

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
TEHNOLOOGIAINSTITUUT

Mihkel Mark Schamardin

Fluorestsentsil põhineva antibiootikumi bioreporterite testimine bakteris *Escherichia coli*

Bakalaureusetöö

Juhendaja teadur Marta Putrins

12 EAP

TARTU 2016

Fluorestsentsil põhineva antibiootikumi bioreporterit testimine bakteris *Escherichia coli*

Antibiootikumide toimet bakteritele uuritakse tavaliselt kõrgetel antibiootikumi kontsentratsioonidel, mis põhjustab bakterite kasvu peatumise või suremise. Kahel fluorestseerival valgul põhinev reportersüsteem kasutab modifitseeritud *trp* liiderjärjestust ning võimaldab uurida bakterirakkude vastust translatsiooni inhibeerivate antibiootiliste ühenditele subinhibitoorse kontsentratsioonide korral. Ma katsetasin seda bioreporterit uropatogeensetes *Escherichia coli* rakkudes, kasutades kahe fluorestseeruva valgu suhet signaalina. Nende valkude kõrge suhe viitab ribosoomi peatumisele antibiootikumi toimel. Reportersüsteem töötab, kuid ainult üldpopulatsiooni tasemel. Samas läbivoolutsütomeetria analüüs näitas, et on olemas ka suur bakterite alapopulatsioon, mis ekspresseerib vastavaid valke väga madalal tasemel ka tingimustes, kus antibiootikumi pole lisatud.

CERCS kood: B230 Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

Märksõnad: antibiootikum, fluorestsentsus, atenuatsioon, UPEC

Testing a fluorescence based antibiotic bioreporter in *Escherichia coli*

The effects of antibiotics on bacteria are normally studied at high concentrations of antibiotic compounds, which leads to an arrest of bacterial cell growth or bacterial cell death. A reporter system based on two fluorescent proteins and a modified *trp* leader sequence is able to screen for translation inhibiting antibiotics, producing a signal when subinhibitory concentrations of the compound is used. I tested this bioreporter in uropathogenic *Escherichia coli* cells, using the fluorescence ratio of two fluorescent proteins as a signal for the reporter system. A high ratio of those two fluorescent proteins indicates the stalling of the bacterial ribosome. I found that the reporter system works, albeit on a general population level, as flow cytometry analysis showed that there is a large subpopulation of bacterial cells that express the fluorescent proteins at a very low level.

CERCS code: B230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology

Keywords: antibiotic, fluorescence, attenuation, UPEC

Sisukord

Kasutatud lühendid	5
Sissejuhatus	6
1. Kirjanduse ülevaade	7
1.1 Antibiootikumid.....	7
1.1.1 Valgusünteesi mõjutavad antibiootikumid	8
1.2 RNA-st sõltuv geeniekspressiooni regulatsioon.....	9
1.2.1 <i>trp</i> operoni regulatsioon	10
1.2.3 Atenuatsioonil põhinev antibiootikumi bioreporter	11
2. Eksperimentaalosa	13
2.1 Töö eesmärgid	13
2.2 Materjal ja meetodika.....	14
2.2.1 Tüved ja plasmiidid	14
2.2.2 Söötmed ja bakterite kasvatamine	15
2.2.3 Kompetentsete bakterite valmistamine.....	16
2.2.4 Transformatsioon.....	16
2.2.5 DMSO säilituskultuuride valmistamine	17
2.2.6 RFP ja CER fluorestsentsi mõõtmine mikrotiiterplaadi lugejal	17
2.2.7 RFP ja CER fluorestsentsi mõõtmine läbivoolutsütomeetriga.....	17
2.3 Tulemused ja arutelu	18
2.3.1 Atenuatsioonil põhineva antibiootikumi bioreporterit testimine CFT073 tüves	18
2.3.2 Antibiootikumi bioreporterit testimine üksikraku tasemel voolutsütomeetriaga	26
3. Kokkuvõte	36
Testing a fluorescence based antibiotic bioreporter in <i>Eschericia coli</i>	37
Kasutatud kirjandus	38
Kasutatud veebiaadressid	41
Lihtlitsents	42
Tänuavaldused.....	43

Kasutatud lühendid

Cam- klooramfenikool

CER- tsüaansiniselt fluorestseeruv Cerulean valk (ingl *cyan fluorescent protein*)

DMSO- dimetüülsolfoksiid

Ery- erütromütsiin

FACS- läbivoolutsütomeetria

g- suhteline tsentrifugaaljõud

LB- *lysogeny broth*, bakterite kasvatamiseks toitainerikas sööde Glc- glükoos

MBC- minimaalne bakteritsiidne kontsentratsioon (ingl *minimal bactericidal concentration*)

MIC- minimaalne inhibitoorne kontsentratsioon (ingl *minimal inhibitory concentration*)

MOPS- 3-(N-morpholiin)-propaansulfoonhape; bakterisööde

OD₆₀₀- optiline tihedus lainepikkuse 600 nm juures

PBS- fosfaatpuhver (ingl *phosphate buffered saline*)

RFP- punane fluorestseeruv valk (ingl *red fluorescent protein*)

SOB- bakterisööde (ingl *super optimal broth*)

SOC- SOB baasil valmistatud bakterisööde lisatud glükoosi ja magneesiumsulfaadiga (ingl *super optimal broth with catabolite repressor*)

Trp- trüptofaan

Sissejuhatus

Üks enimtuntuid antibiootikumide märklaudu on bakteriaalne ribosoom. Ribosoom on rakkudes tsentraalne valgusünteesi aparaat, ribosoomi tööd takistades inhibeeritakse efektiivselt valgusünteesi. Antibiootikumid, mille märklauaks on bakterite ribosoom, on tuntud kui translatsiooni inhibiitorid. Nende hulka kuuluvad näiteks makroliidid, aminoglükosiidid ja klooramfenikool.

Osterman et al. 2011 artiklis on kirjeldatud bioreporterit uute translatsiooni inhibiitorite leidmiseks. Reportersüsteem põhineb atenuatsioonimehhanismil, kasutades signaali tekitamiseks kahte fluorestseeruvat valku ja modifitseeritud *trp* operoni liiderjärjestust. Meie kasutasime seda reportersüsteemi selleks et uurida bakterite vastust kahele tuntud valgusünteesi inhibeerivatele antibiootikumile – kloramfenikoolile ja erütromütsiinile.

Me teostasime rida katseid, kus mõõtsime kahe fluorestseeruva valgu- CER ja RFP- taset uropatogeenses *Escherichia coli* rakkudes. Nende põhjal arvutasime CER/RFP fluorestsentsi suhte, mis on otsene signaal näitamaks, et translatsiooni inhibiitor on sisenenud bakterirakku ja mõjub valgusünteesile. Katsetasime reportersüsteemi töötamist nii üldpopulatsiooni tasemel kui ka üksikraku tasemel.

Käesolev töö on koostatud Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudis Tanel Tensoni juhitud töögrupis.

Märksõnad: antibiootikum, fluorestsentsus, atenuatsioon, UPEC

1. Kirjanduse ülevaade

1.1 Antibiootikumid

Antibiootikumid ehk antibakteriaalsed ained on ühendid, mis madalates kontsentratsioonides otseselt hävitavad või pärsivad bakterite elutgevust. Antibiootikume on võimalik mitmeti jaotada – näiteks struktuuri, toimemehhanismi ja toimespektri alusel. Struktuurselt on võimalik eristada näiteks: β -laktaam antibiootikume, mis sisaldavad oma struktuuris β -laktaam tsükliit, tüüpesindajaks penitsilliin (Herzberg et al., 1987); makroliide, mis sisaldavad makroliidtsükliit, tüüpesindajaks on erütromütsiin (Retsema et al., 2001); aminoglükosiide, mis sisaldavad glükosiidsidemetega seotud amineeritud suhkruid, tüüpesindajaks streptomütsiin (Glupczynski et al., 1999).

Toime poolest jagunevad antibiootikumid kaheks – bakteriostaatilised ja bakteriotsiidised antibiootikumid (Nemeth et al., 2015). Bakteriostaatilised antibiootikumid inhibeerivad bakterite eluks ja jagunemises vajalikke protsesse. Nende protsesside alla kuuluvad näiteks bakteriaalne valgusüntees ja DNA replikatsioon. Bakteriotsiidised antibiootikumid otseselt tapavad baktereid, inhibeerides näiteks rakukesta sünteesiks vajalikke ensüüme ja/või protsesse (Finberg et al., 2004). Tasub ära märkida, et ühe bakteriliigi vastu bakteriotsiidised antibiootikumid ei pruugi omada sama bakteriotsiidset toimet teise bakteriliigi suhtes (Luidalepp, 2012).

Bakteriostaatilise ja bakteriotsiidse efekti määramiseks on kasulik mainida minimaalset inhibitoorset ja minimaalset bakteriotsiidset kontsentratsiooni. Minimaalne inhibitoorne kontsentratsioon (MIC) on ühendi madalaim kontsentratsioon, mis pärsib organismi kasvu märgatavalt 18-24 tunnise inkubatsiooni vältel. Minimaalne bakteriotsiidne kontsentratsioon (MBC) on ühendi madalaim kontsentratsioon, mis hävitab 99.9% organismidest 18-24 tunnise inkubatsiooni vältel. Määramaks, kas antibiootikum on bakteriostaatiline või-otsiidne, leiab kasutust MBC/MIC suhe – bakteriotsiidsete ühendite MBC/MIC suhe on üle 4 (>4), bakteriotsiidsete ühendite MBC/MIC suhe on umbes 1 kandis (Brauner et al, 2016; Pankey et al, 2004, Wiegand et al, 2008, Luidalepp, 2012)

Antibiootikume saab veel jagada toimespektri alusel kaheks. Laia toimespektiga antibiootikumid, nagu näiteks tetratsükliinid, on efektiivsed nii Gram-positiivsete kui ka

Gram-negatiivsete bakterite vastu. Kitsa toimespektriga antibiootikumid, näiteks makroliidid, on efektiivsed kindlate bakteriliikide suhtes (Acar, 1997).

1.1.1 Valgusünteesi mõjutavad antibiootikumid

Antibiootikumid mõjuvad kindale bakteriraku osale või protsessile, mida nimetatakse antibiootikumi märklauaks. Üks peamistest märklaudadest on bakteriaalne ribosoom, mille tööd inhibeerides on ka bakteriaalne valgusüntees pärsitud.

Valgusünteesi bakterites teostab ribosoom, mis koosneb kahest subühikust, 30S ja 50S subühik. Valgusünteesi initsiatsioon algab 30S ja 50S subühikute seondumisest, millega moodustub 70S ribosoom, milles on kolm tähtsat saiti, kus toimub polüpeptiidahela kokkupanek, A-, P- ja E-sait. Initsiatsioonifaas lõpeb, kui polüpeptiidahela initsiaator-tRNA, mis on tavaliselt fMet-tRNA, on korrektselt seondunud P-saiti. Initsiatsioonile järgneb elongatsioon, mille käigus aminoatsüülitud tRNA (aa-tRNA) tuuakse ribosoomi A-saiti elongatsioonifaktor Tu abil (EF-Tu), aminohapete vahel moodustub peptiidside, polüpeptiidahel translokeeritakse A- ja P-saidist vastavalt P- ja E-saiti, mis vabastab A-saidi, kuhu tuleb järgmine aa-tRNA. Elongeeruv polüpeptiidahel väljub 50S subühikus oleva väljumistunneli kaudu raku tsütoplasmasse. Elongatsioon toimub kuni mRNAs tuleb esile stopp-koodon, mille tunnevad ära *release factor*'id RF1 ja RF2, mis hüdrolüüsivad peptidüül-tRNA sideme, see protsess on terminatsioon. (Wilson, 2014)

Peale terminatsiooni toimub nn. „taaskasutamise“ staadium, mille käigus EF-G ja *Ribosome Recycling Factor* RRF dissotsieerivad 70S ribosoomi tagasi 30S ja 50S subühikuteks. (Hirokawa et al., 2006)

1.1.1.1 Klooramfenikool ja erütromütsiin

Nii klooramfenikooli kui ka erütromütsiini märklauaks on bakteriaalne ribosoom, pärssides valgusünteesi elongatsiooni, kuid kasutades erinevaid meetodeid. Klooramfenikool takistab peptidüültransferaasi, seondudes A saidile, mille tagajärjel see häirib tRNA tulekut A saiti ja seega takistab peptiidside moodustumist (Sohmen et al., 2009)

Erütromütsiin ja teised makroliidid takistavad tekkiva ahela väljumist ribosoomist. Makroliidid seostuvad ribosomaalse tunneli seintele ja pärsivad ahela elongatsiooni, mis viib ka peptidüül-tRNA maha langemist mRNA küljest (Sohmen et al., 2009)

1.2 RNA-st sõltuv geeniekspressiooni regulatsioon

Transkriptsioon on geeniekspressiooni üks kõige reguleeritumaid protsesse, kus regulatsioon võib toimuda nii promootori, transkriptsiooni initsiatsiooni kui ka elongatsiooni tasemel. Kindlate signaalide ja faktorite mõjul on võimalik RNA polümeraasi aeglustada, peatada ning indutseerida dissotsiatsiooni. Viimane on põhjustatud terminatsioonisignaalide tõttu, kui elongatsioonikompleks on jõudnud terminaatorisse. Asjaolu, et terminaatorites toimub DNA-RNA polümeraaskompleksi dissotsiatsioon, teeb terminaatorid geeniregulatsiooni märklaudadeks. Terminatsiooni efektiivsus on moduleeritud valkude, teiste molekulide ja RNAd poolt, mis mõjutavad neile järgnevate geenide ekspressiooni. Antiterminaatorid pärsivad terminaatorite aktiivsust, suurendades neile järgnevate geenide ekspressioonitaset (Santangelo ja Artsimovitch, 2011).

Regulaarsed *upstream* lugemisraamid (uORF, liider-ORF'id) kontrollivad paljude geenide ekspressiooni bakterites, arhedes ja eukarüootides. *Downstream* geenide aktivatsioon sõltub uORFi liikumisest läbi ribosoomi. uORF'ide translatsioon on ise reguleeritud eksogeensete faktorite poolt, näiteks metaboliitide olemasolu ja kontsentratsiooni poolt, mis võimaldab rakul kohaneda muutavas elukeskkonnas. uORF'idest sõltuv geeniregulatsioon avaldub peaaesjalikult programmeeritud translatsiooni seiskamisena. Üks enim uuritud mudel, mis kasutab sellist geeniregulatsiooni, on *ermC* geeni indutseeritav ekspressioon. *ermC* geen täidab bakterites antibiootikumivastast rolli, olles makroliidide, sealhulgas erütromütsiini vastane resistentsusgeen. Geenile eelneb liiderjärjestus *ermCL*, mis antibiootikumi puudumisel on konstituiivselt transleeritud, kuid *ermC* on translatsiooniliselt repressseeritud, kuna selle ribosoomiga seostumise koht (RBS) on mRNA sekundaarstruktuuri tõttu ribosoomile kättesaadamatu. Subinhibitoorse erütromütsiini kontsentratsiooni korral aga ribosoom aeglustub liiderjärjestuses, mis võimaldab alternatiivse mRNA struktuuri teket nii, et geeni ribosoomiga seostumise koht on ribosoomile kättesaadav. See võimaldab resistentsusgeeni translatsiooni. (Gupta et al, 2013)

1.2.1 *trp* operoni regulatsioon

Atenuatsioon on regulatoorne mehhanism, mis lülitab kindlaid operone vastavalt bakteriraku sisekeskkonnatingimustele kas sisse või välja. Operoni väljalülitamine tähendab operoni poolt kodeeritud geeniproduktide sünteesi pärssimist, sisselülitamine võimaldab jälle geeniprodukte sünteesida. Kui ribosoom jõuab mRNAs oleva atenuaatorjärjestuseni, ribosoomi poolt vahendatud valgusüntees aeglustub (ribosoom jääb seisma) ja sõltuvalt metaboolsetele tingimustele valgusüntees kas peatub täielikult, lõpetades transkriptsiooni või laseb transkriptsioonil edasi jätkuda.

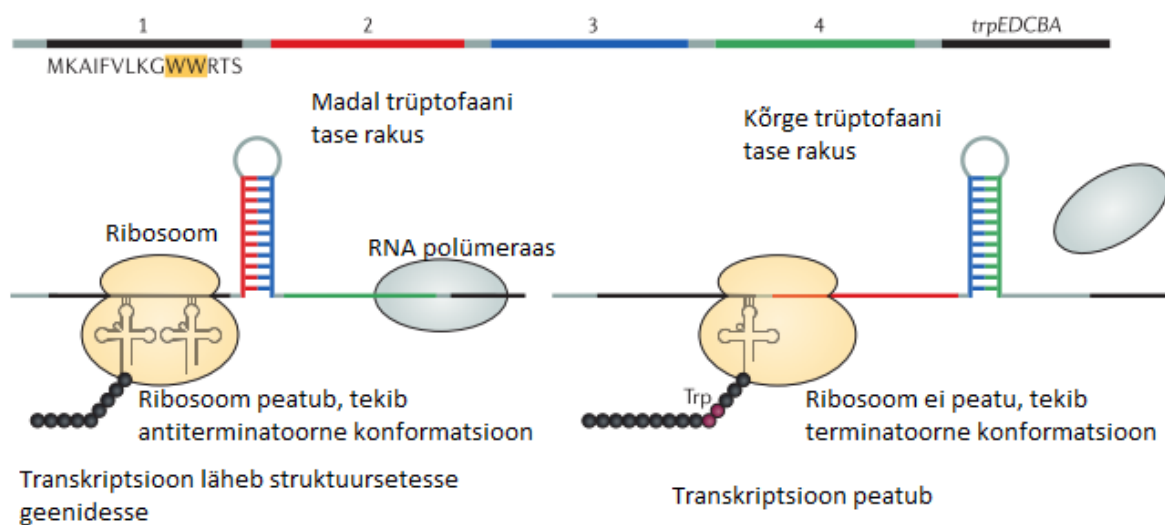
Enimtuntud näide transkriptsiooni atenuatsioonist on bakterite *trp* operon. *trp* operon koosneb kahest regulatoorsest alast (promooter/operaatorala ja *trpL* liiderjärjestus, mis sisaldab ka atenuaatorjärjestust) ning viiest struktuurset geenist (*trpEDCBA*). *trpL* regioonis on neli domääni (domäänid 1-4), mis on keskselt olulised *trp* operoni atenuatsioonist. Domään 3 suudab paarduda ja seeläbi tekitada juuksenõelastruktuure domäänidega 2 ja 4, aga mitte korruga (Heinaru, 2012). Domäänis 1 on atenuatsiooni seisukohast tähtis konserveerunud sait-Trp-Trp-Arg-Thr-Ser (Zurawski et al., 1978), kusjuures kaks järjestikust Trp koodonit on võtmelise tähtsusega.

Kõrge trüptofaani taseme puhul on rakus palju aminoatsüleeritud Trp-tRNA, mistõttu translatsioon domään 1-s toimub kiiresti ja ribosoom jõuab seostuda domään 2-ga enne kui domään 3 jõuab seda teha. Domään 3 seetõttu on võimeline ainult domään 4-ga seostuma, mis tekitab stabiilse domään 3-4 juuksenõelastruktuuri. See juuksenõelastruktuur on antud mRNA terminatoorne konformatsioon, mis tähendab seda, et transkriptsioon termineeritakse enne kui RNA polümeraas jõuab *trp* operoni struktuursete geenideni (Heinaru, 2012).

Madala trüptofaani taseme puhul on rakus vähe aminoatsüleeritud Trp-tRNA, mistõttu translatsioon pidurdub domään 1 kahe Trp koodoni juures, kuna ribosoom jääb Trp-tRNA-d ootama. Selle pausi tulemusena domään 2 ei saa seonduda ribosoomiga, seega domään 2 seostub domään 3-ga, tekitades domään 2-3 juuksenõelastruktuuri. Domään 2-3 juuksenõelastruktuur on antiterminatoorne konformatsioon, mis võimaldab RNA polümeraasil edasi minna transkriptsiooniga struktuursetesse geenidesse (Heinaru, 2012).

Antiterminatsioon on osa *trp* operoni regulatsioonist. *trp* operoni liiderjärjestuse mRNA terminatoorse konformatsiooni puhul ei transkribeerita operoni struktuursetid gene. Kui see

mRNA on aga antiterminatoorses konformatsioonis, toimub transkriptsioon ning seeläbi translatsioon (kujutatud joonisel 1) (Santangelo ja Artsimovitch, 2011).



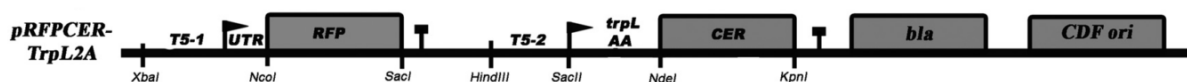
Joonis 1. *trp* operoni regulatsioon atenuatsiooni kaudu. Madala trüptofaani taseme puhul ribosoom jääb seisma, tekib antiterminatoorne konformatsioon ja RNA polümeraas jätkab transkriptsiooni. Kõrge trüptofaani aseme puhul ribosoom ei peatu tandeemsetes trüptofaani koodonites, tekib terminatoorne konformatsioon ja transkriptsioon peatub. Kohandatud, Santangelo ja Artsimovitch, 2011.

1.2.3 Atenuatsioonil põhinev antibiootikumi bioreporter

Antibiootikumide resistentsuse levik on saanud üheks peamiseks probleemiks meditsiinis, ning sellega seotult uute antimikroobsete ühendite otsimine on järjest tähtsam molekuaarse biotehnoloogia vallas. Sellist ühendite leidmine on aga keeruline ja kulukas, kui kasutada kasvu inhibitsiooni uuringuid, kuna testitavat võimaliku antibiootilise toimega ühendit on vaja suhteliselt suurtes kogustes ja aktiivühendi kontsentratsioon võib olla liialt madal, et avaldada reaalselt mõju organismi kasvule. Seetõttu on vaja bioreporterit, mis suudab identifitseerida võimalikke antimikroobseid ühendeid isegi subinhibitorsete kontsentratsioonide juures. (Osterman et al., 2012)

Järgnevalt kirjeldatud bioreporter (joonis 2) kasutab võimalike antibiootikumide testimisel atenuatsiooni printsiipi. Reporteris (plasmiid nimetusega pRFPCER-TrpL2Ala) on kaks fluorestseeruvat valku (RFP ja CER) ning ampitsilliini resistentsus geen (*bla* geen), kusjuures CER kodeeriva geeni ees on modifitseeritud *trp* operoni liiderjärjestus (TrpL), mis kahe

järjestikuse Trp koodoni asemel samas positsioonis sisaldavad kahte järjestikust Ala koodonit, mis teeb regulatsiooni Trp tasemest sõltumatuks. RFPd kodeeriva geeni ees ei ole sellist liiderjärjestust, kuna RFP fluorestsents on vajalik hindamaks üldist raku valgusünteesi taset. Translatsiooni inhibeerivad antibiootilised ühendid põhjustavad ribosoomi peatumist liiderjärjestuse domään 1 piires, mis simuleerib ribosoomi peatumist madala aminoatsüleeritud Trp-tRNA taseme korral normaalse *trp* operoni puhul. Selle pausi tõttu moodustub mRNA sekundaarstruktuuri, mis võimaldab RNA polümeraasil transkriptsiooniga minna reportersüsteemi järgmisesse geeni, mis kodeerib CER'i. Translatsiooni inhibitsioon seega põhjustab kõrgema CER/RFP suhte (Osterman et al, 2012).



Joonis 2. Skeem kirjeldatud bioreporterist pRFPCER-TrpL2Ala. RFP kodeeriva geeni ees on transleerimata jääv region (UTR), CER kodeeriva geeni ees on modifitseeritud TrpL järjestus, kus kaks tandeemset Trp koodonit on asendatud kahe tandeemse Ala koodoniga. Reporterplasmiidis on veel ampitsilliini resistentsusgeen *bla* ja CDF origin. Kohandatud, Osterman et al., 2012.

2. Eksperimentaalosa

2.1 Töö eesmärgid

Töö eesmärgiks oli katsetada Osterman et al., 2012 artiklis kirjeldatud fluorestsensusel põhineva antibiootikumi bioreporterit. Antud töös oli bioreporterit eesmärgiks leida uusi translatsiooni inhibeerivaid antibiootikume (Osterman et al., 2012). Meid huvitas aga võimalus kasutada reporterit selleks, et hinnata juba teadolevate antibiootikumide mõju uropatogeense *E. coli* rakkudele. Kuna on teada, et mitte kõik bakterikultuuri rakud ei pruugi olla antibiootikumidele ühtviisi tundlikud (Brauner et al., 2016), siis huvitas meid bioreporterit kasutamine nii üldpopulatsiooni ka üksikrakkude tasemel. Teema süvitsi uurimiseks püstitati eesmärgiks leida vastus järgnevatele küsimustele:

1. Kas meid huvitav fluorestsensusel põhinev antibiootikumi bioreporter plasmiid pRFPCER-TrpL2Ala põhjustab uropatogeenses *E. coli* tüves CFT073 kõrge CER/RFP fluorestsensuse suhte, kui reporterplasmiidiga rakud kasvavad keskkonnas, kuhu on lisatud subinhibitoorsetel kontsentratsioonidel valgusünteesi inhibeerivaid antibiootikume?
2. Kas antibiootikumi toimel põhjustatud kõrge CER/RFP suhe avaldub kõigis populatsiooni rakkudes või ainult mingis kindlas rakkude alapopulatsioonis?

2.2 Materjal ja metoodika

2.2.1 Tüved ja plasmiidid

Töös kasutatud tüved ja plasmiidid on kantud tabelisse 1.

Tabel 1. Töös kasutatud tüved ja plasmiidid.

Nimetus	Iseloomustus	Allikas
<i>E. coli</i> tüved		
CFT073	Uropatogeenne tüvi, isoleeritud neerupõletikuga patsiendi verest.	(Mobley et al., 1990)
CFT-K	CFT073 plasmiidiga pRFPCER	Käesolev töö
CFT-W	CFT073 plasmiidiga pRFPCER-TrpL	Käesolev töö
CFT-WAA	CFT073 plasmiidiga pRFPCER-TrpL2Ala	Käesolev töö
CFT-BR	CFT073 plasmiidiga pBR322	Käesolev töö
Plasmiidid		
pRFPCER	Plasmiid, mis kodeerib RFP ja CER valke. CER valgu ees on transleerimata jääv piirkond. Plasmiidis on <i>bla</i> geen, mis annab rakule ampitsilliiniresistentsuse.	(Osterman et al., 2012)
pRFPCER-TrpL	Plasmiid, mis kodeerib RFP ja CER valke. CER valgu ees on <i>trp</i> operoni liiderjärjestus <i>trpL</i> muutmata kujul. Plasmiidis on <i>bla</i> geen, mis annab bakterirakule ampitsilliiniresistentsuse-	(Osterman et al., 2012)
pRFPCER-TrpL2Ala	Plasmiid, mis kodeerib RFP ja CER valke. CER valgu ees on modifitseeritud <i>trp</i> operoni liiderjärjestus <i>trpL</i> , sisaldades kahe tandeemse trüptofaanikoodoni asemel kahte tandeemsetalaniini koodonit. Plasmiidis on <i>bla</i> geen, mis annab bakterirakule ampitsilliiniresistentsuse.	(Osterman et al., 2012)
pBR322	Plasmiid, mis sisaldab <i>bla</i> ja <i>tet</i> geene, mis annab bakterirakule nii ampitsilliini- ja tetratsükliiniresistentsuse.	Sutcliffe, 1979

2.2.2 Söötmed ja bakterite kasvatamine

Töös kasutatud söötmed ja toimeained on kantud tabelisse 2. Kõik bakteritüved on kasvatatud temperatuuril 37°.

Tabel 2. Töös kasutatud söötmed ja toimeained.

Nimetus	Iseloomustus	Tootja
MOPS	Bakterisööde, 3-(N-morfoliin)-propaansulfoonhape	AppliChem
1xMOPS 0.4%Glc	MOPS sööde, millele on lisatud K ₂ HPO ₃ , NH ₄ Cl ja glükoos lõppkontsentratsiooniga 0.4%. (Retsept (50ml): 5ml 10xMOPS, 1ml 20% Glc, 5ml 95mM NH ₄ Cl, 0.5ml 132 mM K ₂ HPO ₃ , 38.5ml dH ₂ O)	Käesolev töö
LB	Lennox LB toitainerikas bakterisööde	Difco™ Laboratories
SOB	Bakterisööde	Difco™ Laboratories
SOC	SOB bakterisööde, millele on lisatud glükoosi lõppkontsentratsioon 20mM ja MgSO ₄ lõppkontsentratsiooniga 10mM. (Retsept (50ml): 0.5ml 2M Glc, 0.5ml 1M MgSO ₄ , 49ml SOB)	Käesolev töö
Erütromütsiin	Antibiootikum, kasutatud käesolevas töös toimeainena. Katsetes kasutatud lõppkontsentratsioonid on 10µg/ml, 20µg/ml, 40µg/ml.	Amresco
Klooramfenikool	Antibiootikum, kasutatud käesolevas töös toimeainena. Katsetes kasutatud lõppkontsentratsioonid on 0.25µg/ml, 0.5µg/ml, 1µg/ml.	AppliChem
Ampitsilliin	Antibiootikum, kasutatud käesolevas plasmidi selektsiooniks. Kõikidel töös kasutatud tüvedel on ampitsilliini resistentsusgeen.	Sandoz

Trüptofaani kontsentratsioonist sõltuva attenuatsiooni jälgimiseks kasutati 1xMOPS 0,4%Glc vedelsöödet, millele lisati trüptofaani lõppkontsentratsioonides 1 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,1 mg/ml. Antibiootikumide kontsentratsioonist sõltuva attenuatsiooni jälgimiseks kasutati 1xMOPS 0,4% Glc vedelsöödet, millele lisati kas klooramfenikooli lõppkontsentratsioonides

0,25 µg/ml, 0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml, 3 µg/ml, 4 µg/ml või erütromütsiini lõppkontsentratsioonides 20 µg/ml, 40 µg/ml, 80 µg/ml.

Selleks, et uurida bioreporterite funktsionaalsust kasutatakse *E. coli* bakteritüve CFT073, mis kannavad plasmide pRFPCER, pRFPCER-TrpL või pRFPCER-TrpL2Aa.

Selleks, et uurida trüptofaani või antibiootikumide mõju vedelsöötmes CER ja RFP ekspressioonile lisatakse steriilsesse katseklaasi 1,78 ml bakterite söödet, 200 µl toimeainet ja 20 µl DMSO säilituskultuuri rakke. Rakke kasvatatakse üleöö 37°C juures loksutil „Sanyo orbital incubator“. Järgmisel päeval võetakse 1ml proov, mida tsentrifuugitakse 12300g (13500 RPM) 30 sekundit. Seejärel supernatant eemaldatakse ja rakud suspendeeritakse 1 ml 1xPBS puhvril. Seda korratakse veel üks kord.

2.2.3 Kompetentsete bakterite valmistamine

Kompetentsete rakkude valmistamiseks kasvatati algkultuuri 3 ml LB vedelsöötmes üleöö. Järgmisel päeval tehti üleöö kultuurist 100x lahjendus 50 ml SOCi, millel lasti kasvada kuni OD₆₀₀ oli 0,3-0,5. Rakud pandi jääle ning lasti jahtuda 20 minutit, samuti pandi üks steriilne tuub jääle. Peale 20 minutit jahtumist valati kultuur külma steriilsesse tuubi. Toimus korduv tsentrifuugimine 4°C juures, 3000g, 10 minutit. I tsentrifuugimise järel eemaldati supernatant ja suspendeeriti 25 ml 10% glütseroolis. II tsentrifuugimise järel eemaldati supernatant ja suspendeeriti 10 ml 10% glütseroolis. III tsentrifuugimise järel korrati II tsentrifuugimise järel toimuvat etappi. IV tsentrifuugimise järel eemaldati supernatant ja sademele lisati 400 µl 10% glütserooli ning jagati 50 µl kaupa Eppendorfi tuubidesse. Saadud kompetentseid rakke säilitati -80°C juures.

2.2.4 Transformatsioon

50 µl kompetentseid rakke segati kokku 0,5 µl plasmiidiga, mis pipeteeriti edasi elektroporatsiooniküvettesse. Elektroportatsioonil kasutati 2mm küvette, GenePulser Xcell ja programmi: *E. coli*, 2mm, 2.5kV. Peale rakkude poreerimist järgnes viivitamatu 1 ml sooja (37°C) SOCi lisamine rakkudele ning rakud viidi kosuma 37°C juures 1h. Peale kosumist tsentrifuugiti rakud põhja, supernatant osaliselt eemaldati (umbes 100 µl jäi alles), rakud suspendeeriti selles üles ja plaaditi LB Amp 100 µg/ml tassile.

2.2.5 DMSO säilituskultuuride valmistamine

Üleöö vedelsöötmes kasvanud bakterikultuur lahjendatakse 10 ml (100 ml kolvis) LB söötmesse nii, et OD₆₀₀ oleks ligikaudu 0,05. Rakke kasvatatakse seni kuni OD₆₀₀ on 0.6-0.8 ning seejärel lisatakse DMSOd, kuni selle lõppsisaldus on 8%. DMSOga kultuur jaotatakse seejärel 120 µl kaupa tuubidesse. Niiviisi valmistatud kultuuri säilitatakse -80°C. DMSO lisamine ja kultuuri tuubidesse jaotamine teostatakse jääkastil.

2.2.6 RFP ja CER fluorestsentsi mõõtmine mikrotiiterplaadi lugejal

Fluorestsentsi mõõtmine teostatakse rakkudega, mis on eelnevalt vedelsöötmes kasvatatud ning pestud 1xPBS puhvriga (vt. ptk 2.2.2 Söötmed ja bakterite kasvamine). Rakkude fluorestsentsi mõõtmiseks pipeteeritakse 100 µl pestud rakke 96 kannuga mikrotiiterplaadile. Fluorestsentsi mõõdetakse mikrotiiterplaadi lugejga BioTek SynergyMx kasutades tarkvara Gen5 2.04. Mikrotiiterplaadil asuvatelt proovidelt mõõdetakse fluorestsents lainepikkustel 550 nm (±20 nm) (ergastus): 595 nm (±20 nm) (emissioon) ja 430 nm (±20 nm) (ergastus): 485 nm (±20 nm) (emissioon). Need väärtused on vastavalt RFP ja CER ergastuste ja emissioonide lainepikkuste maksimumid. Samuti mõõdetakse proovide OD₆₀₀.

2.2.7 RFP ja CER fluorestsentsi mõõtmine läbivoolutsütomeetriga

Läbivoolutsütomeetria teostatakse rakkudega, mis on eelnevalt vedelsöötmes kasvatatud ning pestud 1xPBS puhvriga (vt. ptk 2.2.2 Söötmed ja bakterite kasvamine). 10µl pestud rakkudele lisatakse 10 µl 2% formaldehüüdi lahust. Segu inkubeeritakse toatemperatuuril 10 minutit ning hoiustatakse -80°C juures. Voolutsütomeetria viidi läbi masinaga BD LSRFortessa™, kasutades tarkvara FACSDiva. Fluorestsentsus mõõdeti lainepikkustel 405 nm (ergastus): 525 nm (±25 nm) (emissioon), 561 nm (ergastus): 586 nm (±7.5 nm) (emissioon) vastavalt CER ja RFP jaoks. Andmeid analüüsiti tarkvaraga Flowing Software 2.5.0.

2.3 Tulemused ja arutelu

2.3.1 Atenuatsioonil põhineva antibiootikumi bioreporterit testimine CFT073 tüves

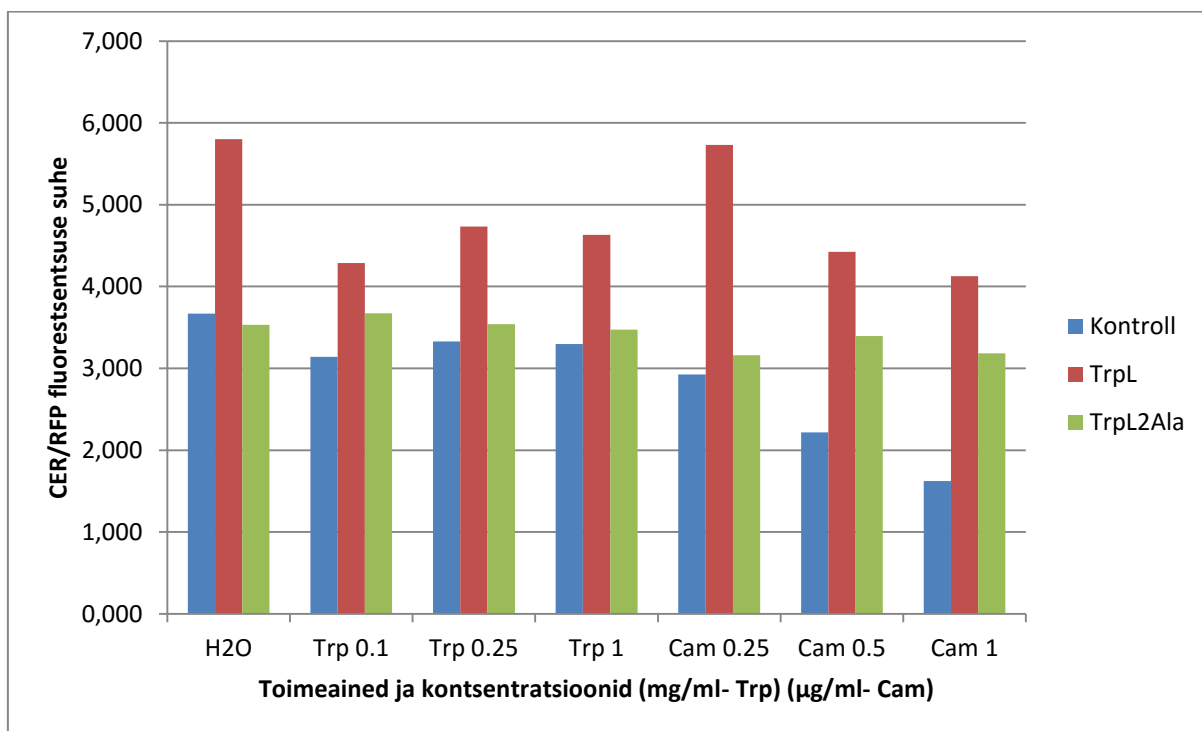
Kõigepealt, et testida fluorestsentsil põhineva antibiootikumi bioreporterit töötamist, kasvatati bakterirakke erinevates tingimustes ja teostati fluorestsentsi mõõtmine mikrotiiterplaadil. Algsetesse *E. coli* CFT073 kompetentsetesse rakkudesse viidi sisse pRFPCER, pRFPCER-TrpL või pRFPCER-TrpL2Ala plasmiid, nagu on kirjeldatud punktis 2.2.4. Mikrotiiterplaadil fluorestsentsuse mõõtmine teostati punkti 2.2.6 järgi. Kokku tehti kolm taolist katset.

Esimese katse eesmärgiks oli kontrollida plasmiidide tööd, et veenduda, et bakterirakud ekspresseerivad plasmiidides olevaid fluoreststeeruvaid valke. Kasutatud bakteritüvi oli CFT073, mis sisaldas plasmiidide pRFPCER (Kontroll) pRFPCER-TrpL (TrpL) ja pRFPCER-TrpL2Ala (TrpL2Ala). Rakke kasvatati 1xMOPS 0,4% Glc söötmes üleöö. Toimeaineteks kasutati trüptofaani kontsentratsioonidega 0,1 mg/ml, 0,25 mg/ml, 1 mg/ml, klooramfenikool kontsentratsioonidega 0,25 µg/ml, 0,5 µg/ml, 1 µg/ml ning dH₂O negatiivseks kontrolliks. Enne rakkude fluorestsentsi mõõtmist pesti rakke 1xPBSi puhvris ning 1xPBS enda fluorestsentsus mõõdeti eraldi. See väärtus lahutati proovide enda fluorestsentsuse toorväärtustest enne CER/RFP suhte arvutamist.

Esimese katse tulemused on visualiseeritud joonisel 3. Kasutatud toimeained olid trüptofaan kontsentratsioonidega 0,1 mg/ml, 0,25 mg/ml ja 1 mg/ml ning klooramfenikool kontsentratsioonidega 0,25 µg/ml, 0,5 µg/ml ja 1 µg/ml. Negatiivseks kontrolliks oli bakterikultuur, millele lisati toimeainete asemel samas mahus vett.

Jooniselt 3 on näha, et glükoosi sisaldavas minimalsöötmes, kuhu polnud lisatud trüptofaani, on kõige suuremad CER/RFP suhted on bakterirakkudel, mis sisaldavad pRFPCER-TrpL plasmidi (TrpL, joonisel punased tulbad). Trüptofaani lisamine söötmele ei avalda olulist mõju CER/RFP suhtele rakkudes, mis sisaldavad plasmiidide pRFPCER või pRFPCER-TrpL2Ala (joonis 3). Küll aga vähendab trüptofaani lisamine CER/RFP suhet pRFPCER-TrpL plasmidi sisaldavate bakterirakkudel, mis näitab, et trüptofaani limitatsioonist sõltuvat CER valku kodeeriva geeni transkriptsiooni ei toimu. Madalaimad CER/RFP suhted on kontrollplasmiidiga rakkudel (Kontroll, joonisel sinised tulbad), mille väärtused jäävad vahemikku 1,6 – 3,6, kusjuures rakkudel, mis kasvasid keskkonnas, kuhu oli lisatud

klooramfenikooli, oli CER/RFP suhted madalamad võrreldes rakkudega, mille kasvukeskkonnas ei olnud klooramfenikooli. pRFPCER-TrpL2Ala plasmidi sisaldavate rakkude CER/RFP suhe jäi klooramfenikooliga keskkonnas vahemikku 3,1 – 3,4, mis annab põhjust arvata, et klooramfenikooli kontsentratsioon jäi liialt madalaks, et märgata võimalikku suuremat induktsiooniefekti.



Joonis 3. Esimese mikrotiiterplaadil fluoreststentsuskatse tulemused. Tulpdiagrammina on kujutatud CER/RFP suhted. Kontroll tähistab pRFPCER plasmiidiga rake, TrpL tähistab pRFPCER-TrpL plasmiidiga rakke, TrpL2Ala tähistab pRFPCER-TrpL2Ala plasmiidiga rakke. Toimeained on trüptofaan (Trp), klooramfenikool (Cam) ning antibiootikumita kasvanud rakud (H2O). Toimeainete juures olev number tähistab toimeaine kontsentratsiooni.

Esimese katse tulemustest ilmnes, et klooramfenikooli kontsentratsioonid ei olnud sobivad, kuna TrpL2Ala plasmiidiga rakkude CER/RFP suhe oli jäänud umbkaudu samale tasemele (vahemikus 3,1 – 3,4, kusjuures Trp2Ala Cam 0.5µg/ml CER/RFP suhe oli kõrgeim). Seetõttu on vaja kõrgemaid antibiootikumi kontsentratsioone. Peale klooramfenikooli otsustati katsetada ka erütromütsiini mõju reportersüsteemile; samuti huvitas meid söötme mõju induktsiooniefektile, seetõttu katsetasime nii artiklis mainitud LB söödet kui ka MOPS söödet.

Teine katse hõlmas ka aja mõju kindlaksmääramist. Originaalartiklis oli lihtsalt mainitud, et rakke kasvatati üleöö, kuid meid huvitas, kas erinevatel ajamomentidel võetud proovid erinevad ning kui jah, siis missugusel hetkel võetud proovid on kõige sobivamad. Proovid võeti ajahetkedel 18 h, 21 h ja 24 h.

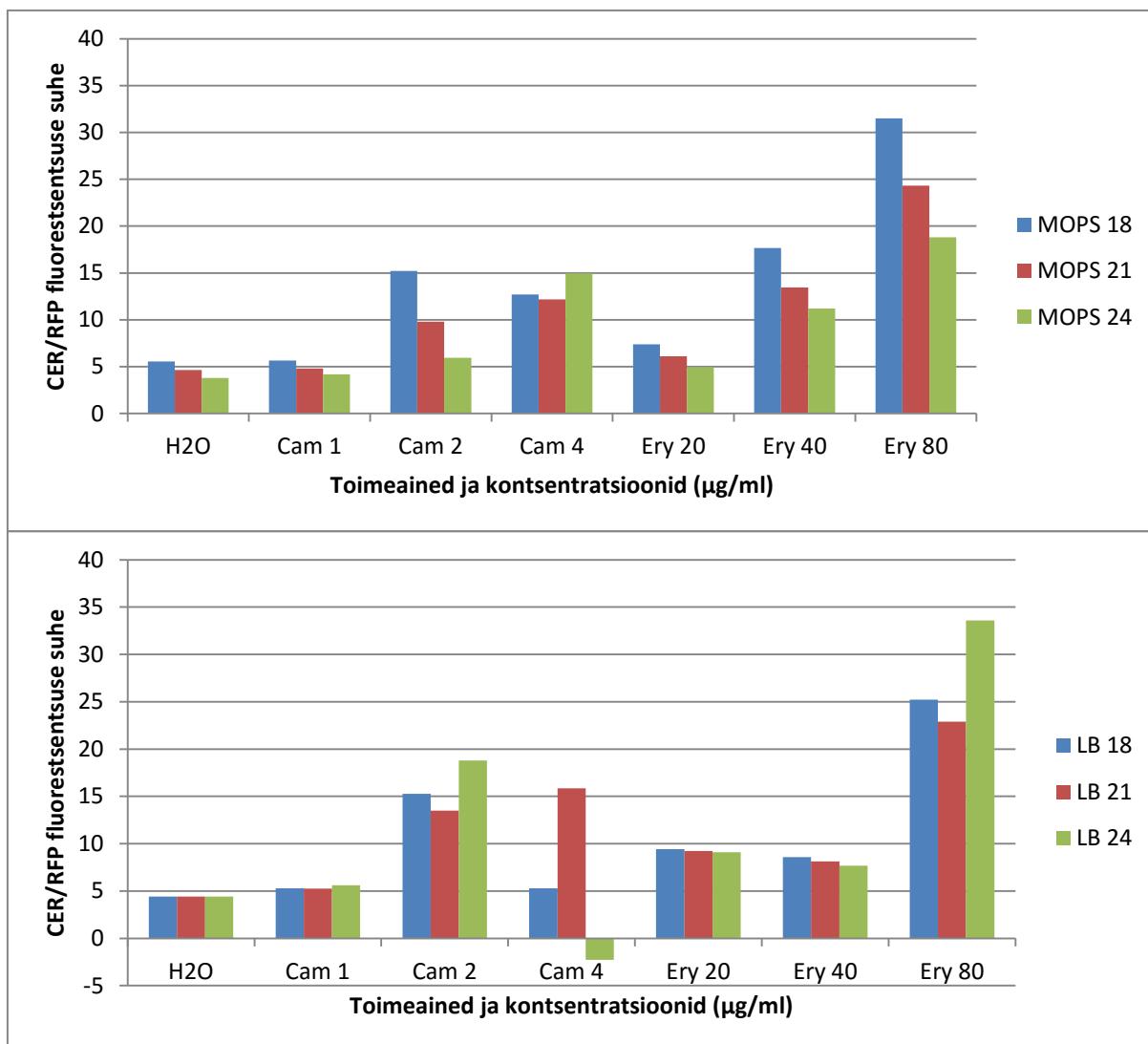
Teise katse raames mõõdeti ka CFT073 rakkude autofluorestsentsi. Selleks viidi CFT073 tüvesse plamiid pBR322, mis kodeerib valke, mis annavad resistentsuse ampitsilliini ja tetratsükliini vastu, aga ei kodeeri fluorestseeruvaid valke.

Teise katse tulemused on kujutatud joonisel 4. Kõrgemate antibiootikumide kontsentratsioonidega on täheldatav induktsiooniefekt- CER/RFP suhe on suurem kui 10. Samas on hõlpsasti märgatav nii söötme kui ka aja efekt induktsioonile. Tulemustest ilmneb, et 18h ajapunktil võetud proovid ilmutavad üldjuhul suurimat CER/RFP fluorestsentsussuhet; eriti hästi on see märgatav MOPS söötmes kasvanud rakkudel.

Söötmele on samuti mõju rakkude CER/RFP fluorestsentsussuhtele. Joonisel 4 on näha, et MOPS söötmes kasvanud rakud fluorestseerusid rohkem kui LB söötmes kasvanud rakud. Kohati LB söötmes kasvanud rakkude fluorestsents oli niivõrd madal, et PBSi fluorestsentsuse väärtus ületas seda. See juhtus LB Cam 4 µg/ml mõõtmisel – RFP fluorestsentsus oli madalam kui samal lainepikkusel mõõdetud PBSi fluorestsentsus, mistõttu suhe tuli negatiivne.

Samamoodi tuleb mainida, et CFT073 ei omanud märkimisväärset autofluorestsentsi üheski ajapunktis. Katses tuli välja, et pBR322 plasmidi kandvate CFT073 rakkude fluorestsentsi absoluutväärtused iga toimeainega igas ajapunktis olid piisavalt lähedased või isegi väiksemad kui vastavalt mõõdetud PBS puhver, mis tugevalt viitab sellele, et CFT073 ei oma

mingit natiivset autofluorestsentsi kasutatud lainepikkustel. Katse tulemused on näha tabelis 3.



Joonis 4. Teise katse mikrotiiterplaadil mõõdetud fluorestsentsi tulemused. Kasutatud bakteritüvi oli CFT073 plasmiidiga pRFPCER-TrpL2A1a. Ülemisel tulpdiaagrammil on kujutatud CER/RFP fluorestsentsuse suhet bakteritel, mis kasvasid MOPS söötmes, alumisel tulpdiaagrammil on kujutatud CER/RFP fluorestsentsuse suhet bakteritel, mis kasvasid LB söötmes. Legendis olevad numbrid (18, 21, 24) tähistavad mitu tundi peale külvamist proov võeti. Toimeained on klooramfenikool (Cam), erütromütsiin (Ery) ning antibiootikumita kasvanud rakud (H2O). Toimeaine juures olev number tähistab toimeaine kontsentratsiooni.

Tabel 3. CFT-pBR322 autofluorestsentsikatse tulemused. Väärtustena on välja toodud proovi fluorestsents lainepikkustel 550 nm (± 20 nm) (ergastus): 595 nm (± 20 nm) (emissioon) (RFP) ning 430 nm (± 20 nm) (ergastus): 485 nm (± 20 nm) (emissioon) (CER). Toimeained on klooramfenikool (Cam) ja erütromütsiin (Ery), H₂O tähistab antibiootikumita kasvanud rakke. PBS on puhver. Toimeainete juures olevad väärtused tähistavad toimeaine kontsentratsiooni ($\mu\text{g/ml}$).

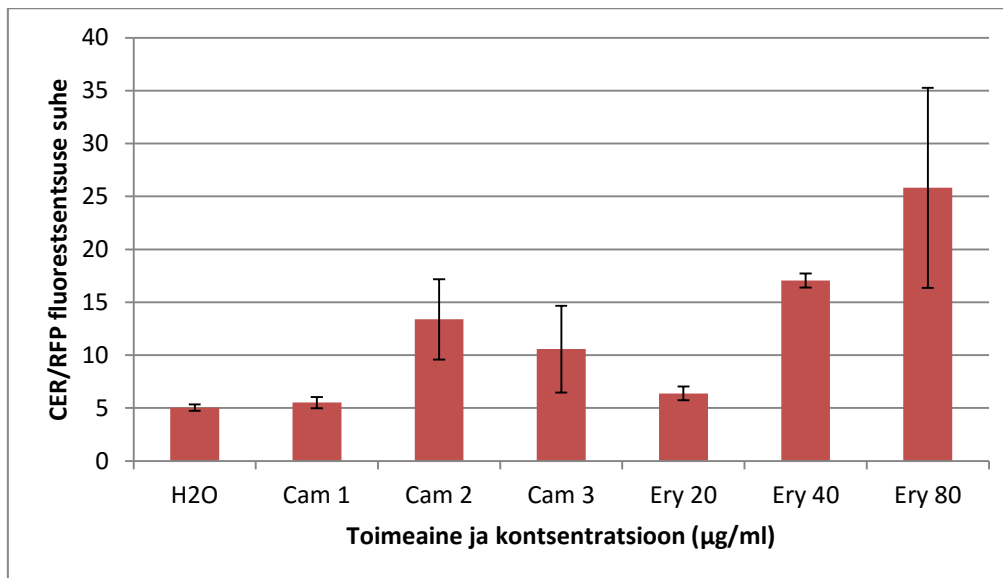
	CFT073-pBR322: Toimeained ja kontsentratsioonid ($\mu\text{g/ml}$)							PBS
	H ₂ O	Cam 1	Cam 2	Cam 4	Ery 20	Ery 40	Ery 80	
RFP	87	89	104	117	104	89	86	119
CER	2687	2660	2979	2928	2596	2598	2882	3076

Kolmanda katse mikrotiiterplaadil mõõdetud tulemused on kujutatud joonisel 5. Kasutatud toimeained olid dH₂O (negatiivne kontroll), klooramfenikool kontsentratsioonidega 1µg/ml, 2µg/ml ja 3µg/ml ning erütromütsiin kontsentratsioonidega 20µg/ml, 40µg/ml ja 80µg/ml. Kasutatud bakteritüvi oli CFT073 plasmiididega pRFPCER (Kontroll) ja pRFPER-TrpL2Ala (TrpL2Ala). Reporterplasmiidiga sooritati kolm paralleelset kordust, millest valiti volutsütomeetria katse prooviks välja esimene paralleel (TrpL2Ala 1). Bakterirakke kasvatati 18h.

Jooniselt 5 on näha, et kõrgemad antibiootikumi kontsentratsioonid on tekitanud suurema CER/RFP suhte. Induktsiooniefekt on suurem erütromütsiiniga kasvanud rakkude puhul – CER/RFP suhe Ery 80 korral on keskmiselt 25,8, Cam 3 korral on see vaid keskmiselt 10,5. Keskmiselt kõrgeim CER/RFP suhe klooramfenikooli kontsentratsioonide korral oli Cam 2 juures (13,7). Samas oli ka kontrollplasmiidiga kasvanud rakkudel CER/RFP fluorestsentsi suhe mõjutatud kõrgete antibiootikumi kontsentratsioonide poolt (Tabel 4).

Tabelist 4 on näha väga hästi antibiootikumi mõju fluorestseeruvate valkude ekspressioonile. Cam kontsentratsioonil 1 µg/ml ei ole avaldanud eriliselt suur mõju, madaldades nii CER kui ka RFP toorväärtusi natuke, võrreldes tingimustega kus rakud on kasvanud ilma antibiootikumideta. Suur efekt tekib Cam kontsentratsiooni 2 ja 3 µg/ml korral- RFP süntees on märgatavalt alanenud, samas kui CER süntees on jäänud üsna (võrreldes veega ebaproportsionaalselt) kõrgeks. See näitabki et CER valgu süntees on indutseeritud kui rakkude kasvukeskkonnas on klooramfenikooli.

Mikrotiiterplaadil teostatud fluorestsentsi mõõtmiste põhjal võib järeldada, et fluorestsentsil põhinev antibiootikumi bioreporter pRFPCER-TrpL2Ala töötab uropatogeenses *E. coli* tüves CFT073, tekitades kõrge CER/RFP fluorestsentsisuhte erinevate antibiootikumide puhul, mille märklauaks on bakteriaalne ribosoom.



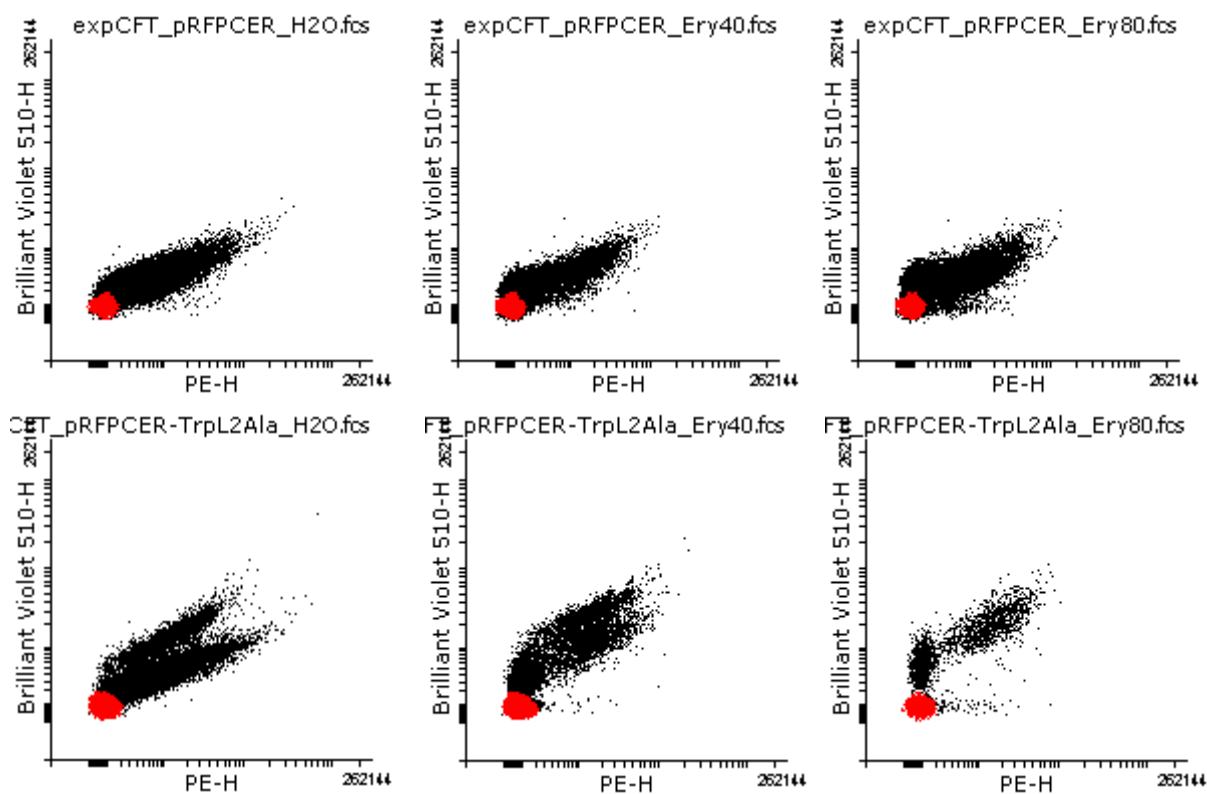
Joonis 5. Kolmanda katse mikrotiiterplaadil mõõdetud fluorestsentsi tulemused. Kasutatud bakteritüvi oli CFT073 plasmiidiga pRFPCER-TrpL2Ala. Toimeained on klooramfenikool (Cam), erütromütsiin (Ery) ning antibiootikumita kasvanud rakud (H2O). Toimeaine juures olev number tähistab toimeaine kontsentratsiooni. Tulpadena on kujutatud kolme paralleelse korduse keskmised suhted, veajoontena on kujutatud standardhälbed.

Tabel 4. Kolmanda katse mikrotiiterplaadil mõõdetud fluorestsentsi tulemused, mida on kasutatud voolutsütomeetria tulemuste analüüsil. Väärtustena on välja toodud proovi fluorestsents lainepikkustel 550 nm (± 20 nm) (ergastus): 595 nm (± 20 nm) (emissioon) (RFP) ning 430 nm (± 20 nm) (ergastus): 485 nm (± 20 nm) (emissioon) (CER). Toimeained on klooramfenikool (Cam) ja erütromütsiin (Ery), H₂O tähistab antibiootikumita kasvanud rakke. PBS on puhver. Toimeainete juures olevad väärtused tähistavad toimeaine kontsentratsiooni ($\mu\text{g/ml}$).

		CFT073 rakkude kasvukeskkonda lisatud toimeained ja kontsentratsioonid ($\mu\text{g/ml}$)							PBS
		H ₂ O	Cam 1	Cam 2	Cam 3	Ery 20	Ery 40	Ery 80	
CER/RFP suhe	Kontroll	3,824	2,390	3,678	9,824	3,624	6,757	8,099	
	TrpL2Ala 1	4,999	5,028	15,705	16,242	6,326	16,337	31,729	
RFP	Kontroll	5012	6104	1695	125	4766	1504	1316	108
	TrpL2Ala 1	4336	3732	542	433	4371	1624	860	78
CER	Kontroll	20294	15870	7377	1707	18421	10973	11324	1540
	TrpL2Ala 1	22743	19832	8746	7225	28616	26716	26271	1459

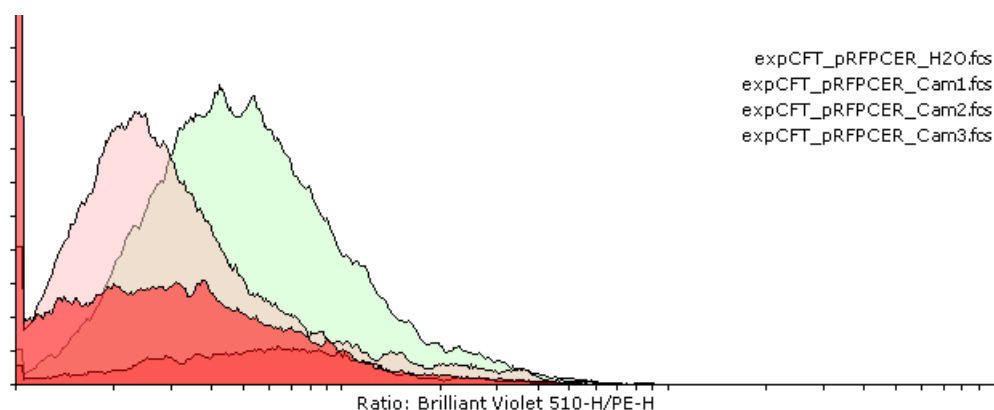
2.3.2 Antibiootikumi bioreporteritestimine üksikraku tasemel voolutsütomeetriaga

Voolutsütomeetria tulemustest ilmnes, et bakterite populatsioon proovis ei ole homogeenne, nagu eelnevalt arvatud, vaid kõikides proovides oli näha populatsiooni heterogeensust – täpsemalt kõikides proovides oli rakupopulatsioon, mis indutseerisid CER ja RFP valke väga madalal tasemel, sõltumata toimeaine olemasolust (joonis 6, punasega märgitud). Need madalalt indutseerivad populatsioonid olid ka üsnagi arvukad, moodustades enamikes proovides 50-70% kõikidest voolutsütomeetriamasina poolt registreeritud sündmustest. Neid rakupopulatsioone ei ole arvestatud detailses analüüsis, kuna hetkel need toimivad kui võõrväärtused, muutes graafikutel tugevat fluorestsentsi omavaid populatsioone joonistel raskemini märgatavamateks. Edasises analüüsis mõiste „üldpopulatsioon“ tähendab bakterite populatsiooni, mis ekspresseerisid piisavalt tugevalt CER ja RFP valke, et neid mitte lugeda võõrväärtuste hulka.



Joonis 6. Kontrollrakkude ja reporterplasmiidiga rakkude punktmaatriksid. Absissteljel on RFP fluoreststentsus, ordinaatteljel on CER fluoreststentsus. Punasega märgitud punktid on madalalt indutseerivad rakud, mida ei ole detailses analüüsis arvestatud. Ülemises reas, vasakult alustades: rakud plasmiidiga pRFPCER, kasvanud antibiootikumita, rakud plasmiidiga pRFPCER koos erütromütsiiniga, kontsentratsioonis 40 µg/ml, rakud plasmiidiga pRFPCER koos erütromütsiiniga, kontsentratsioonis 80 µg/ml. Alumises reas, vasakult alustades: rakud plasmiidiga pRFPCER-TrpL2Ala, kasvanud antibiootikumita, rakud plasmiidiga pRFPCER-TrpL2Ala koos erütromütsiiniga, kontsentratsioonis 40 µg/ml, rakud plasmiidiga pRFPCER-TrpL2Ala koos erütromütsiiniga, kontsentratsioonis 80 µg/ml.

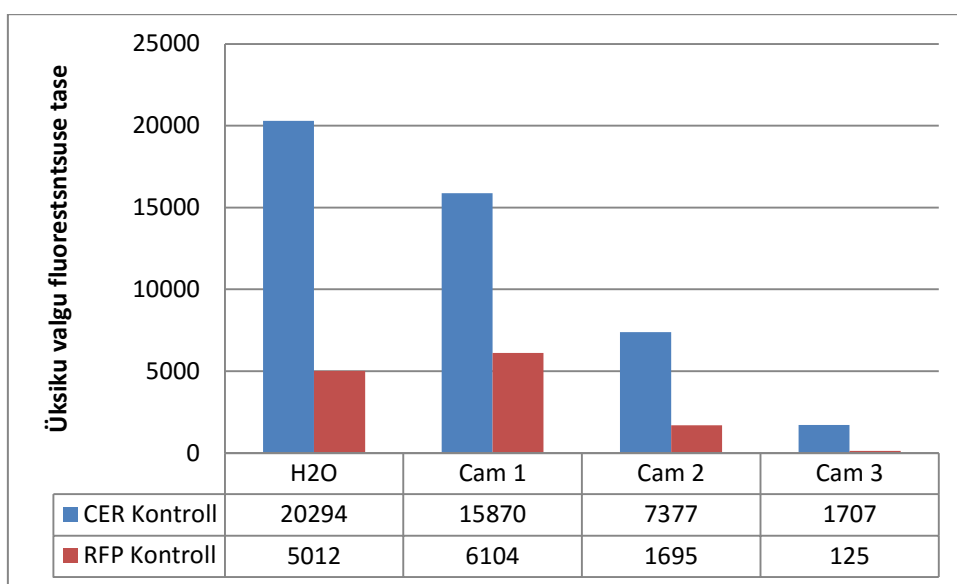
CFT073-pRFPCER rakkudes ei ole CER valku kodeeriv geen modifitseeritud *trp* liiderjärjestuse kontrolli all, seega CER valgu taset rakus ei saa indutseerida translatsiooni inhibeerivate antibiootikumide abil. Voolutsütomeetria tulemused kontrollplasmiidiga rakkudega kinnitavad seda väidet, kuna CER/RFP suhe vastusena klooramfenikooli kontsentratsiooni kõrgenedes ei suurene (joonis 7).



Joonis 7. CER/RFP suhete histogramm, põhineb CFT073-pRFPCER rakupopulatsiooni analüüsil voolutsütomeetriga. Absissteljel on CER/RFP valgu suhe skaalal 0-1000, ordinaatteljel on suhete arv skaalal 10-200. Joonisel on kujutatud rohelisena rakud, mille elukeskkonnas ei ole antibiootilist toimeainet olnud (H₂O, kontrollrakud), roosad on rakud, kuhu on toimeaineks lisatud klooramfenikooli kontsentratsiooniga 1 µg/ml. Tumeroosa ja punane on vastavalt klooramfenikooli kontsentratsioonid 2 µg/ml ja 3 µg/ml.

Kõrvutades mikrotiiterplaadil katse tulemused ja voolutsütomeetria tulemused tuleb ilmsiks huvitav asjaolu. CFT073-pRFPCER rakud, mis kasvasid antibiootikumita (H₂O), klooramfenikooli kontsentratsioonidega 1 µg/ml (Cam 1) ja 2 µg/ml (Cam 2) fluorestsentsüste suhete keskmised on piisavalt lähedased nii mikrotiiterplaadil kui ka voolutsütomeetriaga mõõtes. Kõrgemad voolutsütomeetriaga mõõdetud fluorestsentsüste suhted on selgitatavad fluoreseeruvaid valke mitteekspreesivate rakkude eemaldamisega analüüsist. Aga CFT073-pRFPCER klooramfenikool 3 µg/ml fluorestsentsüste suhete võrdlus annab vastupidise tulemuse, täpsemalt mikrotiiterplaadi katses saadud fluorestsentside suhe on kõrgem kui voolutsütomeetriaga mõõdetud suhe (vastavalt 9,83 ja 4,31). See ebakõla on tingitud mikrotiiterplaadi katses saadud valkude fluorestsentsüste toorväärtuste tõttu (tabelis 4: Cam 3 RFP on 125, vastav PBS on 108, Cam 3 CER on 1707, sellele vastav PBS on 1540). Kuna rakke oli enne fluorestsentsi mõõtmist puhastatud 1xPBSiga, siis oli vajalik mõõta ka

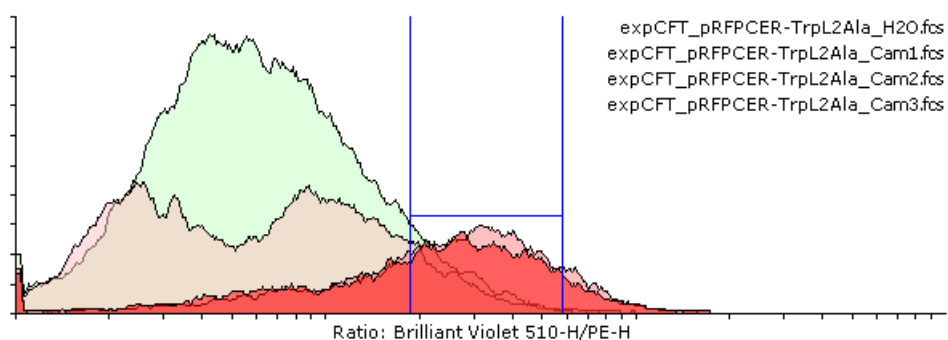
PBSi enda fluorestsentsus ning see lahutada rakkude fluorestsentsusest. Klooramfenikool 3 $\mu\text{g/ml}$ korral aga RFP fluorestsentsuse toorväärtus (125) oli väga lähedane PBSi fluorestsentsusele (108) ja kuna arvutakse CER/RFP suhet (ehk CER fluorestsentsuse väärtus jagatakse RFP fluorestsentsuse väärtusega; RFP on lugejas), siis madal lugeja väärtus tekitab matemaatilises mõttes suurema suhte. Hetkel aga see suhe väärtus on eksitav ja on mõistlik vaadata ja võrrelda pigem toorväärtusi. Sellest tulenevalt saab järeldada, et klooramfenikooli kontsentratsiooni suurenedes langeb nii CER kui ka RFP tase rakus lineaarselt, kujutatud joonisel 8.



Joonis 8. Kolmanda katse mikrotiiterplaadil mõõdetud fluorestsentsi väärtused rakkude kohta, mis kannavad pRFPCER plasmidi. Väärtustena on välja toodud proovi fluorestsents lainepikkustel 550 nm (± 20 nm) (ergastus): 595 nm (± 20 nm) (emissioon) (joonisel märgitud RFP Kontroll) ning 430 nm (± 20 nm) (ergastus): 485 nm (± 20 nm) (emissioon) (joonisel märgitud CER Kontroll). Kujutatud on antibiootikumita kasvanud rakkude (H₂O) ja klooramfenikooliga kontsentratsioonides 1 $\mu\text{g/ml}$, 2 $\mu\text{g/ml}$, 3 $\mu\text{g/ml}$ kasvanud rakud.

Joonisel 9 on kujutatud CER ja RFP fluorestsentsi suhet CFT073 tüve rakkudes, mis ekspresseerisid reporterplasmidi pRFPER-TrpL2A₁. Jooniselt 9 on näha, et CFT073-TrpL2A₁ rakkude, mis kasvasid Cam 2 $\mu\text{g/ml}$ juuresolekul (tumeroosa) ja Cam 3 $\mu\text{g/ml}$ juuresolekul (punane) CER ja RFP valkude fluorestsentsuste suhe on suur, mis viitab sellele, et antibiootikumi olemasolu keskkonnas on põhjustanud CER valgu märgatava ja tugeva induktsiooni, joonisel 9 piiritletud sinise joonega. Piiritletud alas on 50-53% CFT-pRFPCER-TrpL2A₁ klooramfenikool 2 $\mu\text{g/ml}$ ja klooramfenikool 3 $\mu\text{g/ml}$ juuresolekul kasvanud

rakkudest. Rakkude keskmine CER/RFP fluoreststentsisuhe on vastavalt CFT-pRFPCER-TrpL2Ala klooramfenikool 2 µg/ml kasvanud rakkudel 33,86 ja CFT-pRFPCER-TrpL2Ala klooramfenikool 3 µg/ml kasvanud rakkudel 33,68. Kõrgem suhe tähendab suuremat CER valgu induktsioonitaset, kuna CER valgu biosüntees allub antibiootikumi tekitatud attenuatsioonile. Kui võrrelda voolutsütomeetriaga mõõdetud fluorestsentsusväärtusi mikrotiiterplaadil fluorestsentsi mõõtmise katsega saadud tulemustega, tuleb ilmsiks CER/RFP suhte erinevus. CFT-pRFPCER-TrpL2Ala klooramfenikool 2 µg/ml juuresolekul kasvanud rakkude üldpopulatsiooni keskmine CER/RFP suhe tuleb 30,38, kuid mikrotiiterplaadil fluorestsentsi mõõtmise katsel on see 15,70 – peaaegu kaks korda madalam. Analoogselt on CFT-pRFPCER-TrpL2Ala klooramfenikool 3 µg/ml juuresolekul kasvanud rakkude üldpopulatsiooni keskmine 28,13, kuid mikrotiiterplaadil fluorestsentsi mõõtmise katsel on see 16,24. See tugev erinevuste vahe tulenebki asjaolust, et suur osa bakteripopulatsioonist ei ekspresseeri katses kasutatud fluorestseeruvaid valke vajalikul tasemel, aga see populatsiooni osa, mis seda teeb, ekspresseerib neid valke piisaval kogusel, et tõsta terve populatsiooni keskmist.

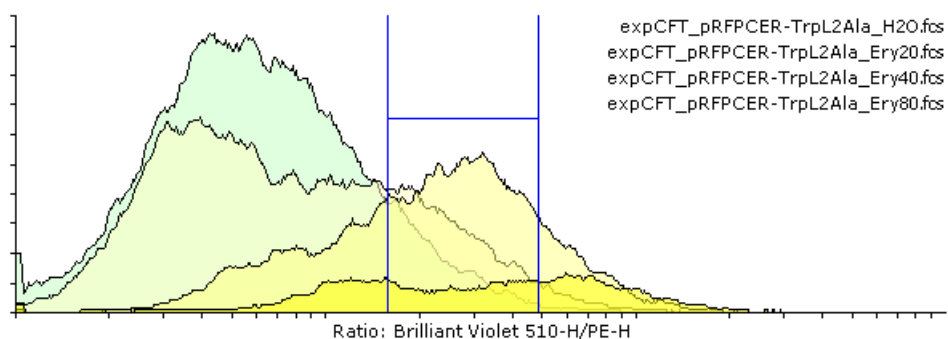


Joonis 9. CER/RFP suhete histogramm, põhineb CFT073-pRFPCER-TrpL2Ala rakupopulatsiooni analüüsil voolutsütomeetriga. Absissteljel on CER/RFP valgu suhe skaalal 0-1000, ordinaatteljel on suhete arv skaalal 10-120. Reporterplasmiidiga rakud, klooramfenikooli kontsentratsioonid. Rohelisena on histogrammil rakud, mille elukeskkonnas ei ole antibiootilist toimeainet olnud (toimeaine oli H₂O, kontrollrakud), roosad on rakud, kuhu on toimeaineks lisatud klooramfenikooli kontsentratsiooniga 1µg/ml. Tumeroosa ja punane on vastavalt rakud, mis on kasvanud söötmes, milles klooramfenikooli kontsentratsioonid olid 2 µg/ml ja 3µg/ml. Viimased ka kattuvad histogrammil.

Jooniselt 9 on näha, et CFT-pRFPCER-TrpL2Ala klooramfenikool 1 µg/ml kasvanud rakkude ala (heleroosa) kattub osaliselt CFT-pRFPCER-TrpL2Ala antibiootikumita kasvanud rakkude

alaga (roheline), kuid see populatsioon on palju heterogeensem kui CFT-pRFPCER-TrpL2Ala antibiootikumita kasvanud rakkude populatsioon; üleüldine keskmine on 8,76, mis on lähedal ka CFT-pRFPCER-TrpL2Ala antibiootikumita kasvanud rakkude üleüldise keskmisega (8,24). Kuna hetkel kontrolltingimuse (H₂O) ja toimeaine keskmised on üksteisega praktiliselt samasugused, võib järeldada, et klooramfenikool 1 µg/ml kasvanud rakkudega ei toimu märgatavat induktsiooni. Seda kinnitaks ka mikrotiiterplaadil fluorestsentsuse mõõtmise tulemused, kus samuti on antibiootikumita kasvanud rakkude ja klooramfenikool 1 µg/ml kasvanud rakkude keskmised CER/RFP suhted väga lähedased (vastavalt 4,999 ja 5,028, tabel 4)

Järgnevalt vaatame milline oli RFP ja CER valkude ekspressioon reporterplasmidi sisaldavates rakkudes erütromütsiini juuresolekul. Jooniselt 10 on hästi näha, et erütromütsiini 40 µg/ml ja erütromütsiini 80 µg/ml juuresolekul kasvanud rakkudel on suur CER/RFP fluorestsentsi suhe, kuid erütromütsiini 40 µg/ml juuresolekul kasvanud rakkudel on kindel piirkond, mis eristub paremini antud rakkude kogupopulatsioonist. Erütromütsiini 80 µg/ml kasvanud rakkudel sarnaselt defineeritud piirkonda ei ole, vaid rakud annavad ühtlaselt suurenevat fluorestsentsi suhet. Erütromütsiini 80 µg/ml kasvanud rakkude populatsioon on induktsiooni suhtes tugevalt heterogeenne (joonis 6). Sellest hoolimata saab üldpopulatsiooni keskmise põhjal järeldada, et rakud, mis kasvasid erütromütsiini 80 µg/ml keskkonnas on indutseeritud kõige tugevamalt. Erütromütsiini 80 µg/ml kasvanud rakkude üldine keskmine CER/RFP fluorestsentsisuhe on 45,78, võrdluseks saab tuua erütromütsiini 40 µg/ml kasvanud rakkude CER/RFP fluorestsentsisuhete keskmise, mis on 29,24 (tabel 5)



Joonis 10. CER/RFP suhete histogramm, põhineb CFT073-pRFPCER-TrpL2Ala rakupopulatsiooni analüüsil voolutsütomeetriga. Abtsissteljel on CER/RFP valgu suhe skaalal 0-1000, ordinaatteljel on suhete arv skaalal 10-120. Reporterplasmiidiga rakud,

erütromütsiini kontsentratsioonid. Joonisel on kujutatud rohelisena rakud, mille elukeskkonnas ei ole toimeainet olnud (H₂O, kontrollrakud), helebeež on erütromütsiin 20 µg/ml rakud, tumebeež on erütromütsiin 40 µg/ml rakud ja kollane on erütromütsiin 80 µg/ml rakud.

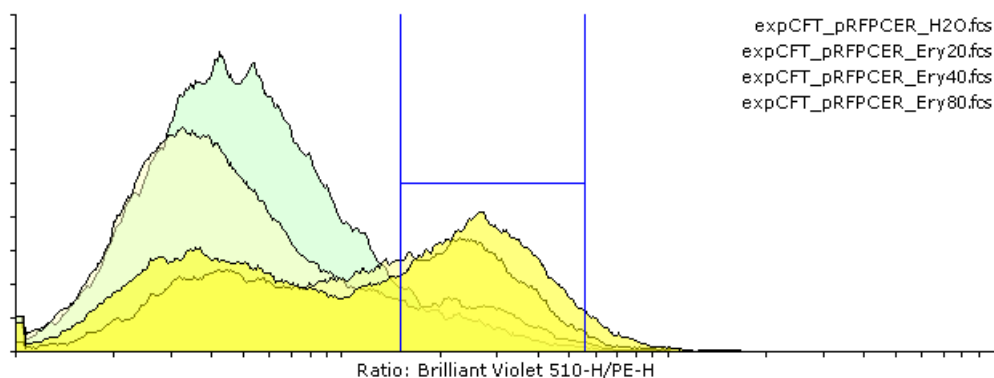
Tabel 5. Voolutsütomeetriaga mõõdetud CER/RFP fluorestsentsi suhe. Tulp nimega „Sündmuste arv“ vastab nendele sündmustele, millest on mitteindutseerivad rakupopulatsioonid eemaldatud. "Populatsiooni keskmine" vastab joonisel 10 kujutatud üldpopulatsiooni keskmisele CER/RFP fluorestsentsi suhtele. "Piiritletud ala keskmine" vastav joonisel 10 kujutatud piiritletud ala aritmeetilist keskmist. Kasutatud on CFT073-pRFPCER-TrpL2Ala rakke, mille kasvukeskkonnas ei ole olnud antibiootikumi (H₂O), või erütromütsiini (Ery) kontsentratsioonides 20 µg/ml, 40 µg/ml, 80 µg/ml.

	Sündmuste arv	Populatsiooni keskmine	Piiritletud ala keskmine
CFT-pRFPCER-TrpL2Ala H ₂ O	15239	8,24	
CFT-pRFPCER-TrpL2Ala Ery 20	12537	11,87	25,51
CFT-pRFPCER-TrpL2Ala Ery 40	8337	29,24	29,17
CFT-pRFPCER-TrpL2Ala Ery 80	2533	45,78	30,19

CER/RFP fluorestsentsi suhe on üsnagi sarnane bakterites, mis kasvasid antibiootikumita keskkonnas ning erütromütsiin 20 µg/ml keskkonnas (joonis 10). Mikrotiiterplaadil fluorestsentsi mõõtmise tulemused on antibiootikumita tingimuses (H₂O) rakkude ja erütromütsiin 20 µg/ml juuresolekul kasvanud rakkude jaoks sarnased voolutsütomeetria mõõtmistega (tabel 4 ja joonis 10). Kuigi need on sarnased, kõrgem CER/RFP suhe erütromütsiini tingimuste jaoks annab alust arvata, et isegi madalate subinhibitoorsete kontsentratsioonide korral toimub antibiootikumi poolt põhjustatud fluorestseeruvate valkude induktsioon.

Kui vaadata RFP ja CER valkude ekspressioon kontrollplasmiidi sisaldavates rakkudes erütromütsiini juuresolekul, siis näeme ka seal CER/RFP fluorestsentsi suhte muutust (joonis 11). Joonise 11 üldpilt sarnaneb mõlemale CFT-pRFPCER-TrpL2Ala histogrammile (joonised 9 ja 10)- kontrollrakud ja madalaima toimeaine kontsentratsiooniga töödeldud rakud on sarnase populatsiooni keskmisega ja kõrgemate toimeaine kontsentratsioonidega töödeldud rakkudel on kindel piirkond, millest on kõrgema CER/RFP fluorestsentsi suhetega rakud.

Kuid kontrollplasmiidiga rakud on kõik pRFPCER plasmiidiga, mis ei sisalda atenuaatori kontrolli all olevat CER kodeerivat geeni, seega histogramm peaks teoreetiliselt pigem sarnanema CFT-pRFPCER klooramfenikooli kontsentratsioonide histogrammile (joonis 7).



Joonis 11. CER/RFP suhete histogramm, põhineb CFT073-pRFPCER rakupopulatsiooni analüüsil voolutsütomeetriga. Absissteljel on CER/RFP valgusuhete skaalal 0-1000, ordinaatteljel on suhete arv skaalal 10-200. Kontrollrakud, erütromütsiini kontsentratsioonid. Joonisel on kujutatud rohelisena rakud, mille elukeskkonnas ei ole antibiootikumi olnud, helebeež on erütromütsiin 20 µg/ml rakud, tumebeež on erütromütsiin 40 µg/ml rakud ja kollane on erütromütsiin 80 µg/ml rakud.

Mikrotiiterplaadil mõõtes on antibiootikumita kasvanud rakkude (H₂O), ning erütromütsiini juuresolekul erinevate kontsentratsioonidega kasvanud rakkude (Ery 20 µg/ml, Ery 40 µg/ml ja Ery 80 µg/ml) CER/RFP fluorestsentside suhete keskmised vastavalt 3,82, 3,64, 6,75 ja 8,10 (tabel 4). Voolutsütomeetriaga mõõdetud fluorestsentsi tulemustega saadud histogrammil (joonis 11) on vastavad keskmised selgitatavad mitteindutseerivate rakkude eemaldamisega, aga niivõrd suurt erinevust erütromütsiin 40 µg/ml ja erütromütsiin 80 µg/ml kontsentratsioonidel kasvanud rakkudega ei peaks saavutama. Siinkohal oleks mõistlik kõrvutada ja võrrelda kontrollrakkude ja reporterplasmiidiga rakkude punktmaatrikseid (joonis 6). Joonisel 6 on näha populatsioonidevaheline erinevus kontrollrakkude ja reporterplasmiidiga rakkude vahel. Reporterplasmiidiga rakud on nii kõrgema RFP kui ka CER väärtustega, samas kui kontrollrakkudel niivõrd kõrged need väärtused ei ole. Siit selgineb, miks CFT-pRFPCER rakud erütromütsiin 40 µg/ml ja erütromütsiin 80 µg/ml

tingimustes ilmutasid sellise induktsiooniefekti – väga madal RFP tase, millele vastav kõrgem CER tase tekitab atenuatsioonist sõltumatu induktsiooni efekti. Rakud, mis vastavad joonisel 11 piiritletud alale, paiknevad joonisel 6 punasest alast üleval.

Tabel 6. Voolutsütomeetriaga mõõdetud CER/RFP fluorestsentsi suhe. Tulp nimega „Sündmuste arv“ vastab nendele sündmustele, millest on mitteindutseerivad rakupopulatsioonid eemaldatud. "Populatsiooni keskmine" vastab joonisel 11 kujutatud üldpopulatsiooni keskmisele CER/RFP fluorestsentsi suhtele. "Piiritletud ala keskmine" vastab joonisel 11 kujutatud piiritletud ala aritmeetilist keskmist. Kasutatud on CFT073-pRFPCER rakke, mille kasvukeskkonnas ei ole olnud antibiootikumi (H₂O), või erütromütsiini (Ery) kontsentratsioonides 20 µg/ml, 40 µg/ml, 80 µg/ml.

	Sündmuste arv	Populatsiooni keskmine	Piiritletud ala keskmine
CFT-pRFPCER H ₂ O	20170	6,94	
CFT- pRFPCER Ery 20	15829	7,93	26,91
CFT- pRFPCER Ery 40	10978	16,15	27,13
CFT- pRFPCER Ery 80	13572	17,6	29,22

Tuginedes fluorestsentsi mõõtmisele nii mikrotiiterplaadil kui ka voolutsütomeetriaga saab väita, et Osterman et al., 2012 artiklis kirjeldatud pRFPCER-TrpL2Aala bioreporter töötab uropatogeenses *E. coli* CFT073 tüves. Tulemused ühtisid, kuna subinhibitoorsete klooramfenikooli ja erütromütsiini kontsentratsioonide korral toimub märgatav fluorestseerivate valkude suhte tõus (joonis 5). See induktsiooniefekt on märgatavam kõrgemate antibiootikumi kontsentratsioonide korral. Samas kõikides rakkudes ei ole RFP ja CER ekspressioonitase samaväärne, kuna voolutsütomeetria katsetest ilmnes, et igas proovis oli populatsioon, mis ekspresseerisid RFP ja CER väga madalal tasemel, mistõttu saab öelda, et bioreporter töötab üldpopulatsiooni tasemel, kuid mitte üksikraku tasemel (joonis 6).

Kuigi üldpopulatsiooni tasemel analüüs näitab, et bioreporter töötab, tuleb siiski arvestada ka üksikraku tasemega. Üldpopulatsioonis on nii väga kõrgelt CER ja RFP ekspresseerivaid rakke, kui ka neid väga madalat ekspresseerivaid rakke (joonis 6). Kuna selgus, et üldpopulatsioon on heterogeenne, siis on tulevastes katsetes selle bioreporteriga vajalik tähelepanu pöörata ka üksikraku tasemele, sest lihtsalt üldpopulatsiooni tasemel saadud andmeid ei pruugi anda selget ülevaadet.

Siiski jääb küsimus: miks oli kõikides voolutsütomeetria proovides väga madalalt fluorestseeruvaid valke ekspresseeriv populatsioon? Kirjandusest on teada, et äärmiselt kõrge rohelise fluorestseeruva valguga (GFP) ekspressioonitase viib GFP kogunemiseni rakus, mis viib GFPd kodeeriva plasmidi kadumiseni (Proenca et al., 2003). Midagi sarnast võis juhtuda mitteindutseerivate rakkude korral. Eraldiseisva katsena külvasin rakud LB ampitsilliini 100 µg/ml plaadile üleöö; järgneval päeval oli näha kahte erinevat värvi kolooniaid- valgeid ja kergelt punakaid. Mõlemast kolooniatüübist tegin edasikülvi, ning järgmisel päeval edasikülvatud punasest kolooniast tekkisid nii valged kui ka punakad kolooniad, kuid edasikülvatud valgest kolooniast tekkisid ainult valged kolooniad. Võib arvata, et nende valgete kolooniate koosseisus võivadki olla need mitteindutseerivad rakud, mis mingil põhjusel ei ole võimelised enam ekspresseerima fluorestseeruvaid valke piisavates kogustes. Fluorestsentsuse alanemine võib iseenesest viidata plasmidi kaole (Proenca et al., 2003), aga selle töö raames ei ole see tõenäoline. Võimalik põhjendus võib olla plasmidis olevate fluorestseeruvate geenide väljalülitamine mingil viisil. Plasmid ise ei saa olla kadunud, kuna bakterite kasvukeskkonnas oli sellel hetkel ampitsilliini ning pRFPCER-TrpL2Aa plasmiidil on ampitsilliini resistentsust kodeeriv *bla* geen (vt joonis 2).

pRFPCER plasmiidid põhineb pCDF Duet-1 vektoril (Osterman et al., 2012), mis on kõrge koopiaarvuga plasmiid (20-40 koopiat)

(<http://bionumbers.hms.harvard.edu/bionumber.aspx?id=107530>¹). Kuna plasmide on palju, siis üksikute plasmiidide kadu ei ole bakteritele surmav, kuna ampitsilliini resistentsus ei kao. Reportersüsteemi seisukohalt tuleb probleemiks suur plasmiidne kadu või fluorestseeruvate valkude mitteekspressioon. Sellisel juhul alaneb RFP tase rakus, muutudes väga lähedaseks 1xPBSi taustvärtusega, mis matemaatilise seisukohast võib anda vale CER/RFP suhte.

Voolutsütomeetria ja mikrotiiterplaadil fluorestsentsuse mõõtmise katsete tulemustele toetudes võib väita, et reportersüsteem ei ole üksikraku tasemel kasutatav, kuna plasmiididega rakupopulatsioon on heterogeenne ning iga rakk ei ekspresseeri võrreldavatel tasemetel fluorestseeruvaid valke. Siiski võib olla pRFPCER-TrpL2Aa kasulik tuvastussüsteem võimalike uute translatsioonihäirete inhibeerivate antibiootiliste ühendite väljatöötamiseks.

3. Kokkuvõte

Töö eesmärgiks oli katsetada kahe fluorestseerival valgul (CER ja RFP) põhinevat antibiootikumi bioreporterit pRFPCER-TrpL2Ala. Selleks teostati fluorestsentsi mõõtmised ja leiti CER/RFP suhted uropatogeensetes *E. coli* rakkudes, kui need olid kasvanud keskkonnas, kuhu oli lisatud translatsiooni inhibeerivat antibiootikumi erinevatel kontsentratsioonidel.

CER/RFP suhe mõõdeti mikrotiiterplaadi lugejaga, mis andis üldpopulatsiooni CER ja RFP fluorestsentsuse taseme, ning läbivoolutsütomeetria masinaga, mis andis informatsiooni CER ja RFP fluorestsentsi kohta üksikutes rakkudes.

Fluorestsentsi mõõtmised mikrotiiterplaadil ühtisid varem avaldatud tulemustega (Osterman et al., 2012), mille põhjal saab väita, et bioreporter pRFPCER-TrpL2Ala on efektiivne detekteerimaks translatsiooni inhibeerivaid antibiootikume subinhibitoorsetel kontsentratsioonidel.

Saadud andmete analüüsil selgus huvitav asjaolu: nimelt bakteripopulatsioon ei olnud üheselt homogeenne, nagu eelnevalt oli arvatud. Tuvastati vähemalt kaks bakterite populatsiooni – väga vähesel tasemel valke ekspresseeriv populatsioon ning tugeval tasemel valke ekspresseeriv populatsioon. Nendele tulemustele toetudes võib väita, et et reportersüsteem ei ole üksikraku tasemel kasutatav.

Testing a fluorescence based antibiotic bioreporter in *Escherichia coli*

Mihkel Mark Schamardin

Summary

A fluorescence based bioreporter system has been developed to screen for potential translation inhibitors (Osterman et al., 2012). This system is based on bacterial attenuation, and includes two fluorescent proteins and a modified *trp* leader sequence that makes the system independent from tryptophan tRNA. One of the fluorescent proteins is regulated by this modified *trp* leader sequence. In this bioreporter, when the ribosome stalls in the modified *trp* operon leader sequence, transcription proceeds into the gene of a fluorescent protein. The second fluorescent protein does not have special regulatory mechanisms regulating its expression.

Since translation inhibitors target the bacterial ribosome, it effectively keeps the production of the attenuation-regulated fluorescent protein high while inhibiting the expression level of the second fluorescent protein. Presence of translation inhibitors in bacteria growth medium will produce a high ratio of attenuation-regulated fluorescent protein to nonregulated fluorescent protein. This system works with antibiotic concentrations low enough not to inhibit bacterial cell growth.

It was found that the described reporter system works in uropathogenic *Escherichia coli* strain CFT073, producing a large ratio of Cerulean protein (CER) to red fluorescent protein (RFP) in response to translation inhibiting antibiotics. However, it is important to note that the bacterial population is not homogenous with regard to fluorescence ratio between CER and RFP, instead there is a subpopulation of cells that express both proteins minimally and a population that expresses these two proteins in a very high amount. Therefore, we can conclude that the pRFPCER-TrpL2Ala bioreporter is not suitable for single cell studies.

Kasutatud kirjandus

Acar, J., (1997). Broad- and narrow-spectrum antibiotics: an unhelpful categorization. *Clin Microbiol Infect* **3**: 395-396

Brauner, A., Fridman, O., Gefen, O., & Balaban, N. Q. (2016). Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. *Nature Reviews Microbiology*, *14*(5), 320–330. <http://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.34>

Finberg, R. W., Moellering, R. C., Tally, F. P., Craig, W. A., Pankey, G. A., Dellinger, E. P., ... Rybak, M. J. (2004). The importance of bactericidal drugs: future directions in infectious disease. *Clin.Infect.Dis.*, *39*(1537-6591 (Electronic)), 1314–1320. <http://doi.org/10.1086/425009>

Glupczynski, Y., & Tulkens, M. (1999). Aminoglycosides : Activity and Resistance MINIREVIEW Aminoglycosides : Activity and Resistance, *43*(4), 727–737.

Gupta, P., Kannan, K., Mankin, A. S., & Vázquez-Laslop, N. (2013). Regulation of gene expression by macrolide-induced ribosomal frameshifting. *Molecular Cell*, *52*(5), 629–42. <http://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.10.013>

Heinaru, A. *Geneetika õpik kõrgkoolile*, p.435-437. Tartü Ülikooli Kirjastus, Tartu.

Herzberg, O., & Moul, J. (n.d.). Bacterial Resistance to -Lactam Antibiotics : *Staphylococcus aureus*, (1).

Hirokawa, G., Demeshkina, N., Iwakura, N., Kaji, H., & Kaji, A. (2006). The ribosome-recycling step: Consensus or controversy? *Trends in Biochemical Sciences*, *31*(3), 143–149. <http://doi.org/10.1016/j.tibs.2006.01.007>

Mobley, H. L. T., Green, D. M., Trifillis, A. L., Johnson, D. E., Chippendale, G. R., Lockatell, C. V, ... Warren, J. W. (1990). Pyelonephritogenic *Escherichia coli* and Killing of Cultured Human Renal Proximal Tubular Epithelial Cells: Role of Hemolysin in Some Strains. *Infect Immun*, *58*(5), 1281–1289. Retrieved from <Go to ISI>://A1990DA74000022

- Nemeth, J., Oesch, G., & Kuster, S. P. (2015). Bacteriostatic versus bactericidal antibiotics for patients with serious bacterial infections: Systematic review and meta-analysis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 70(2), 382–395. <http://doi.org/10.1093/jac/dku379>
- Osterman, I. A., Prokhorova, I. V., Sysoev, V. O., Boykova, Y. V., Efremenkova, O. V., Svetlov, M. S., ... Dontsova, O. A. (2012). Attenuation-based dual-fluorescent-protein reporter for screening translation inhibitors. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(4), 1774–1783. <http://doi.org/10.1128/AAC.05395-11>
- Pankey, G. a., & Sabath, L. D. (2004). Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of Gram-positive bacterial infections. *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 38(6), 864–870. <http://doi.org/10.1086/381972>
- Proenca, M. J., Hautefort, I., & Hinton, J. C. D. (2003). Single-Copy Green Fluorescent Protein Gene Fusions Allow Accurate Measurement of Salmonella Gene Expression In Vitro and during Infection of Mammalian Cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(12), 7480–7491. <http://doi.org/10.1128/AEM.69.12.7480>
- Retsema, J., & Fu, W. (2001). Macrolides: structures and microbial targets. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 18 Suppl 1, S3–S10. [http://doi.org/10.1016/S0924-8579\(01\)00401-0](http://doi.org/10.1016/S0924-8579(01)00401-0)
- Santangelo, T. J., & Artsimovitch, I. (2011). Termination and antitermination: RNA polymerase runs a stop sign. *Nature Reviews. Microbiology*, 9(5), 319–29. <http://doi.org/10.1038/nrmicro2560>
- Sohmen, D., Harms, J. M., Schlünzen, F., & Wilson, D. N. (2009). SnapShot: Antibiotic Inhibition of Protein Synthesis I. *Cell*, 138(6), 3–4. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2009.08.001>
- Zurawski, G., Elseviers, D., Stauffer, G. V., & Yanofsky, C. (1978). Translational control of transcription termination at the attenuator of the Escherichia coli tryptophan operon. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 75(12), 5988–5992. <http://doi.org/10.1073/pnas.75.12.5988>

Wilson, D. N. (2014). Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. *Nature Reviews. Microbiology*, 12(1), 35–48. <http://doi.org/10.1038/nrmicro3155>

Wiegand, I., Hilpert, K. & Hancock, R. E. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat Protoc* 3: 163-175.

Kasutatud veebiaadressid

1: <http://bionumbers.hms.harvard.edu/bionumber.aspx?id=107530>

Lihlitsents

Lihlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Mihkel Mark Schamardin,

(sünnikuupäev: 05.07.1994)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihlitsentsi) enda loodud teose „**Fluorestsentsil põhineva antibiootikumi bioreporteritestimine bakteris Escherichia coli**“, mille juhendaja on teadur Marta Putrinš,

1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 24.05.2016

Tänuavaldused

Ma sooviksin kõigepealt tänada oma fantastilist juhendajat Marta Putrinšit, kelle kannatlikkus ja positiivsus suutis mind ikka ja jälle üllatada ning kelle külm närv ning loogiline mõtlemine mind nii mõnigi kord tagasi maa peale tõid. Ka kõige väiksemgi küsimus sai suurepärase vastuse, mis innustas mind edasi minema. Samuti ma sooviksin tänada Tanel Tensoni töögruppi kuuluvaid inimesi, kes andsid hea nõu nii suuremate kui ka väiksemate probleemide või küsimuste korral.

Viimasena ma sooviksin tänada oma lähedasi, nii perekonda kui ka sõpru, kes julgustasid mind kui ma vajasin julgustust ning kes olid minu jaoks kohal kui mul oli seda vaja.

Suur aitäh kõigile!