során 7 ml-enként gyűjtöttünk frakciókat, majd az elúciós frakciók pufferét végül ultraszűréssel 20 mM Tris-HCl-re (pH 7,5) cseréltük.

### **4.2. A tisztított TEM-1 $\beta$ -laktamáz vizsgálata SDS PAGE módszerrel**

#### *4.2.1. SDS PAGE alapjai*

A különböző fehérjék molekulaméretük és töltésük szerint gélelektroforézissel egymástól elválaszthatók, mivel ezek a tényezők határozzák meg, hogy milyen sebességgel haladnak a gélben az elektroforézis során. Az SDS PAGE módszer magában foglalja a fehérjék denaturálását nátrium-dodecil-szulfát (SDS) detergenssel, és egyenáramú elektromos feszültség hatására a poliakrilamid gélben történő vándorlást, amit poliakrilamid gélelektroforézisnek (PAGE) neveznek. Az SDS erősen kötődik a fehérjékhez. Átlagosan egy detergens molekula kötődik két aminosavhoz, ha az SDS 0,1%-ban van jelen. SDS-sel

forralva tehát a fehérjék molekulaméretükkel arányos negatív töltést kapnak, és így molekulaméretüknek megfelelően haladnak a poliakrilamid gélben. Minél kisebb a fehérje mérete, annál gyorsabban halad át a gél pórusain. A poliakrilamid gél akrilamid monomerek és a megfelelő térhálósító anyag monomerek megfelelő arányban történő polimerizálásával állítják elő. A leggyakrabban használt térhálósító szer az N,N'-metilén-bisz-akrilamid. A polimerizációt általában ammónium-perszulfáttal (APS) indítják, és a reakciót N,N,N',N'-tetrametilén-diamin (TEMED) katalizátor hozzáadásával gyorsítják. A növekvő poliakrilamid láncok térhálósításával háromdimenziós hálózat jön létre. Az akrilamid és a térhálósító szer koncentrációja határozza meg a polimerek hosszát és a térhálósodás mértékét, ami viszont befolyásolja a gél fizikai tulajdonságait, például a sűrűséget, rugalmasságot, törékenységet, és ami a legfontosabb, a pórusméretet. Ezért gondosan meg kell fontolni az akrilamid koncentráció kiválasztását a különböző fehérjék optimális elválasztása érdekében. A nagy pórusméretű gélek lehetővé teszik a nagyméretű fehérjék gyorsabb futását, míg a nagy sűrűségű gélek lassítják a nagy fehérjéket, lehetővé téve a kisebb molekulák jobb elválasztását<sup>9</sup>.

#### *4.2.2. Tisztított TEM-1 $\beta$ -laktamáz vizsgálata SDS PAGE módszerrel*

A TEM-1  $\beta$ -laktamáz tisztítását 12,5 tömeg/térfogat (w/v) % nátrium-dodecilszulfát-poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS PAGE) követtük. Hét festetlen fehérje keverékét (116, 66,2, 45, 35, 25, 18,4, és 14,4 kDa) alkalmaztuk molekuláris markerként (Thermo Scientific #26610). A kísérletet szobahőmérsékleten, 70 V-on 30 percig, majd 120 V-on 150 percig végeztük, katódpufferként 0,1 M Tris-HCl-t, 0,1 M tricint és 0,1 % (w/v) SDS-t, pH 8,3, anódpufferként 0,2 M Tris-HCl, pH 8,9 alkalmaztunk.

#### **4.3. Tisztított fehérje koncentrációjának meghatározása**

Az SDS PAGE alapján egyesített tisztított fehérjét tartalmazó frakciók koncentrációját Agilent termosztálható UV-VIS spektrométerrel vizsgáltam 210-350 nm hullámhossz-tartományban. A mérést 25°C-on 1,0 cm-es szűkített kvarcküvetében végeztem.

## 4.4. Cirkuláris dikroizmus spektroszkópiás vizsgálatok

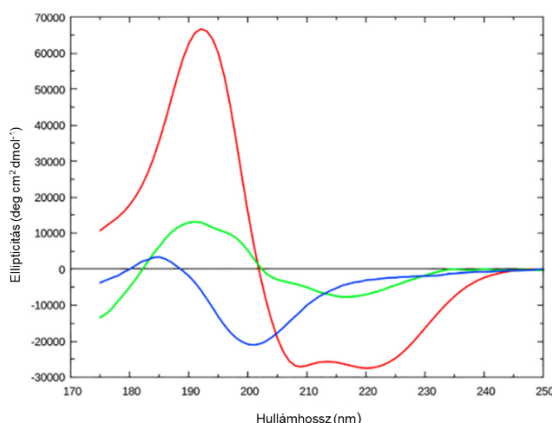
### 4.4.1. A cirkuláris dikroizmus spektroszkópia alapjai

Fémionokat különböző koncentrációban tartalmazó TEM-1  $\beta$ -laktamáz enzimoldatokat cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópiával vizsgáltuk. A CD spektroszkópia a balra, illetve jobbra cirkulárisan polarizált fény elnyelésének különbségén alapszik, és olyan optikailag aktív molekulák jellemzésére használják. Amikor egy lineárisan polarizált fénycsugár halad át egy optikailag aktív kiralis vegyületen, elliptikusan polarizált fénycsugár jön létre.

$$\phi = \frac{\pi}{\lambda(\eta_l - \eta_r)}$$

Az ellipticitás ( $\phi$ ) ezzel az egyenlettel adható meg, ahol  $\eta_l$  és  $\eta_r$  a balra, illetve jobbra cirkulárisan polarizált fény abszorpciós indexe  $\lambda$  hullámhosszon.

A CD spektrumból különböző információ nyerhető ki, attól függően, hogy távoli vagy közeli UV hullámhossz-tartományban végezzük a mérést. A távoli-UV (160-240 nm) spektrum a fehérje másodlagos szerkezetéről ad információt, ahol a kromofór a peptidkötés. A másodlagos szerkezet az aminosavak térbeli elrendeződését írja le, amely lehet  $\alpha$ -hélix,  $\beta$ -redő, kanyar és egyéb/rendezetlen. A másodlagos szerkezeti elemekre eltérő alakú és intenzitású távoli UV-CD spektrum jellemző. A távoli-UV 190-220 nm hullámhossz-tartományában a fehérje peptidkötésében 220 nm-nél  $n-\pi^*$ , 190 nm-nél  $\pi-\pi^*$  átmenet történhet, ez a két átmenet keveredik a fehérje kiralis környezetében, és sajátos spektrumot eredményez a fehérjében jelenlévő minden egyes másodlagos szerkezeti elem számára. (4.ábra)



4. ábra. Egy  $\alpha$ -hélix (piros),  $\beta$ -redő (zöld) és egy véletlen gombolyag fehérjére (kék) jellemző CD spektrum<sup>10</sup>.

A  $\pi$ - $\pi^*$  átmenet 190 nm-nél pozitív, míg 208 nm-nél negatív csúcsot eredményez  $\alpha$ -hélixnél, amellet negatív csúcsot eredményez 220 nm-nél a  $n$ - $\pi^*$  átmenet, míg, amint az a 4. ábrán is látható az egyéb szerkezetekre jellemző spektrumok ettől eltérőek.<sup>10</sup> A „tisztá” másodlagos szerkezetekre jellemző CD spektrumok alapján, azok lineáris kombinációjával lehetséges a mért CD spektrumokból az adott fehérje másodlagos szerkezeti összetételének becslése. A fehérje harmadlagos szerkezete a háromdimenziós szerkezet, amiről a közeli UV hullámhossz-tartományban mért CD spektrum ad információt. Azonban e sávok kis intenzitása miatt ilyen méréshez jóval nagyobb mennyiségű fehérje szükséges, mint a távoli UV tartományban végzett mérésekhez

#### 4.4.2. A CD mérés menete

A TEM-1  $\beta$ -laktamáz enzim  $\alpha$ -hélixekben gazdag szerkezetét Hg(II), Ni(II) és Cd(II) fémionok jelenlétében vizsgáltuk 2:1, 5:1 és 10:1 fémion:enzim arányoknál. A méréseket egy Jasco J-1500 CD spektrométerrel végeztük 300-180 nm hullámhossz-tartományban, 0,2 mm úthosszú Hellma kvarc küvettával, 1,0 nm sávszélesség, 50 nm/perc pásztázási sebesség, folyamatos pásztázási üzemmód beállításokkal.



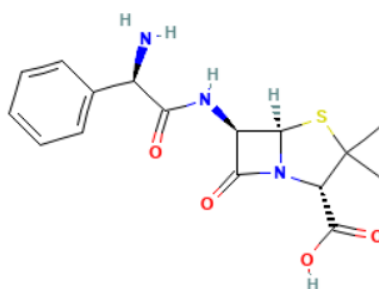
**5.ábra.** A Jasco J-1500 CD spektrométer

#### **4.5. Fémionokat tartalmazó M9 tápoldatban szaporított baktériumsejtek ellenálló-képességének vizsgálata**

Az M9 minimál tápoldat a baktériumsejtek szaporodásához minimálisan szükséges anyagokat tartalmazza. Az ilyen tápoldat alkalmas lehet arra, hogy a hozzáadott fémionok baktériumsejtekre gyakorolt hatását tanulmányozzuk. 1L M9 tápoldat elkészítéséhez felhasznált anyagok:

- 7,5 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- 3,0 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- 0,5 g  $\text{NaCl}$
- 1,0 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$
- vízzel 1L-re egészítjük ki.

Ezt az oldatot 1 órán keresztül autoklávban sterilizáltuk, majd adtunk hozzá 10 ml 20% D-glükózt, 2 ml 1 M  $\text{MgSO}_4$ -ot, és 100  $\mu\text{l}$  1 M  $\text{CaCl}_2$ -ot. A TEM-1  $\beta$ -laktamáz termelő sejteket tartalmazó LB tápoldatot 15 °C-on 15 percig centrifugáltuk, majd a sejteket M9 tápoldattal mostuk, és ismét centrifugáltuk 15 percig. Ezt követően új M9 tápoldatot adtunk a sejtekhez, és felfuszpendálás után még annyi tápoldatot, hogy az  $\text{OD}_{600}$  0,6 alatti érték legyen. A laboratóriumunkban található műszer McFarland egységeket mér. A McFarland sztenderdeket arra használjuk, hogy egy szuszpenzióban a baktériumok számát hozzávetőlegesen meghatározzuk turbiditás méréssel. 1,0 McF közelítőleg  $3 \times 10^8$  sejt/ml, és 1,0  $\text{OD}_{600}$  közelítőleg  $8 \times 10^8$  sejt/ml<sup>12,13</sup>. A mért érték 1,38 McF lett. Ehhez adtuk hozzá a 2. táblázat (ld. később az eredmények tárgyalásánál) alapján a fémionokat, illetve izopropil- $\beta$ -D-tiogalaktopiranozidot (IPTG). Az IPTG a laktóz egyfajta nem metabolizálható analógja, amelyet széles körben használnak heterogén génexpresszióra<sup>11</sup>. Ennek hatására a TEM-1  $\beta$ -laktamáz enzim túltermelődik a sejtekben. Egyes baktériumtenyészetekhez Ampicillin (Amp – 6. ábra) antibiotikumot is adtunk összehasonlítás céljából.

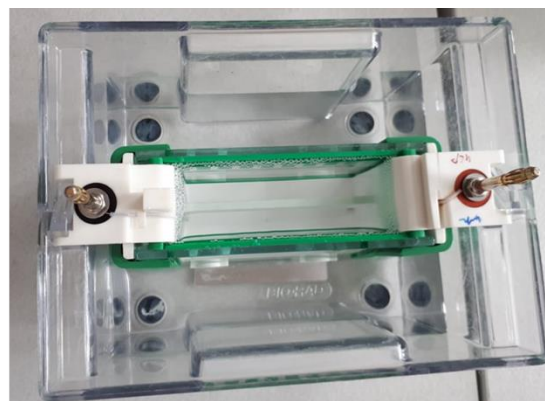


**6. ábra.** Az ampicillin szerkezeti képlete<sup>12</sup>

Ezt követően az oldatok McFarland értékeit rögzítettük óránként mintát véve a sejttenyészetekből.

#### **4.6. A fémionok hatása a fehérjék kifejeződésére**

Az SDS PAGE méréshez először elkészítettük az elválasztó gél, ami 5,75 ml 30%-os akrilamid/bisakrilamid (19:1) oldatot, 1,81 ml 87%-os glicerint, 3,75 ml gél puffert (3 mol/dm<sup>3</sup> Tris + 0,3% SDS), 52 µL 10%-os APS-t és 5,2 µL TEMED-t tartalmazott. Ezt követően elkészítettük a gyűjtő gél, ami 0,5 ml 30%-os akrilamid/bisakrilamid (19:1) oldatot, 2,32 ml MilliQ minőségű vizet, 0,94 mL gél puffert (3 mol/dm<sup>3</sup> Tris + 0,3% SDS), 33 µL 10% APS-t, és 3,3 µL TEMED-t tartalmaz. A két üveglap közé először az elválasztó gél pipettáztam, majd erre jött a gyűjtő gél, beletettük a fésűt és vártunk míg a gél megszilárdult. A készülékben az üveglapok közötti térbe került a katód puffer (0.1M Tris-HCl, 0.1 M tricine, és 0.1% (w/v) SDS, pH 8.3), kívülre pedig az anód puffer (0.2 M Tris-HCl, pH 8.9). Miután a gél megszilárdult az üveglapok között, behelyeztem a készülékbe. Az eltávolított fésű helyén kapott zsebekbe 20-20 µL-t pipettáztam az előző eljárásnál készített 16 oldatból kinyert, denaturált mintából. A gélelektroforézist 70 V-on 30 percig, majd 120 V-on 180 percig végeztem.



**7.ábra.** SDS PAGE mérés

Az elektroforézis kísérlet befejezése után az üveglapok közül kivettük a poliakrilamid gél, és (Coomassie Brilliant Blue) CBB-t (CBB:metanol:ecetsav 10:1:20 +víz) adva hozzá ráztatás közben inkubáltuk szobahőmérsékleten 30-45 percig. Ezt követően ecetsav oldattal rázva inkubáltuk (250 rpm) 30-60 percig szobahőmérsékleten, melynek segítségével eltávolítottuk a felesleges festéket a gélből, hogy csak a fehérjékhez tartozó sávokat lássuk a gélen.

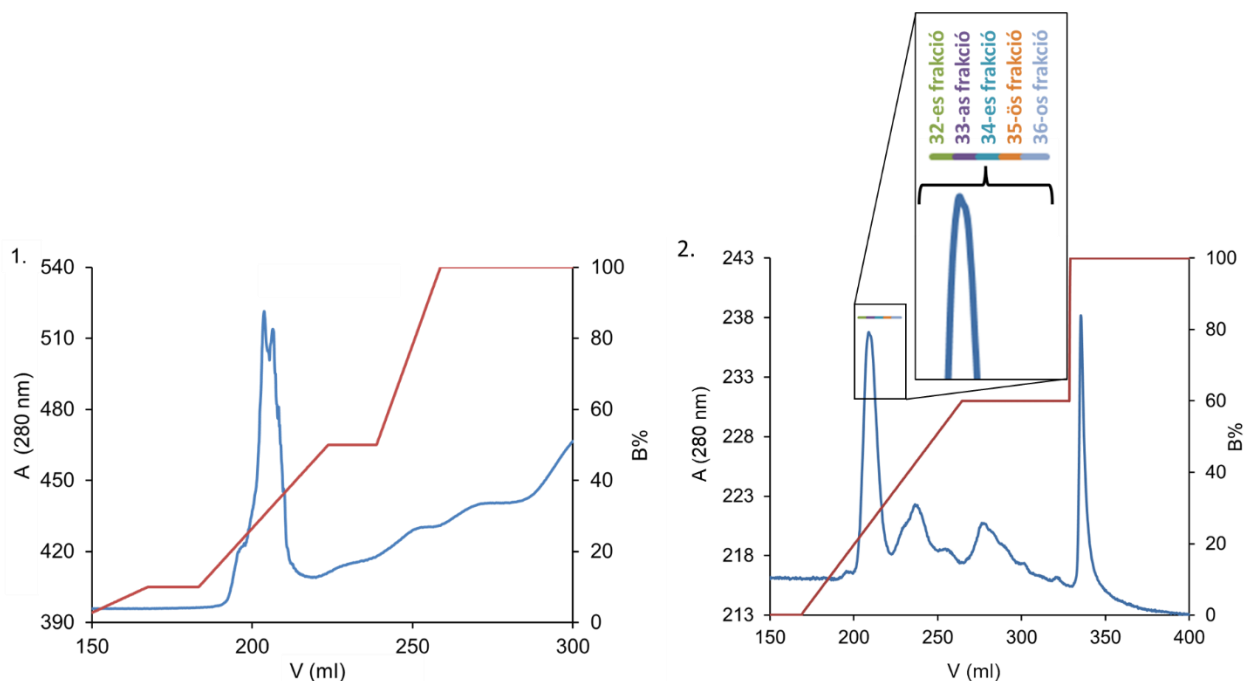
#### **4.7. TEM-1 $\beta$ -laktamáz aktivitásának meghatározása**

A TEM-1  $\beta$ -laktamáz aktivitását UV abszorpciós spektrometriával határoztam meg 230  $\mu$ M, illetve 930  $\mu$ M koncentrációjú ampicillin szubsztrát hidrolízisén keresztül 1,00 ml 20 mM Tris-HCl (pH 7,5) pufferben oldott 230  $\mu$ M Amp-t kevertünk össze a tisztított enzimmel úgy, hogy annak végkoncentrációja 0,80 nM, illetve 0,27 nM legyen. Ezután 1,00 ml 20 mM Tris-HCl (pH 7,5) pufferben oldott 930  $\mu$ M Amp oldathoz adtunk tisztított enzimet 0,80 nM, illetve 2,40 nM végkoncentrációban. A reakciót Cary 3500 UV-Vis kétsugaras, többcellás spektrofotométerrel követtük 25 °C-on szabályozott hőmérsékleten (Agilent Technologies) 210–300 nm hullámhossz intervallumban 1 cm úthosszú kvarc küvettában (Hellma)

## V. Eredmények bemutatása és értékelése

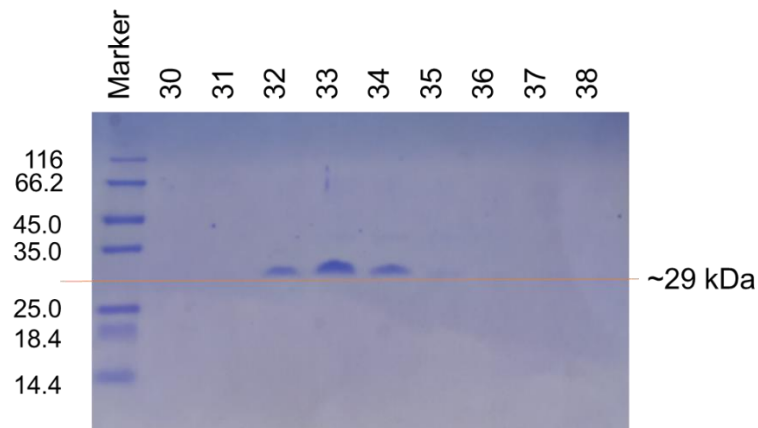
### 5.1. Fehérjetisztítás és a tisztított TEM-1 $\beta$ -laktamáz vizsgálata SDS PAGE módszerrel

A fehérjetisztítást a kísérleti részben leírtak alapján végeztem Ni(II)-ionaffinitás kromatográfiát alkalmazva. A fehérjetisztítás három lépésben valósult meg, majd az anioncsere után SDS PAGE-el vizsgáltam a fehérjetartalmú frakciókat.



**8.ábra.** A TEM-1  $\beta$ -laktamáz tisztítása során 1.) a második IMAC lépés és 2.) az anioncsere lépésben mért kromatogramok .

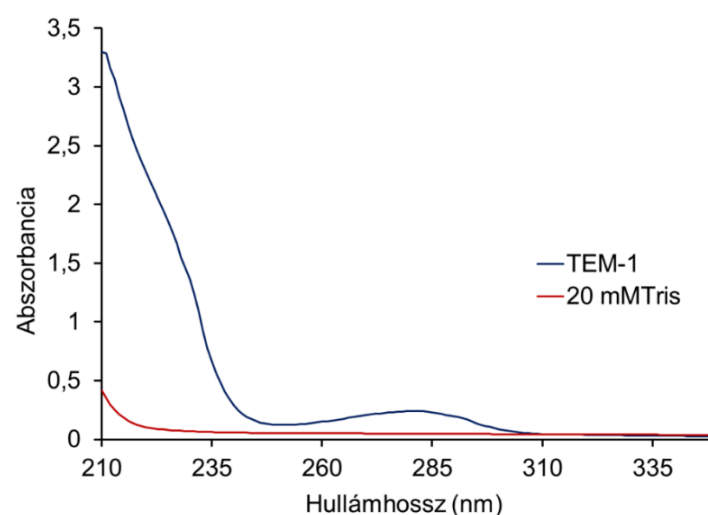
A 8. ábra mutatja a 2. IMAC lépés és az anioncsere során mért kromatogramokat, feltüntetve az abszorbancia értékeket a térfogat függvényében, illetve a B% változást. Az anion csere során kapott kromatogramon kinagyítva feltüntettem, a 32-es, 33-as, 34-es, 35-ös és 36-os frakciókat. Az SDS PAGE eredményéből (9. ábra) látható, hogy a ~29 kDa molekulaméretű TEM-1  $\beta$ -laktamázt ezek a frakciók tartalmazták.



**9.ábra.** A fehérje tisztítása során gyűjtött frakciók SDS PAGE vizsgálata

## 5.2. A fehérjekoncentráció meghatározása

A fehérjeoldatok koncentrációjának meghatározása nem egyszerű feladat. Az eddigi nagyszámú vizsgálatok alapján felhalmozott adatbázisból egy adott fehérjére – annak aminosav szekvenciája alapján – becsülhető a 280 nm-hez tartozó moláris abszorbancia. Előzőleg már bebizonyosodott, hogy az első ábrán bemutatott, a hordozó DNS által kódolt szekvencia helyett a tisztított fehérjében az N-terminális 23 aminosav hiányzik. Ezt a szekvenciát a sejtekben egy proteáz enzim hasítja le, így csak a katalitikusan aktív 24–286 szekvencia jut ki a baktériumsejt periplazmikus terébe. Erre a tisztított TEM-1  $\beta$ -laktamázra  $\epsilon_{280} = 28085 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  érték becsülhető az ExPASy<sup>13</sup> program segítségével. Ennek alkalmazásával spektrofotometriás mérésekkel jó közelítéssel megadható egy tiszta fehérjeoldat koncentrációja.

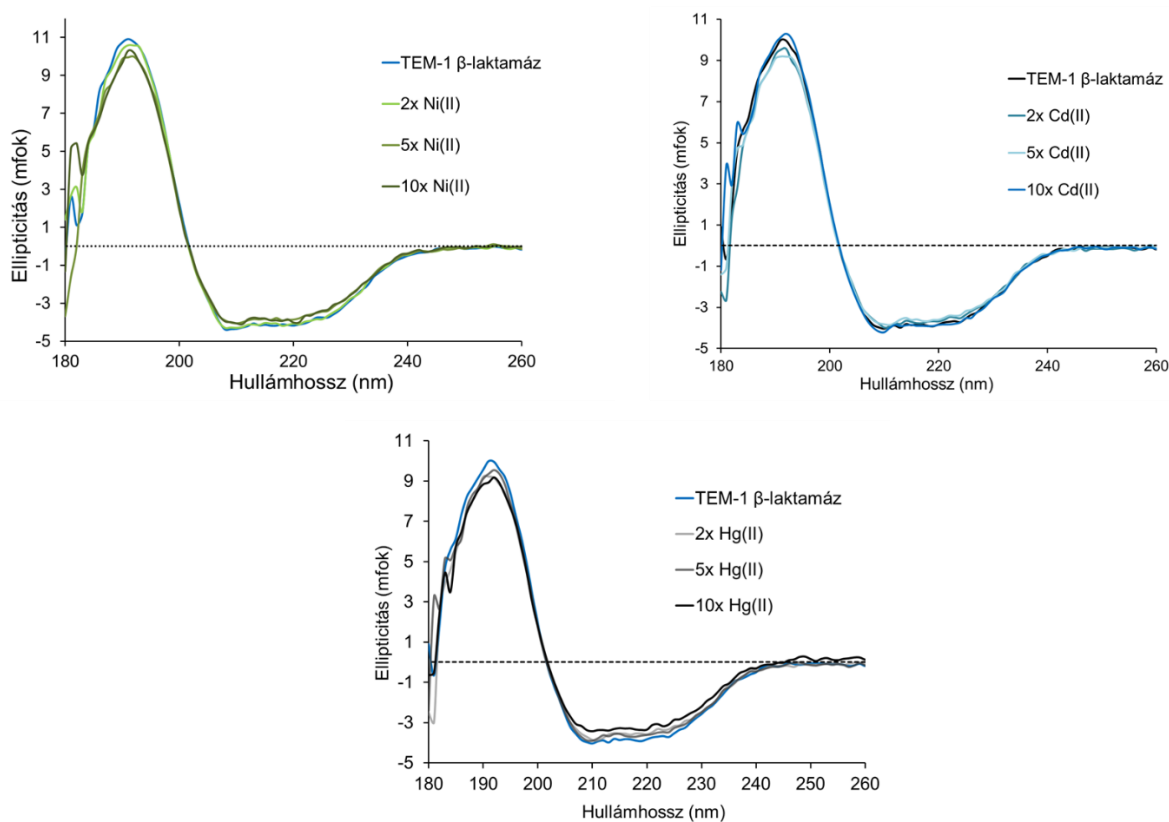


**10.ábra.** Tisztított TEM-1  $\beta$ -laktamáz koncentrációjának meghatározása UV abszorpciós spektrométerrel

A tisztított fehérje UV abszorpciós spektrumáról 280 nm-nél leolvasott abszorbancia érték és a Lambert-Beer törvény alapján meghatároztam a fehérje koncentrációját, ami 8,60  $\mu\text{M}$  lett.

### 5.3. Cirkuláris dikroizmus spektroszkópiás vizsgálatok

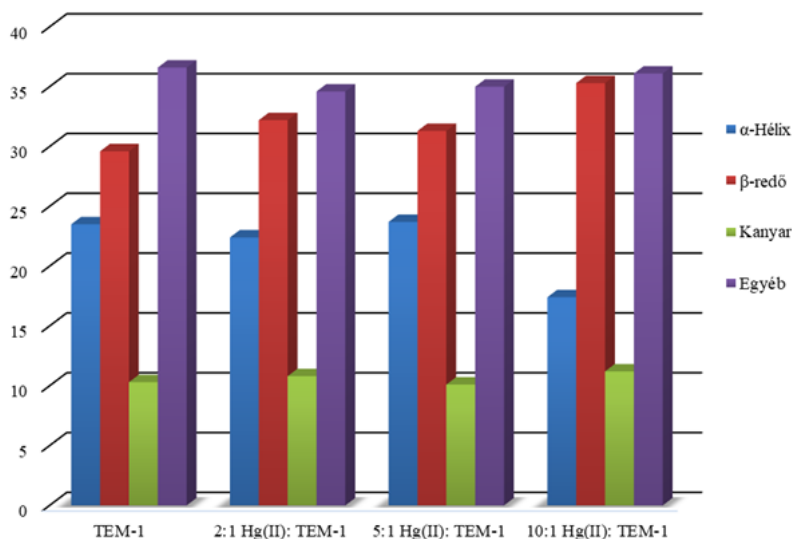
Cirkuláris dikroizmus mérések segítségével tanulmányoztuk, hogy milyen hatást fejtenek ki a hozzáadott Ni(II), Hg(II) és Cd(II) fémionok a TEM-1  $\beta$ -laktamáz másodlagos szerkezeti összetételére.



**11. ábra.** A különböző arányban Ni(II)-t, Cd(II)-t és Hg(II)-t tartalmazó TEM-1  $\beta$ -laktamáz CD-spektruma

A mért spektrumok alapján (11. ábra) az tapasztalható, hogy a fémionokat tartalmazó oldatok legfeljebb csak kis mértékben csökkentik az  $\alpha$ -hélix mennyiségét. Ez alól csak a tízszeres koncentrációban lévő Hg(II)-ionokat tartalmazó oldat kivétel, ahol az  $\alpha$ -hélix-tartalom nagyobb mértékű csökkenése tapasztalható (12. ábra). Ez azért lehetséges, mert a Ni(II), és a Cd(II) a TEM-1  $\beta$ -laktamáz molekula felszínén lévő, egymáshoz közeli hisztidinekhez kötődik, míg a Hg(II) soft jellege miatt a fehérje szerkezetének belsejében

lévő diszulfidhídban, illetve a metionin aminosavakban található kén donoratomokhoz kötődhet (1. ábra). Emiatt nagyobb mértékben befolyásolhatja az enzim szerkezetét.



**12. ábra.** Az  $\alpha$ -hélix,  $\beta$ -redő, kanyar és egyéb másodlagos fehérjeszerkezetek változása a különböző arányban Hg(II)-t tartalmazó a TEM-1  $\beta$ -laktamázban. Az ábra a BestSel programmal számolt adatok alapján készült.<sup>14</sup>

Az 12. ábrán látható hogy a TEM-1  $\beta$ -laktamáz másodlagos fehérjeszerkezetéhez képest a 10:1 arányban Hg(II)-t tartalmazó oldatban tér el leginkább a fehérjeszerkezet összetétele. Az  $\alpha$ -hélix szerkezet aránya ebben az esetben  $\sim 5$  %-kal csökken, és hozzávetőlegesen ennyivel nő a  $\beta$ -redő másodlagos fehérje szerkezet aránya.

#### **5.4. Fémionokat tartalmazó M9 tápoldatban szaporított baktériumsejtek ellenálló-képességének vizsgálata**

További kísérleteink során azt vizsgáltuk meg, hogy a Ni(II), Cd(II), illetve Hg(II) ionok jelenléte befolyásolja-e az *E. coli* baktériumsejtek szaporodását. Ennek érdekében M9 minimál tápoldatot alkalmaztunk, melyben nincsenek jelen olyan ismeretlen összetevők, pl. a fémionokat komplexáló ligandumok, mint a gyakran alkalmazott LB tápoldatban. Így a mérés körülményei könnyebben ellenőrizhetők, illetve változtathatók. A reakcióelegyet a 2. táblázat alapján állítottuk össze.

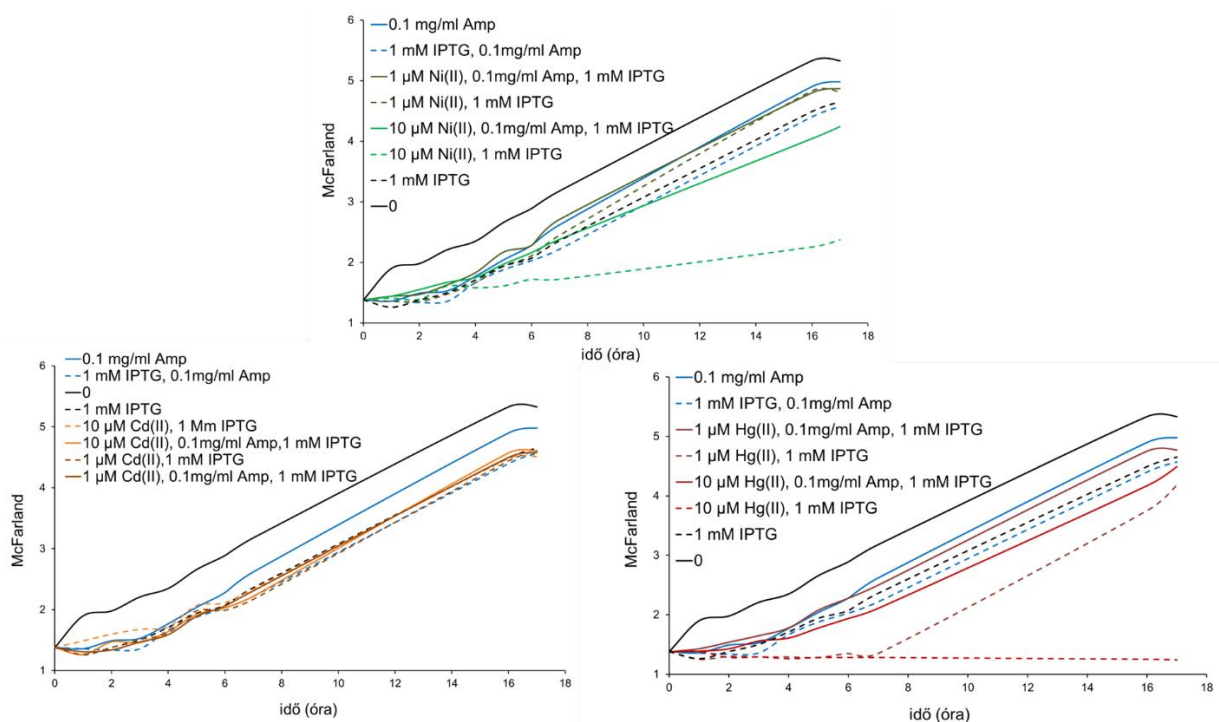
**2. táblázat.** A baktériumtenyészetekhez hozzáadott reagensek végső koncentrációi.

(+ : az oldat tartalmazza, - : az oldat nem tartalmazza)

| Oldatok száma | 269 $\mu$ M Amp | Hg(II)     | Ni(II)     | Cd(II)     | IPTG 1mM |
|---------------|-----------------|------------|------------|------------|----------|
| 1             | +               | -          | -          | -          | -        |
| 2             | +               | -          | -          | -          | +        |
| 3             | +               | 1 $\mu$ M  | -          | -          | +        |
| 4             | -               | 1 $\mu$ M  | -          | -          | +        |
| 5             | +               | 10 $\mu$ M | -          | -          | +        |
| 6             | -               | 10 $\mu$ M | -          | -          | +        |
| 7             | +               | -          | 1 $\mu$ M  | -          | +        |
| 8             | -               | -          | 1 $\mu$ M  | -          | +        |
| 9             | +               | -          | 10 $\mu$ M | -          | +        |
| 10            | -               | -          | 10 $\mu$ M | -          | +        |
| 11            | +               | -          | -          | 1 $\mu$ M  | +        |
| 12            | -               | -          | -          | 1 $\mu$ M  | +        |
| 13            | +               | -          | -          | 10 $\mu$ M | +        |
| 14            | -               | -          | -          | 10 $\mu$ M | +        |
| 15            | -               | -          | -          | -          | +        |
| 16            | -               | -          | -          | -          | -        |

Az 1. és 2. oldat csak IPTG tartalmában tér el, a változásuk az ábrán megegyezik, csak az IPTG tartamú 2. oldat McFarland értéke alacsonyabb. Ez a vártnak megfelelő, mivel az IPTG a fehérje expresszióját indukálja, és emiatt a baktériumsejtek szaporodásának mértéke csökken.

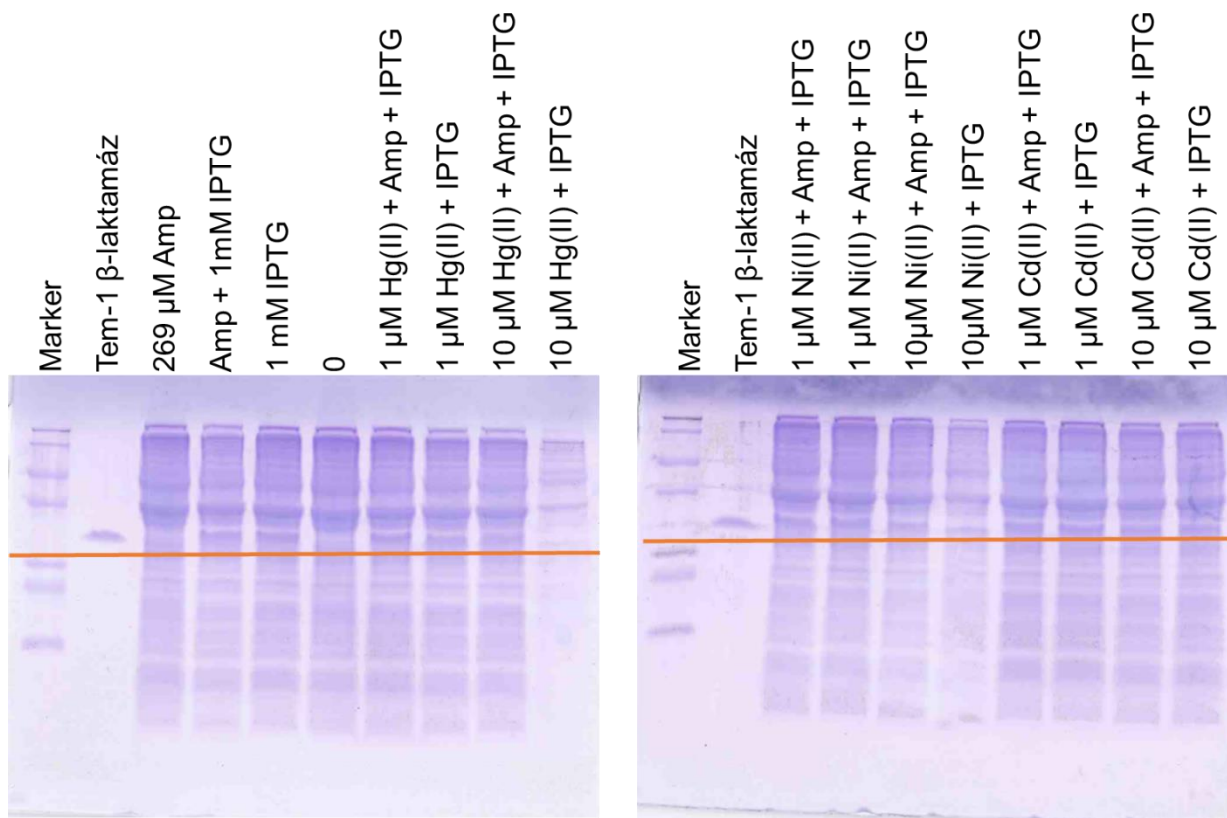
A kapott grafikonokról látható (13.ábra), hogy kiugróan alacsony McFarland értéket mutat a 6. és a 10. tápoldat, melyek 10-10  $\mu$ M Hg(II)-t ill. Ni(II)-t tartalmaztak. Ezek csak az Amp-tartalmukban térnek el az 5., illetve a 9. oldattól. Az antibiotikumot nem tartalmazó 6-os oldatban drasztikusan csökkent a baktériumsejtek száma, és a 10. tápoldatban is a sejtnövekedés jelentős csökkenése tapasztalható a többihez képest. Ugyanakkor az antibiotikum jelenlétében a fémionok baktériumsejtek szaporodására gyakorolt hatása nem figyelhető meg. Szintén eltérő görbe mérhető a 4. oldatban, melynek McFarland értéke kezdetben nem nő, csak jóval később, mint a többi oldaté. Ez az oldat sem tartalmaz Ampicillint miközben 1  $\mu$ M koncentrációjú Hg(II) található benne. A fentiek egyértelműen igazolják a Hg(II) és a Ni(II) toxikus hatását, azonban ez valószínűleg inkább közvetlen hatás, ami nem hozható kapcsolatba a TEM-1  $\beta$ -laktamáz enzim gátlásával. Lehetséges, hogy a fémionok magával az antibiotikummal is kölcsönhatásba kerülhetnek, és emiatt toxikus hatásuk az enzimre, illetve a sejtekre kevésbé érvényesül. Ezek az eredmények a rendszer bonyolultsága miatt azonban nem magyarázhatók egyszerűen és egyértelműen.



**13. ábra.** TEM-1  $\beta$ -laktamáz enzimet termelő sejtek számának változása időben a különböző koncentrációjú Hg(II)-t, Ni(II)-t, Cd(II)-t tartalmazó M9 tápoldatokban.

### 5.5. A fémiont tartalmazó tápoldatokban kifejezett fehérjék vizsgálata gélelektroforézissel

Az előző fejezetben alkalmazott sejtek teljes fehérjetartalma látható a 14. ábrán, ahol a 1. oszlop mindkét képen a fehérjemarker, a 2. az összehasonlítóként használt tisztított TEM-1  $\beta$ -laktamáz. A baloldali gélen látható 0 jelöli, hogy ott nem adtunk semmit az oldathoz, a többi gélhez képest. A 14. ábrán látható, hogy a 2. táblázat alapján 1-es, 16-os, 6-os, 10-es mintákban nincs TEM-1  $\beta$ -laktamáz. Az 1. és 16. mintákhoz nem adtunk IPTG-t emiatt itt nem is vártuk a fehérje túltermelését. A 6-os és 10-es oldatnak már a McFarland értéke is kiugróan alacsony volt, így az enzim hiánya inkább a sejtek életképtelenségének tulajdonítható. A 4-es és 5-ös oldatoknál halványabb a sáv, vagyis kevesebb TEM-1  $\beta$ -laktamáz található, azonban ezen oldatok McFarland értéke is kisebb a többinél. A fentiek szintén az Ampicillint nem tartalmazó tápoldatokban a fémionok mérgező hatásának jobb érvényesülését mutatják.



**14. ábra.** A 2. táblázatban feltüntetett különböző koncentrációban Hg(II)-t (baloldali ábra), Ni(II)-t, Cd(II)-t (jobboldali ábra) tartalmazó TEM-1  $\beta$ -laktamáz enzim gélelektroforézis vizsgálata.

### 5.6. Kinetikai vizsgálatok

A mérési eredményekből a TEM-1  $\beta$ -laktamáz enzim átlagos fajlagos aktivitása egyszerűen számolható ampicillin szubsztrátra. A számítást a katalitikus görbe lineáris tartományának felhasználásával végeztük. Elsőként meghatároztuk az ampicillin ( $\epsilon = 1920,6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) és a feltételezett hidrolízis termék ( $1040,7 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) moláris abszorbancia értékét. Ezek jó egyezést mutatnak az irodalmi adatokkal.<sup>15–17</sup> Ennek megfelelően 1 mg enzim  $596 \pm 25 \text{ } \mu\text{mol}$  ampicillint tudott 1 percen belül  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ -on hidrolizálni (20 mM Tris-HCl (pH 7,5)), az irodalomban nem találtunk közvetlenül összehasonlítható adatokat az ampicillin hidrolízisére azonos körülmények között. Mindazonáltal ez a specifikus aktivitás jól összehasonlítható a Sigma-Aldrich által forgalmazott  $\beta$ -laktamáz (L-6170) fajlagos aktivitásával, amely 7,0 pH-értéknél percenként  $\geq 400 \text{ } \mu\text{mol}$  szubsztrátot (penicillin G) hidrolizál  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ -on.

A kinetikai mérések kiértékelése azonban bonyolultnak bizonyult, nem várt nehézségek miatt. Ilyen volt például a szubsztrát továbbalakulása. Emiatt a Michaelis-Menten modellt (1. egyenlet) ki kellett bővítenünk a rendszer leírásához. A dolgozat benyújtása időpontjában az értékelés folyamatban van. A katalitikus folyamatok részletesebb megismerése a jövőben további vizsgálatokat igényel.

## VI. Összefoglalás

Munkám során a TEM-1  $\beta$ -laktamáz enzim által biztosított antibiotikum rezisztenciát tanulmányoztam toxikus fémionok jelenlétében. A vizsgálatokhoz sikeresen tisztítottam fehérjét, vizsgáltam, majd határoztam meg a koncentrációját.

Sejttenyészetekben azt figyeltük meg, hogy az Ampicillin antibiotikum jelenlétében a sejtek jobban növekedtek. Ez arra utalt, hogy az antibiotikum képes lehet a toxikus fémionokkal kölcsönhatást kialakítani és ezáltal azok toxicitását csökkenteni. Azokban a sejttenyészetekben, ahol a fémionok toxikus hatása jobban érvényesült, kevesebb enzim termelődött.

A CD-spektrumokból látható, hogy a Cd(II) és a Ni(II) nem változtatott jelentősen a TEM-1  $\beta$ -laktamáz  $\alpha$ -hélix szerkezetén, azonban a Hg(II):enzim 10:1-es arány mellett már eltérés volt megfigyelhető.

Az aktivitás-vizsgálatok kapcsán az előzetes eredmények alapján úgy tűnik, hogy a fémionok kismértékben, de befolyásolják az enzim aktivitását. A közeli jövőben tervezzük az eddigi eredmények részletes kiértékelését, illetve szükség esetén további méréseket.

## VII. Irodalomjegyzék

1. Nafae, Z. H., Hunyadi-Gulyás, É. & Gyurcsik, B. Temoneira-1  $\beta$ -lactamase is not a metalloenzyme, but its native metal ion binding sites allow for purification by immobilized metal ion affinity chromatography. *Protein Expr. Purif.* **201**, 106169 (2023).
2. Chen, X., Li, Y., Zhang, Y., Yang, J. & Bian, L. Binding of TEM-1 beta-lactamase to beta-lactam antibiotics by frontal affinity chromatography. *J. Chromatogr. B* **1051**, 75–83 (2017).
3. Tooke, C. L. *et al.*  $\beta$ -Lactamases and  $\beta$ -Lactamase Inhibitors in the 21st Century. *J. Mol. Biol.* **431**, 3472–3500 (2019).
4. Majiduddin, F. K., Materon, I. C. & Palzkill, T. G. Molecular analysis of beta-lactamase structure and function. *Int. J. Med. Microbiol.* **292**, 127–137 (2002).
5. Weston, J. Mode of action of Bi- and trinuclear zinc hydrolases and their synthetic analogues. *Chem. Rev.* **105**, 2151–2174 (2005).
6. Bush, K. & Sykes, R. B. Methodology for the study of  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **30**, 6–10 (1986).
7. Bush, K. Beta-lactamase inhibitors from laboratory to clinic. *Clin. Microbiol. Rev.* **1**, 109–123 (1988).
8. Stratton, A., Ericksen, M., Harris, T. V, Symmonds, N. & Silverstein, T. P. Mercury(II) binds to both of chymotrypsin's histidines, causing inhibition followed by irreversible denaturation/aggregation. (2016).
9. Al-Tubuly, A. A. SDS-PAGE and Western Blotting. in *Methods in Molecular Medicine* 391–405 (2000).
10. Rogers, D. M. *et al.* Electronic Circular Dichroism Spectroscopy of Proteins. *Chem* **5**, 2751–2774 (2019).
11. Li, X. Bioengineering of FGFs and New Drug Developments. *Fibroblast Growth Factors* 477–558 (2018).
12. PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ampicillin#section=2D-Structure>.(Utoljára megtekintve : 2022.11.08.)

13. Gasteiger, E. *et al.* Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. *Proteomics Protoc. Handb.* 571–607 (2005).
14. Micsonai, A. *et al.* Accurate secondary structure prediction and fold recognition for circular dichroism spectroscopy. (2022).
15. Waley, S. G. A spectrophotometric assay of  $\beta$ -lactamase action on penicillins. *Biochem. J.* **139**, 789–790 (1974).
16. Stojanoski, V. *et al.* A triple mutant in the  $\Omega$ -loop of TEM-1  $\beta$ -lactamase changes the substrate profile via a large conformational change and an altered general base for catalysis. *J. Biol. Chem.* **290**, 10382–10394 (2015).
17. Huang, W. & Palzkill, T. A natural polymorphism in-lactamase is a global suppressor (antibiotic resistanceprotein evolution). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 8801–8806 (1997).

## **Köszönetnyilvánítás**

Szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik segítettek TDK dolgozatom elkészítésében. Külön köszönöm témavezetőimnek, Dr. Gyurcsik Bélának és Zeyad H. Nafae-nak a munkám során felmerülő elméleti és gyakorlati problémák megoldásában nyújtott segítséget. Köszönettel tartozom Dr. Peintler Gábor és Dr. Jancsó Attila egyetemi docenseknek a kinetikai vizsgálatok értékelése során nyújtott segítségért.