

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

TEHNOLOOGIAINSTITUUT

ANTIBIOOTIKUMIDE JA MOLEKULAARSE MIKROBIOLOOGIA TÖÖRÜHM

**SOS vastuse induktsioon vähiravimite poolt kasvavas ja mittepaljunevas
bakterikultuuris**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Naomi Charlotta Andersson

Juhendaja PhD Niilo Kaldalu

TARTU 2024

“SOS vastuse induktsioon vähiravimite poolt kasvavas ja mittepaljunevas bakterikultuuris”

Antibiootikumiresistentsuse ajastul on kõige kriitilisema tähtsusega gram-negatiivsete bakterite poolt põhjustatud infektsioonid. Kroonilistes infektsioonides leidub mittejagunevaid “uinuvaid” gram-negatiivseid baktereid, kes ei allu antibiootikumiravile aktiivsete märklaudade puudumise tõttu ning põhjustavad haiguse pideva tagasituleku. Resistentsuse tekke ühe võimaliku põhjustajana on kirjeldatud DNA-s mutatsioone tekitavat SOS vastust. Käesoleva töö eesmärgiks oli leida sobilik katseprotokoll ning reporterplasmid, et tuvastada kuue mittejagunevate bakterite vastu aktiivse vähiravimi võimet indutseerida uropatogeenses *E.coli* tüves CFT073 SOS vastust. Kasvavas kultuuris indutseeriti mõne ravimiga SOS vastus, kuid statsionaarses faasis ning sellejärgsel kasvamahakkamisel ei indutseeritud SOS vastust vaatamata kasvu inhibitsioonile.

Võtmesõnad: antibiootikumiresistentsus, ravimite uuskasutus, mittejagunevad bakterid

CERCS kood: B230 Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

“The induction of the SOS response by anticancer drugs in growing and stationary bacterial culture”

In the era of antibiotic resistance, treating infections caused by gram-negative bacteria is of critical importance. There are nongrowing “sleeping” gram-negative bacteria that cause chronic infections and aren’t susceptible to antibiotic treatment due to lack of active targets. Of the many reasons causing antibiotic resistance, induction of SOS response has been shown to cause tolerance to antibiotics in clinical research. The aim of this thesis was to find a suitable experiment protocol and a reporter plasmid to detect SOS response in response to six anticancer drugs in uropathogenic *E.coli* strain CFT073 and to measure SOS response induction in different growth phases as well as during post-treatment regrowth. In growing culture, SOS response was detected with several anticancer drugs. However, in stationary culture treatment as well as post-treatment regrowth, none of the drugs induced SOS response, even though they inhibit bacteria growth post-treatment.

Keywords: antibiotic resistance, drug repurposing, nongrowing bacteria

CERCS code: B230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology

Sisukord

Infoleht	2
Kasutatud lühendid	5
Sissejuhatus	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	7
1.1. Antibiootikumid.....	7
1.1.1. Antibiootikumiresistentsus.....	8
1.1.2. Ravimite uuskasutus antimikroobsete ainete avastamisel.....	10
1.2. Persistorid ja mittejagunevad bakterid infektsioonis	10
1.2.1. SOS vastus	11
1.3. Kasutatud DNA-ga interakteeruvad vähiravimid	12
1.3.1. Ehhinomütsiin	12
1.3.2. Bleomütsiin	12
1.3.3. Mitomütsiin C	13
1.3.4. Plikamütsiin.....	13
1.3.5. Evofosfamiid	14
1.3.6. Satraplatiin	14
1.3.7. Gatifloksatsiin ja ofloksatsiin.....	15
2. EKSPERIMENTAALOSA	16
2.1. Töö eesmärgid.....	16
2.2. Materjal ja meetodika	16
2.2.1. Kasutatud söötmed	16
2.2.2. Kasutatud reporterplasmiidid, bakteritüvi ja reagensid	17
2.2.3. Kompetentide tegemine ja transformatsioon.....	17
2.2.4. SOS vastuse tuvastamise katseprotokoll plasmiidiga pANO1:: <i>cda</i> '	18
2.2.5. SOS vastuse tuvastamise katseprotokoll reporterplasmiidiga pSC101-GFPmut2-Pcda-mScarlet-1	18
2.2.6. Läbivoolutsütomeetriga analüüs	19

2.3. Tulemused ja arutelu.....	20
2.3.1. SOS vastuse esilekutsumine vähiravimite poolt reporterplasmiidiga pANO1:: <i>cda</i> '	20
2.3.2. SOS vastuse esilekutsumine vähiravimite poolt reporterplasmiidiga pSC101- GFPmut2-Pcda-mScarlet-1	23
2.3.2.1. SOS vastuse esilekutsumine vähiravimite poolt kasvavas rakukultuuris.....	24
2.3.2.2. SOS vastuse esilekutsumine vähiravimite poolt mittejagunevates bakterites ja nende kasvamahakkamisel	28
Kokkuvõte	32
Summary.....	33
Kirjanduse loetelu.....	34
Lihthitsents.	40

Kasutatud lühendid

MIC – (ingl *minimum inhibitory concentration*) minimaalne kontsentratsioon, mis inhibeerib bakterite nähtavat kasvu *in vitro*

UPEC – uropatogeenne *E.coli*

ECH – ehhinomütsiin

BLE – bleomütsiin

MTC – mitomütsiin C

PLI – plikamütsiin

EVO – evofosfamiid

SAT – satraplatiin

GAT – gatifloksatsiin

OFL – ofloksatsiin

LB – Luria-Bertani sööde

SOB – *Super Optimal Broth*

CAMHB – *Cation-adjusted Mueller-Hinton broth*

HEPES – 4-(2-hüdroksüetüül)-1-piperasiinetaansulfoonhape

LPM – (ingl *low magnesium, low phosphate-containing medium*) madala magneesiumi ja fosfaadisisaldusega sööde

MES – 2-(N-morfoliin)etaansulfoonhape

GFP – (ingl *green fluorescent protein*) roheliselt fluorestseeruv valk

OD₆₀₀ – (ingl *optical density*) optiline tihedus lainepikkusel 600 nm

Sissejuhatus

Antibiootikumide väärkasutuse tõttu nii inimeste ravil kui ka loomakasvatuse tekib resistentsus, mis on üks aktuaalsemaid probleeme meditsiinis. Antimikroobsete ainete avastamine ja kasutuselevõtt on aeglustunud võrreldes eelmise sajandiga ning enamuse kasutusel olevaid antibiootikume on derivaadid esimestest avastatud antibiootikumidest. Enamus antibiootikume mõjuvad kasvavatele bakteritele, kas neid tappes või nende kasvu peatades. Kuid raskesti ravitavate krooniliste infektsioonide puhul on nakkuskoldes mittejagunevaid (metaboolset inaktiivseid) baktereid, mis antibiootikumiravile hästi ei allu. Seetõttu on hädavajalik leida antimikroobseid ühendeid, mis toimiksid selektiivselt mittejagunevatele bakteritele.

Et leida selliseid aineid, skriiniti uurimisgrupis ravimite ja ravimikandidaatide kollektiooni mittejagunevate bakterite vastu. Statsionaarse faasi rakukultuurile lisati uuritavad ained ning otsiti selliseid, mis lükkaksid töötlusjärgselt bakterite kasvamahakkamist edasi (põhjuseks võib olla bakterite tapmine või kasvu inhibeerimine). Skriiningu käigus leiti 39 ainet, millel on mõju statsionaarse faasi *E. coli* uropatogeensele tüvele (UPEC). Nende hulgas on kuus vähiravimit, millel on erinevad DNA-seoselised toimemehhanismid. Selles töös uuriti, kas need ained kahjustavad bakterirakkude DNA-d ja indutseerivad DNA parandamiseks SOS vastust nii kasvavas kui statsionaarses rakukultuuris. SOS vastus on bakterites oluline mehhanism DNA kahjustustest ülesaamiseks ning soodustab mutatsioonide, s.h. antibiootikumiresistentsust määravate mutatsioonide teket.

Töö eesmärk on välja selgitada, kas erinevates kasvufaasides ja pärast ravimitöötlust skriiningust välja tulnud mittekasvavate bakterite vastu aktiivsed vähiravimi kandidaadid indutseerivad vastusena DNA kahjustusele SOS vastuse.

Bakalaureusetöö teostati Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudi antibiootikumide ja molekulaarse mikrobioloogia töörühmas.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Antibiootikumid

Antibiootikumid on ained, mis tapavad baktereid (bakteritsiidid) või suudavad nende kasvu inhibeerida (bakteriostaatilised). Algselt nimetati antibiootikumideks loodusliku päritoluga ühendeid, kuid nüüd kuuluvad nende hulka ka poolsünteetilised ja sünteetilised samade omadustega ühendid. Antibiootikumide märklauad on seotud bakterite eluks oluliste metaboolsete protsessidega, näiteks β -laktaamide (penitsilliinid, karbapeneemid) puhul on selleks rakuseina sünteesiga seotud ensüümid. Ravimid, millel on spetsiifiline valguline märklaud ei ole ideaalsed, sest piisab mõnest mutatsioonist, et märklauda modifitseerida; raskesti asendatavate struktuuride või protsesside puhul (rakukesta süntees, membraan, rRNA) on väiksem tõenäosus kiire resistentsuse tekkimiseks mutatsiooni tõttu (Silver, 2016). Antibiootikumi oluline omadus on minimaalne mõju patsiendile, selleks peab märklaud esinema bakteritel, aga puuduma inimestel – näiteks rakusein või bakteriaalne ribosoom.

Antibiootikumide avastamise õitseng saabus 1940ndatel nn Waksmani platvormi kasutuselevõtuga – avastati streptomütsiin (Schatz *et al.*, 1944) ning pandi alus meetodile, kus mullabakteritest (peamiselt perekonnast *Actinomyces*) tuvastati hulganisti nende toodetud antimikroobsete omadustega metaboliite. Kuigi nii avastati enamuseks tänaseks tuntud antibiootikumirühmasid, muutus selle meetodi kasutamine üsna pea kasutuks samade ühendite pideva taasavastamise ja kiirelt tekkiva antibiootikumiresistentsuse tõttu. Bakterite poolt toodetud metaboliitide kasutamist antibiootikumidena piirab ka asjaolu, et nende kujunemise eesmärk looduslikus keskkonnas pole ravimina kasutamine, vaid teiste mikroobidega konkureerimine ning paljudel neist on inimestele toksilisi omadusi (Brown ja Wright, 2016). Samas on looduslikult avastatud antibiootikumid just oma pikaajalise evolutsiooni jooksul kujunemise tõttu niivõrd efektiivsed, tänapäevaste meetoditega on keeruline leida antimikroobseid aineid, mis on nendega võrreldavad. Enamuse antibiootikume, mis on kliinilises kasutuses, on derivaadid 1940–1960ndatel avastatud antibiootikumidest – ravimi struktuuri modifitseerimine võimaldab ületada bakterite poolt looduslike ühendite suhtes välja kujunenud resistentsust (Fischbach ja Walsh, 2009). Viimaste aastakümnete jooksul on uute toimemehhanismidega antibiootikumiklasside avastamine märgatavalt aeglustunud, üks hiljutisim avastatud antibiootikumide klass kasutab märklauana lipopolüsahhariidide transporterit (Zampaloni *et al.*, 2023). Uute antibiootikumide ja nende klasside avastamist on soodustanud vähemuuritud ökoloogiliste nišside tähtsustamine – näiteks on veekogust isoleeritud *Streptomyces* bakteriperekonnast leitud madala MIC-ga (minimaalne

konsentratsioon, mis inhibeerib bakterite kasvu) ühendeid, mis on aktiivsed nii gram-positiivsete kui ka gram-negatiivsete bakterite vastu (Abirami *et al.*, 2015).

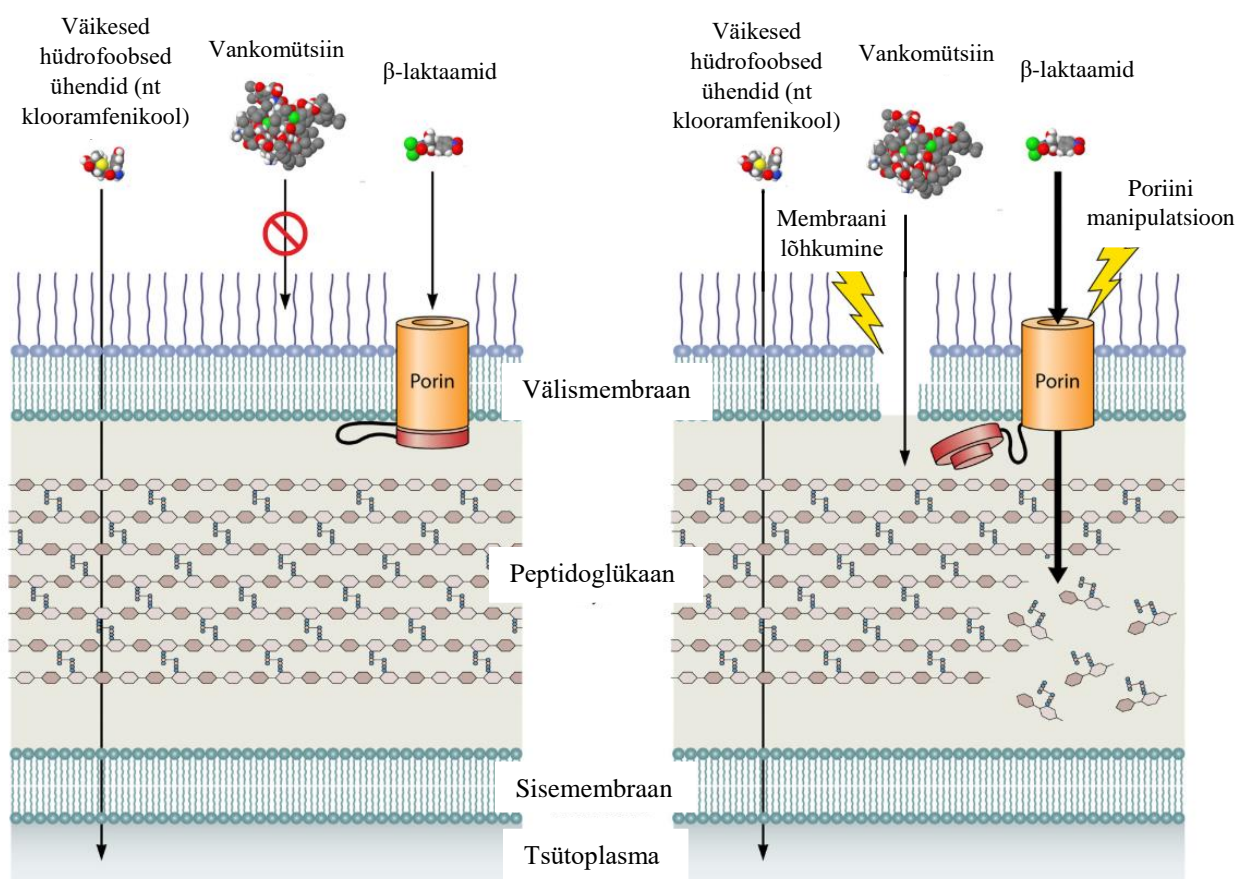
1.1.1. Antibiootikumiresistentsus

Kuigi on levinud arvamus, et antibiootikumiresistentsus tekkis vastusena ravimite kasutusele võtmisele, on näidatud, et resistentsusgeenide olemasolu bakteritel on loomulik nähtus ja esines juba enne esimeste antibiootikumide avastamist inimeste poolt (D'Costa *et al.*, 2011). Resistentsus looduses tekib teiste bakterite poolt toodetud antimikroobsete ühendite vastu omavahelises konkurentsisis. Bakterid võivad resistentsusgeene omandada ja levitada horisontaalse geeniülekanne abil, kuid bakteritel võib olla ka olemuslik resistentsus membraanipumpade või muude mittespetsiifiliste mehhanismide näol (Fajardo *et al.*, 2008). Gram-negatiivsetel bakteritel on näiteks olemuslik resistentsus vankomütsiini vastu, mida kasutatakse muu hulgas ka metitsilliiniresistentse *Staphylococcus aureus* (MRSA) raviks. Põhjuseks on vankomütsiini märklaud – see ravim seondub peptidoglükaani monomeeridele ja takistab rakuseina sünteesi, kuid gram-negatiivsetel bakteritel ümbritseb peptidoglükaankihti välismembraan, mida vankomütsiin ei suuda läbida (Rubinstein ja Keynan, 2014). Nagu paljude antibiootikumidega, on ka vankomütsiini struktuuri üritatud muuta, et ta oleks efektiivne ka gram-negatiivsetele bakteritele (Antonoplis *et al.*, 2019). Olemasolevate antibiootikumide struktuuri modifitseeritakse pidevalt, et tekkinud resistentsusmehhanismidest kiiresti jagu saada või ravimi efektiivsust tõsta. Paraku on selline antibiootikumide tootmine ainult ajutine lahendus resistentsusprobleemile, kuna derivaadi struktuur on suuremalt jaolt sarnane algse ravimiga ning resistentsuse teke on kõrge tõenäosusega. Täiesti uute toimemehhanismidega antibiootikumide ja nende klasside leidmine on seega kriitilise tähtsusega.

Meditiinis soodustab resistentsuse teket antibiootikumide väärkasutus haiguste ravil ja ka loomadele antibiootikumide manustamine haiguste ennetamiseks ja kasvu stimuleerimiseks, eriti suur probleem antibiootikumide kasutamisel loomakasvatustes on arengumaades. Mitmed uuringud on näidanud, et resistentsusgeene ja seeläbi ka (multi)resistentseid baktereid leidub nii reo- kui heitvees haiglate ja loomakasvatuste läheduses ning reovee puhastamise meetodikad ei keskendu piisavalt antibiootikumijääkidele (Czekalski *et al.*, 2012; Peak *et al.*, 2007). Metaboliseerimata ravimid võivad seega koguneda keskkonnas ning põhjustada DNA mutatsioonide ja horisontaalse geeniülekanne tõttu resistentsuse laialdast teket ja levikut. Euroopas keelati aastal 2006 antibiootikumide kasutus loomade kasvu stimuleerimiseks ning ka inimeste ravimiseks kasutatavate antibiootikumide tarbimine veterinaarias eesmärgiga

vähendada resistentsete bakterite teket loomakasvatuses ning nende levikut inimestele. Rangemad piirangud antibiootikumide kasutamisele loomakasvatuses sunnivad leidma nende asemele uusi alternatiive patogeenide kontrollimiseks ja kasvu stimuleerimiseks, mis hoiaksid resistentsuse teket ning levikut kontrolli all.

Sel aastal (2024) avalikustas Maailma Terviseorganisatsioon (WHO) uuendatud nimekirja patogeenidest, millele on oluline leida resistentsuse tõttu uusi antibiootikume ning mis on jaotatud kriitilisuse alusel kolme gruppi. Suur osa neist ja kõige kriitilisema tähtsusega on gram-negatiivsed haigustekitajad, sh karbapeneemile resistentsed seltsi *Enterobacterales* kuuluvad bakterid ja *Acinetobacter baumannii*. Gram-negatiivsete bakterite infektsiooni puhul raskendab ravi asjaolu, et neid ümbritseb välismembraan, mida gram-positiivsetel bakteritel ei ole. Olemasolevate antibiootikumide märklauad on välismembraani all ning ravimite läbimine poriinide kaudu või seondumine membraani pinnale on raskendatud selle koostist määravate geenide pideva muteerumise tõttu (joonis 1). On näidatud, et antibiootikumide kasutamine põhjustab bakterite välismembraani poriinides mutatsioone, mis langetavad transpordi efektiivsust (Lou *et al.*, 2011) või on nende ekspressioon allasurutud (Harder *et al.*, 1981). Pinnaomaduste muutuste ja välismembraani keerulise läbitavuse tõttu on seega gram-negatiivsetele bakteritele uute mehhanismidega antibiootikumide leidmine suure tähtsusega.



Joonis 1. Gram-negatiivsete bakterite ehitus ja selle piirangud antibiootikumide kasutamisel. Ravimid, mis välismembraani või selles asuvate poriinide mutatsioonide tõttu ravimi mõjule ei allu (nt vankomütsiin, β -laktaamid), on võimalik gram-negatiivsete bakterite vastu mõjuma panna, manipuleerides poriinide struktuuri läbilaskvuse suurendamiseks või välismembraani lõhkudes. Üheks selliseks välismembraani lõhkujaks gram-negatiivsete bakterite vastu on polümüksiinid. Joonis on kohandatud allikast Miller, 2016.

1.1.2. Ravimite uuskasutus antimikroobsete ainete avastamisel

Erinevalt teistest uute antibiootikumide väljatöötamise meetoditest (nt olemasolevate ravimite modifitseerimine, looduslike ühendite avastamine) on ravimiraamatukogude skriinimine uuskasutuseks odavam ja kiirem variant ning võimaldab läbi viia laiaulatuslikke skriininguid. Seeläbi on võimalik avastada antimikroobsete omadustega ravimeid, millel on juba kirjeldatud nende farmakodünaamilised ja –kineetilised omadused ning nende edasine arendus loom- ja kliinilistesse katsetesse on potentsiaalselt vähem aeganõudev ja odavam. Skriiningud võivad olla märklauapõhised (kasutatakse puhastatud märklauda, nt valku), rakupõhised (spetsiifiline märklaud puudub) või kombineeritud meetodiga, kus kasutatakse terviklikke rakke spetsiifilise huvipakkuva märklauaga, näiteks huvipakkuva geeni deletsiooni abil. Samas tuleb arvestada asjaoluga, et *in vitro* omadused, sealhulgas MIC võivad oluliselt erineda *in vivo* omast ning samuti ei ole teatud ravimirühmi mõistlik antibiootikumina kasutada näiteks liigse toksilisuse tõttu (Jampilek, 2022). Sellele vaatamata saab uurida antimikroobset aktiivsust näitava ühendi struktuuri ja toimemehhanismi, et töötada välja ravimina kasutatav olemasolevast ühendist tuletatud või sellele analoogne aine.

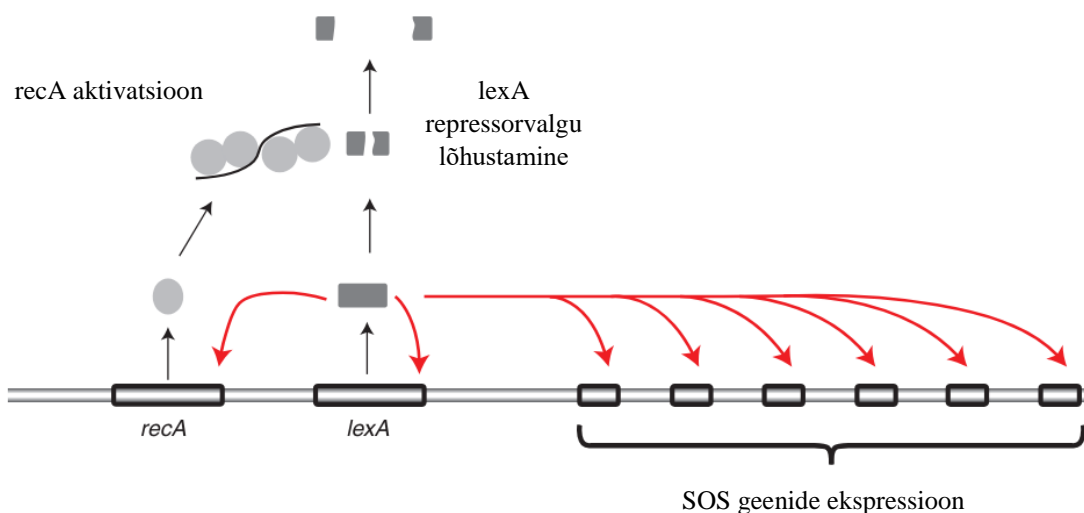
1.2. Persistorid ja mittejagunevad bakterid infektsioonis

Antibiootikumi mõjust üle saamiseks on lisaks muteerumisele ning seeläbi resistentsuse tekkele ka teine mehhanism, milleks on metaboolselt inaktiivsesse seisundisse minek (persistorid). Sellist fenotüüpi bakteritel kirjeldati juba aastal 1944, kui nähti, et väike osa baktereid ei sure pärast penitsilliiniga töötlust ning ravim on palju ebaefektiivsem mittejagunevate bakterite vastu (Bigger, 1944). See erineb resistentsusest selle poolest, et need omadused, mis aitavad bakteritel antibiootikumiravi üle elada, ei ole päritavad vaid eksisteerivad ajutiselt mingis alampopulatsioonis bakterites. Järjest rohkem viitavad uuringud sellele, et persistentsete bakterirakud võivad infektsioonikoldes olla kroonilise haiguse põhjustajaks ning nende allumatus antibiootikumiravile põhjustab nende bakterite uuesti kasvamahakkamisel haiguse korduva tagasituleku. Kuseteede infektsiooni (UTI) mudelites on näidatud, et uropatogeensed *E.coli* (UPEC) tüved ei allu loomudelisel täielikult antibiootikumiravile ning krooniline nakkus on põhjustatud persistentsete mittejagunevate bakterite kogunemisest epiteeli rakkudesse

(Blango ja Mulvey, 2010). Samas tuleb tähele panna, et isegi loomudel on raske korrektset jälgendada inimeste kroonilist infektsiooni, kuna hiirte eluiga on niivõrd lühike, ning vastavatest uuringutest tehtud järeldused UPEC mehhanismidele kroonilises infektsioonis on hüpoteetilised.

1.2.1. SOS vastus

Ühe mehhanismina persistentsete bakterite antibiootikumitolerantsusel on näidatud SOS vastuse induktsiooni. 1975. aastal püstitati SOS vastuse mehhanismi hüpotees, mille järgi UV kiirguse tõttu tekkinud DNA kahjustus indutseerib $recA^+$ ja $lexA^+$ bakterites mutatsioone tekitava DNA parandamise mehhanismi, mis on normaalsetes tingimustes alla surutud (Radman, 1975). LexA on repressorvalk, mis seondub erinevate SOS geenide promootoralas esineva palindroomse SOS-*box* järjestusega (Kenyon ja Walker, 1980; Lewis *et al.*, 1994). DNA kahjustuse tekkimise korral seondub tekkinud üksikahelalise DNA-ga *recA* valk, mis aktiveerub ning käitub vaba LexA lõhustamisel ko-proteasina (Little, 1991). Repressori inaktivatsioonil tõuseb DNA parandamisel osalevate SOS geenide ekspressioon (joonis 2).



Joonis 2. SOS vastuse induktsiooni lihtsustatud skeem. LexA repressorvalk on normaalsetes tingimustes seotud SOS geenide promootoralaga. DNA kahjustusel seondub *recA* üksikahelalise DNA-ga ning selle aktiveerumisel osaleb *recA* repressorvalgu lõhustamisel. Vabadelt promootoraladelt algab SOS geenide ekspressioon. LexA käitub ka *recA* repressorvalguna. Joonis on kohandatud allikast Kreuzer, 2013.

Kuna SOS süsteemis on lisaks väiksemaulatuslikele DNA parandustele ja bakterite jagunemise inhibeerimisele aktiveeritud ka vigaderohke sünteesiga DNA polümeraaside töö (Napolitano, 2000), võib mutatsioonide teke selle mehhanismiga olla üks resistentsuse tekke võimalus. Tõepoolest, on näidatud, et SOS vastuse indutseerimine *in vitro* ja *in vivo* muudab bakterirakke

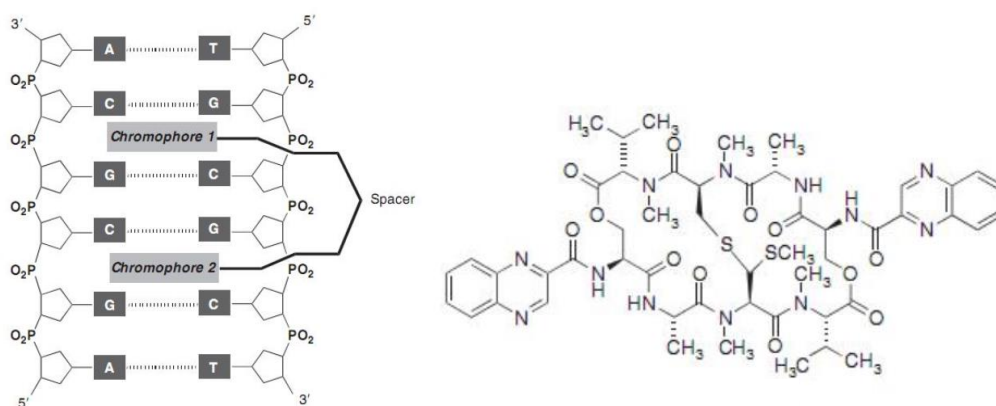
persistentsmaks antibiootikumidele ning nende MIC infektsioonimudelil tõuseb oluliselt (Crane *et al.*, 2021; Beaber *et al.*, 2004; Cirz *et al.*, 2005).

1.3. Kasutatud DNA-ga interakteeruvad vähiravimid

Järgnevalt kirjeldatud vähiravimid on antibiootikumide ja molekulaarse mikrobioloogia tööühma skriiningust leitud grupp ravimeid, millel tuvastati mittekasvavatele bakteritele bakteritsiidne ja/või bakteriostaatiline mõju.

1.3.1. Ehhinomütsiin

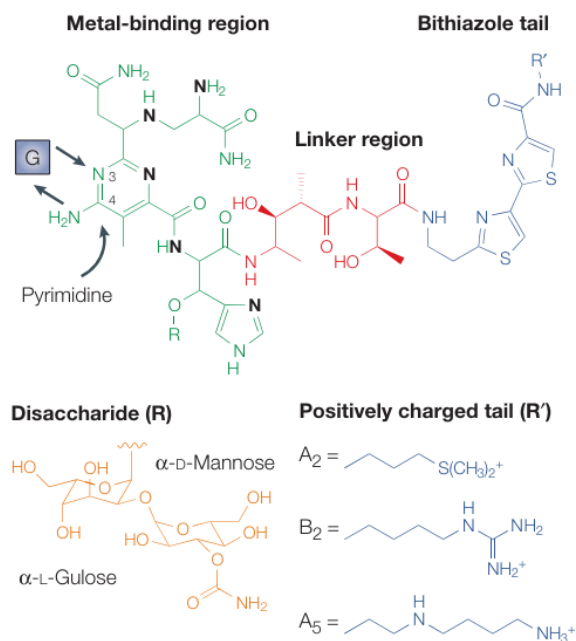
Ehhinomütsiin (ECH) on DNA-ga interkaleeruv aine, mis siseneb DNA aluspaaride vahele, inhibeerides seeläbi DNA ja RNA sünteesi (*bis-intercalation*; joonis 3). Ravim takistab transkriptsioonifaktori HIF-1 (*hypoxia-inducible factor 1*) seondumist DNA-le, surudes alla vähiga seotud geenide ekspressiooni (Kong *et al.*, 2005). Vähi puhul on HIF-1 α (HIF-1 subühik) üleekspressioonitud ning see soodustab näiteks apoptoosi allasurumise ja metastaasiga seotud geenide ekspressiooni (Semenza, 2003).



Joonis 3. Ehhinomütsiini molekulaarne struktuur. Vasakul on kujutatud bis-interkaleeruva ühendi üldskeem seondumisel DNA-ga. Paremalt on kujutatud ehhinomütsiini molekulaarne struktuur. Joonised on võetud allikast Goftar *et al.*, 2014.

1.3.2. Bleomütsiin

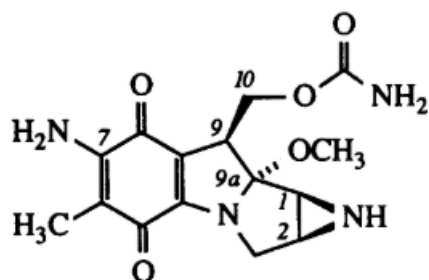
Bleomütsiini (BLE) tsütotoksilisus vähiravis on eeldatavalt seotud DNA kahjustamisega (joonis 4). *In vitro* on näidatud, et osa ravimi molekulist interkaleerub DNA-ga, metalliiooni ja hapniku juuresolekul on bleomütsiin aktiveeritud ning suudab teha DNA-sse ühe- ja kaheaheeliseid katkeid reaktiivsete radikaalide tekke tõttu (Hay *et al.*, 1991; Hecht, 2000; Chen ja Stubbe, 2005).



Joonis 4. Bleomütsiini molekulaarne struktuur. Bleomütsiin A2 ja B2 on peamised vähiravis kasutatavad vormid. Joonis on võetud allikast Chen ja Stubbe, 2005.

1.3.3. Mitomütsiin C

Mitomütsiin C (MTC; joonis 5) on genotoksiline aine, mida on kasutatud SOS vastuse uurimisel kasvavas bakterikultuuris (Dörr *et al.*, 2009). MTC on alküleeriv ühend, mis läbides mitmeid reaktsioone osaleb DNA ahelate vahelise kovalentse ristseose tekkel ning selle tõttu inhibeerib DNA sünteesi ja transkriptsiooni (Tomasz *et al.*, 1987). Samuti on näidatud, et ristseosed tekivad MTC mõjul nii kasvavates kui ka mittekasvavates bakterites (Kwan *et al.*, 2015).

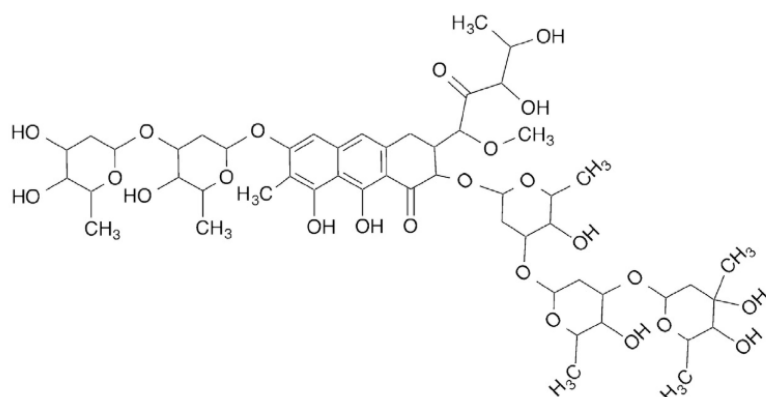


Joonis 5. Mitomütsiin C molekulaarne struktuur. Joonis on võetud allikast Tomasz *et al.*, 1987.

1.3.4. Plikamütsiin

Plikamütsiin (PLI; kirjanduses ka *Mithramycin A*) (joonis 6) on DNA-ga pöörduvalt (ei interkaleeru) seonduv vähiravimina kasutatav ühend. PLI seondub DNA väikese vaoga G-C

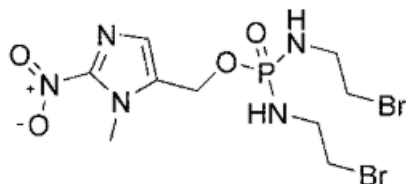
rikkas piirkonnas ning on Mg^{2+} -sõltuv (Aich ja Dasgupta, 1990). PLI inhibeerib lisaks teistele transkriptsioonifaktoritele ka Sp1 seondumist vähiga seotud geenide promootoritele; Sp1 üleekspressiooni on näidatud vähirakkudes (Wang *et al.*, 2003).



Joonis 6. Plikamütsiini molekulaarne struktuur. Joonis on võetud allikast Portugal, 2018.

1.3.5. Evofosfamiid

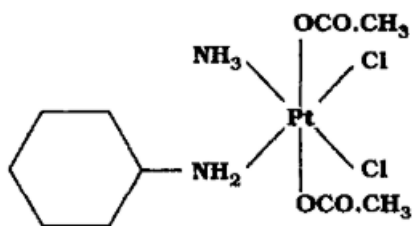
Evofosfamiid (EVO; kirjanduses ka TH-302) (joonis 7) sünteesiti ifosfamiidi alusel ning on eelravim (*prodrug*), mis vabastab DNA-d ristsiduva ühendi. Eukarüootsetes rakkudes avaldub ravimi aktiivsus selektiivselt hüpoksilistes tingimustes, mis on omane vähirakkudele. (Duan *et al.*, 2008)



Joonis 7. Evofosfamiidi molekulaarne struktuur. Joonis on võetud allikast Duan *et al.*, 2008.

1.3.6. Satraplatiin

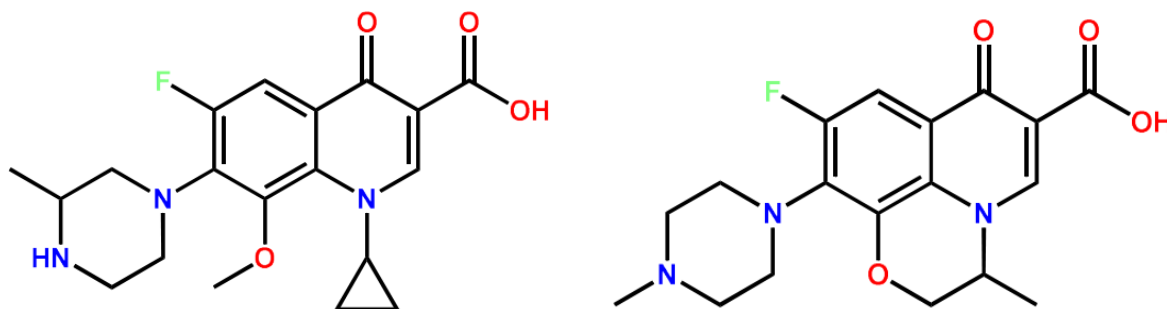
Satraplatiin (SAT) on vähiravimi tsisplatiini analoog, mis sisaldab struktuuris plaatina aatomit (joonis 8). Satraplatiin osaleb DNA-s ristseoste moodustamisel ning on näidanud potentsiaali võrreldes tsisplatiiniga vähesema toksilisuse ning suukaudse manustamise võimaluse tõttu (Mellish *et al.*, 1995).



Joonis 8. Satraplatiini molekulaarne struktuur. Joonis on võetud allikast Mellish *et al.*, 1995.

1.3.7. Gatifloksatsiin ja ofloksatsiin

Nii gatifloksatsiin (GAT) kui ka ofloksatsiin (OFL) on fluorokinoloonide rühma antibiootikumid (joonis 9). Fluorokinoloonide märklauad on DNA güraas, mis töötab replikatsioonikahvli ees, et eemaldada DNA sünteesi käigus tekkivat superspiralisatsiooni ja topoisomeraas IV, mis eraldab bakteri genoomi replikatsiooni käigus tekkinud DNA molekulid. Fluorokinoloonid on bakteritsiidsed ja indutseerivad bakteris SOS vastuse (Dörr *et al.*, 2009; Völzing ja Brynildsen, 2015).



Joonis 9. Gatifloksatsiini (vasakul) ja ofloksatsiini (paremal) molekulaarsed struktuurid. Joonised on võetud allikast Hryhoriv *et al.*, 2023.

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärgid

Töö üldine eesmärk on kirjeldada uurimisgrupi skriiningust välja tulnud vähiravimeid, mis on võimelised mittekasvavat uropatogeenset *E.coli* (UPEC) tüve CFT073 tapma või kasvu edasi lükkama pärast statsionaarse faasi kultuuride töötlust. Töö täpsemad eesmärgid on:

- leida sobiv reporterplasmiid ja katseprotokoll SOS vastuse tuvastamiseks;
- välja selgitada, kas kasvu inhibeerivad vähiravimid kahjustavad bakterite DNA-d ja kutsuvad bakterirakkudes esile SOS vastuse;

2.2. Materjal ja meetodika

2.2.1. Kasutatud söötmed

Bakterite kasvatamiseks ja säilitamiseks kasutati järgnevaid söötmeid:

- 1) LB vedelsööde: sööde valmistati pulbrist ja autoklaaviti vastavalt tootja (BD Difco™) juhiste, sisaldab trüptooni 10 g/l, pärmiekstrakti 5 g/l, naatriumkloriidi 10 g/l;
- 2) LB agar: sööde valmistati pulbrist ja autoklaaviti vastavalt tootja (BD Difco™) juhiste, sisaldab trüptooni 10 g/l, pärmiekstrakti 5 g/l, naatriumkloriidi 10 g/l, agarit 15 g/l;
- 3) SOB vedelsööde: sööde valmistati pulbrist ja autoklaaviti vastavalt tootja (BD Difco™) juhiste, sisaldab trüptooni 20 g/l, pärmiekstrakti 5 g/l, naatriumkloriidi 0.5 g/l, magneesiumsulfaati 2.4 g/l, kaaliumkloriidi 186 mg/l;
- 4) SOC vedelsööde: valmistati lisades SOB söötmele 0.2% glükoosi, lisati 20% glükoosi lahust 1/100 söötme mahust;
- 5) CAMHB vedelsööde: sööde valmistati pulbrist ja autoklaaviti vastavalt tootja (BD BBL™) juhiste, sisaldab lihaekstrakti 2 g/l, kaseiini hüdroolüsaati (CAA) 17.5 g/l, tärklist 1.5 g/l, agarit 17 g/l;
- 6) 1:4 lahjendatud CAMHB vedelsööde: valmistati CAMHB söödete veega lahjendades, sööde autoklaaviti vastavalt tootja juhiste. Söödet puhverdati pärast autoklaavimist 40 mM 10x HEPES (pH 7.4) puhvriga, söödete ja puhvrit vastavalt 9:1 vahekorras;
- 7) LPM vedelsööde: 5 mM kaaliumkloriidi, 7.5 mM ammooniumsulfaati, 0.5 mM kaaliumsulfaati, 0.337 mM naatriumdiveiniksulfaati lahustati deioniseeritud vees. Pärast autoklaavimist söötmele filter-steriliseeritud 0.3% glütserooli, 0.1% CAA, 50 µM MgCl₂ ja 30 mM MES puhvrit (pH 5.5) (Coombes *et al.*, 2004).

2.2.2. Kasutatud reporterplasmiidid, bakteritüvi ja reagentid

Reporterplasmiid pSC101-GFPmut2-Pcda-mScarlet-1 on madala koopiaarvuga plasmiid. SOS vastust näitav reportervalk on mScarlet, mis on *cda* geeni promootori all (Aedla ja Hinno, 2020). Seleksiooniks sisaldab plasmiid ampitsilliini resistentsusgeeni, GFP mut 2* geen on konstitutiivse tet-promootori kontrolli all.

Reporterplasmiid pANO1::*cda*' on kõrge koopiaarvuga plasmiid. SOS vastust näitav reportervalk on GFP mut 3*, mis on *cda* geeni promootori kontrolli all (Norman et al., 2005). Seleksiooniks sisaldab plasmiid ampitsilliini resistentsusgeeni.

Töös kasutati uropatogeenset *Escherichia coli* tüve CFT073. Sama bakteritüve oli kasutatud ka skriiningus, milles tuvastati vähiravimite antibakteriaalne toime.

2.2.3. Kompetentide tegemine ja transformatsioon

E.coli tüvesse CFT073 sisestati plasmiidid pANO1::*cda*' ja pSC101-GFPmut2-Pcda-mScarlet-1. Selleks tehti rakkudest keemilised kompetendid reagentidega RF1 ja RF2 (tabel 1). LB agaril kasvanud üksikkoloonia külvati 3 ml LB vedelsöötmesse ning loksutati (37°C, 200 rpm) kolm tundi aereerides. Seejärel lahjendati 400 µl rakukultuuri 20 ml SOB söötmesse ja kasvatati samadel tingimustel tiheduseni OD₆₀₀≈0.5. Bakterikultuuri inkubeeriti 15 minutit jääl. Rakukultuur valati steriilsesse 50 ml Falcon tuubi ning rakud sadestati 10 minuti jooksul tsentrifuugides (5000 rpm, 4°C). Supernatant eemaldati ning rakud resuspendeeriti 10 ml RF1 lahuses. Pärast 15 minutit jääl inkubeerimist sadestati rakud uuesti samadel tingimustel põhja, supernatant eemaldati ning rakud resuspendeeriti 1 ml RF2 lahuses.

Tabel 1. Keemiliste kompetentide tegemiseks kasutatud lahuste koostis.

RF1 (pH 5.8)		RF2 (pH 6.8)	
Ühend	Lõppkontsentratsioon liitri kohta	Ühend	Lõppkontsentratsioon liitri kohta
RbCl	100 mM	MOPS	10 mM
MnCl ₂ ·4H ₂ O	50 mM	RbCl	10 mM
CH ₃ CO ₂ K	30 mM	CaCl ₂	75 mM
CaCl ₂	10 mM	Glütserool	15 %
Glütserool	15 %		

Kompetentsetele rakkudele lisati 1.5 µl DNA-d, segati ning hoiti jääl pool tundi. Rakkudele tehti kuumašokk, selleks inkubeeriti rakkude ja DNA segu 42°C juures kaks minutit ning seejärel pandi rakud tagasi jääle. Rakkudele lisati 1 ml SOC söödet ning inkubeeriti tund aega

37°C. 100 µl rakususpensiooni plaaditi selektiivsele LB agarile, mis sisaldas 100 µg/ml karbenitsilliini ning inkubeeriti (37°C) üleöö.

2.2.4. SOS vastuse tuvastamise katseprotokoll plasmiidiga pANO1::cda'

Starterkultuuri saamiseks külvati *E.coli* CFT073 üksikkoloonia 3 ml LB söötmesse, millesse oli selektsiooniks lisatud 100 µg/ml karbenitsilliini. Baktiereid kasvatati üle öö loksutil (200 rpm, 37°C).

Üleöökkultuuri lahjendati 100 korda CAMHB söötmesse (puhverdatud 40 mM HEPES puhvriga, pH 7.4). 125 ml Erlenmeyeri kolvis kasvatati 40 ml rakukultuuri mõlemas söötmes (200 rpm, 37°C) 90 minutit, kuni $OD_{600} \approx 0.5$.

Kasvava kultuuri ravimitöötlus tehti 96 süvendiga mikrotiiterplaadil. Ravimitest tehti lahjendused veega ning nende lõppkontsentratsioonid töötlusel olid 10, 2.5, 0.5 ja 0.1 µM. Proovide lõppruumala mikrotiiterplaadil oli 200 µl. Kontrollle oli kasvava faasi kultuuris kahte tüüpi: ravimivaba kontroll, kus rakukultuurile lisati vett, ning gatifloksatsiin ja ofloksatsiin, millel on teada SOS vastuse indutseerimine kasvavas kultuuris madalal kontsentratsioonil. Mikrotiiterplaadilugejal BioTek Synergy H1 mõõdeti 20 tunni jooksul GFP fluorestsentsi ning OD_{600} , plaati pidevalt loksutades ja 37°C hoides.

Statsionaarse faasi kultuuri jaoks kasvatati starterkultuur ja lahjendati sada korda 1:4 CAMHB söötmesse (40 mM HEPES, pH 7.4) sarnaselt eelnevalt kirjeldatule, Seda inkubeeriti loksutil 24 tundi (200 rpm, 37°C). Ravimitöötlus toimus 96 süvendiga mikrotiiterplaadil lõppkontsentratsioonidel 10, 2.5, 0.5 ja 0.1 µM. Plaati hoiti 24 tundi suletud niiskes karbis 37°C juures. Enne ja pärast töötlust mõõdeti GFP fluorestsentsi ja OD_{600} väärtused ning võeti proovid voolutsütomeetriga analüüsimiseks.

Rakkude töötlusjärgseks üleskasvatamiseks kasutati ravimi väljalahjendamist proovidest. Kokku tehti 96 süvendiga mikrotiiterplaadile 2500-kordne lahjendus: 4 µl bakterikultuuri lisati 196 µl 1x PBS-le, pärast segamist lisati 4 µl lahjendatud bakterikultuuri 196 µl CAMHB söötmesse. Plaati inkubeeriti suletud niiskes karbis viis tundi 37°C, seejärel võeti proovid läbivoolutsütomeetriga analüüsimiseks.

2.2.5. SOS vastuse tuvastamise katseprotokoll reporterplasmiidiga pSC101-GFPmut2-Pcda-mScarlet-1

Starterkultuuri kasvavati nii, nagu on kirjeldatud peatükis 2.2.4.

Reporterplasmidi sobivuse kontrolliks tehti lühikatsed, kus mõõdeti mScarlet fluorestsentsi indutseerimist GAT ja OFL poolt kasvavas kultuuris. Selleks lahjendati starterkultuur (100 µg/ml karbenitsilliiniga) sada korda 3 ml LB söötmesse ning rakukultuuri kasvatati tund aega aereerides (37°C, 200 rpm). Mikrotiiterplaadile lisati kasvanud rakukultuurile gatifloksatsiini ja ofloksatsiini lõppkontsentratsioonidega 0.1 µM ja 0.3 µM ning plaadilugejal mõõdeti kuue tunni jooksul mScarleti fluorestsentsi intensiivsust ja OD₆₀₀ väärtust.

Üleöökultuuri lahjendati sada korda kahte erinevasse söötmesse: LPM (puhverdatud 30mM MES puhvriga, pH 5.5) või 1:4 lahjendatud CAMHB (puhverdatud 40 mM HEPES puhvriga, pH 7.4). 125 ml Erlenmeyeri kolvis kasvatati 40 ml rakukultuuri mõlemas söötmes (200 rpm, 37°C) 90 minutit, kuni OD₆₀₀≈0.5. Kasvava faasi kultuuri töödeldi vähiravimitega mikrotiiterplaadil, 20 µl 200 µM ravimilahusele lisati 180 µl rakukultuuri ning kontrollidele lisati 20 µl vett. Mikrotiiterplaadilugejal mõõdeti kuue tunni jooksul mScarleti fluorestsentsi intensiivsust ja OD₆₀₀, temperatuuril 37°C ja plaati pidevalt loksutades.

Statsionaarse faasi kultuuri katses lahjendati starterkultuuri sada korda LPM ja 1:4 lahjendatud CAMHB söötmesse, ravimitöötlus toimus 1.5 ml Eppendorfi tuubides. 475 µl rakukultuurile lisati 25 µl vahetult enne töötlust tehtud 200 µM ravimilahust, kontrollidele lisati vett. Tuube inkubeeriti 37°C juures 24 tundi ilma loksutamata. Enne ja pärast ravimitöötlust võeti 25 µl proovid, lisati 175 µl 1x PBS-i ja mõõdeti mScarleti fluorestsentsi intensiivsuse ning OD₆₀₀ väärtused.

Bakterid sadestati pärast inkubatsiooni viie minuti jooksul tsentrifuugides (5000×g, 20°C). Rakke pesti kaks korda, resuspendeerides need 1 ml 1x PBS-ga ja tsentrifuugides. Seejärel resuspendeeriti bakterid 475 µl 1x PBS-s, (esialgne proovi maht). Kõikidele proovidele lisati lahjendamata CAMHB söödet vahekorras 1:7 (25 µl proovi ja 175 µl MHB söödet). Rakkude töötlusjärgsel kasvamahakkamisel mõõdeti fluorestsentsi ja OD₆₀₀ väärtused mikrotiiterplaadilugejal 37°C juures, plaati pidevalt loksutades.

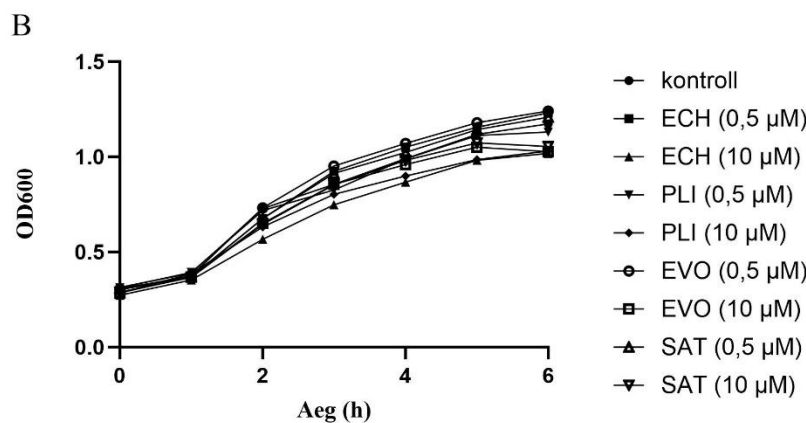
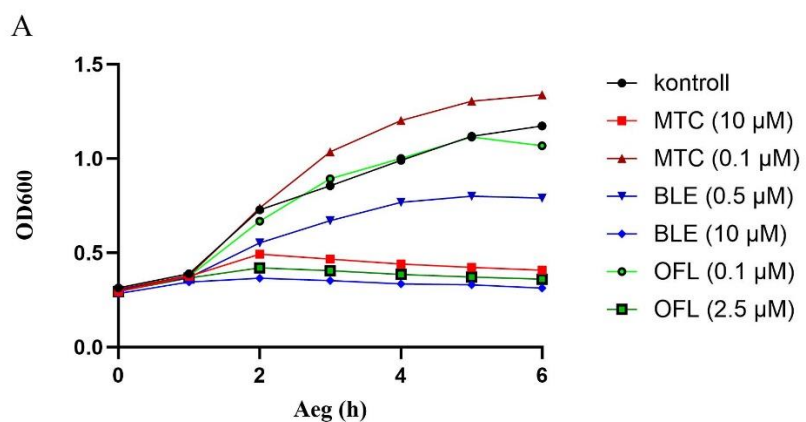
2.2.6. Lävivoolutsütomeetriga analüüs

Lävivoolutsütomeetriga Attune NxT analüüsiti statsionaarse faasi töötluste proove ja töötlusjärgselt kasvamahakkanud proove pärast viit tundi töötlust. Võetud proovidele lisati samas mahus 30% glütserooli, külmutati vedelas lämmastikus ja säilitati -80°C juures. Proove lahjendati selliselt, et bakterite arv proovides oleks ~10⁶ CFU/ml. Statsionaarsesse faasi proove lahjendati analüüsiks kokku tuhat korda 1x PBS-s, kasvama hakanud proove lahjendati 20 korda. Analüüs toimus U-põhjaga 96 süvendiga mikrotiiterplaadil.

2.3. Tulemused ja arutelu

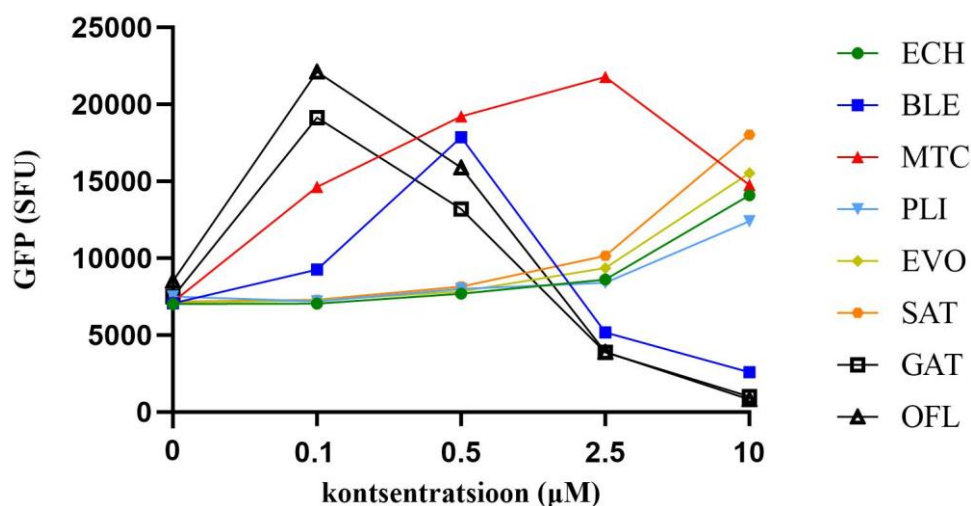
2.3.1. SOS vastuse esilekutsumine vähiravimite poolt reporterplasmiidiga pANO1::cda'

Esimesed katsed viidi läbi reporterplasmiidiga pANO1::cda', milles SOS vastuse reportervalguks on GFP mut 3*. Plasmiidis kasutatakse ColD plasmidi cda geeni promootorit. Selle reporteriga on näidatud SOS vastuse esilekutsumist DNA-d kahjustava ühendi N-metüül-N'-nitro-N-nitrosoguanidiini (MNNG) poolt kasvavatel bakteritel. Avaldatud tulemuste põhjal on tegu tundliku reporteriga (Norman et al., 2005). Selleks, et hinnata pANO1::cda' sobivust SOS vastuse mõõtmiseks kasvavas ja statsionaarse faasi bakterikultuuris, lisati kasvavale *E. coli* kultuurile uuritavaid vähiravimeid ja fluorokinoloonide rühma kuuluvaid antibiootikume GAT ja OFL ning mõõdeti kultuuri optilist tihedust ja GFP fluorestsentsi mikrotiiterplaadi lugejal 20 tunni jooksul. Esimese 6 tunni jooksul, kui bakterite kasv jätkus, nähti tugevat SOS vastuse esilekutsumist mitomütsiin C (MTC) ning bleomütsiini (BLE) poolt. GAT, OFL ja BLE kõrgemal kontsentratsioonil oli kasv inhibeeritud (joonis 10), aga GFP ekspressioon madal (SOS vastust ei indutseeritud).



Joonis 10. Plasmidi pANO1::*cda*' sisaldavate bakterikultuuride kasvukõverad ravimite kõrgemal ja madalamal kontsentratsioonil esimese 6 tunni jooksul. A. Ravimite MTC, BLE ja OFL ravimi kõrgemal kontsentratsioonil on kasv inhibeeritud. Edaspidi on ka näha, et BLE ja OFL puhul SOS vastust kõrgel ravimikontsentratsioonil ei indutseerita. B. Ravimite ECH, PLI, EVO ja SAT puhul ei toimunud kasvava faasi kultuurides kasvu inhibitsiooni.

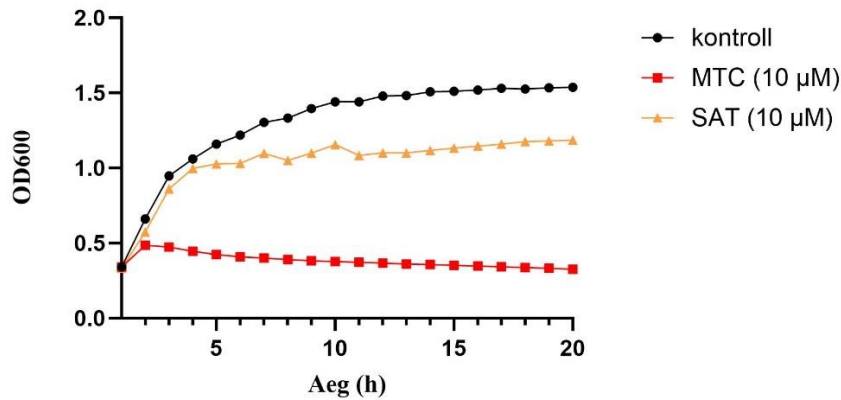
MTC põhjustas SOS vastust kõigil testitud kontsentratsioonidel (0.1 kuni 10 μM). BLE tekitas tugeva SOS vastuse 0.5 μM kontsentratsioonil. Samas, 2.5 ja 10 μM BLE ilmselt inhibeeris GFP ekspressiooni ja bakterite roheline fluorestsents oli madalam kui ravimivabas kontrollis. GAT ja OFL indutseerisid SOS vastuse madalatel kontsentratsioonidel (0.1 ja 0.5 μM), kusjuures nende fluorokinoloonide kõrgemad kontsentratsioonid ei põhjustanud SOS vastust vaid, vastupidi, inhibeerisid GFP sünteesi võrreldes ravimivaba kontrolliga (joonis 11). See tulemus võib tunduda üllatav, aga on teada meie labori varasematest katsetulemustest.



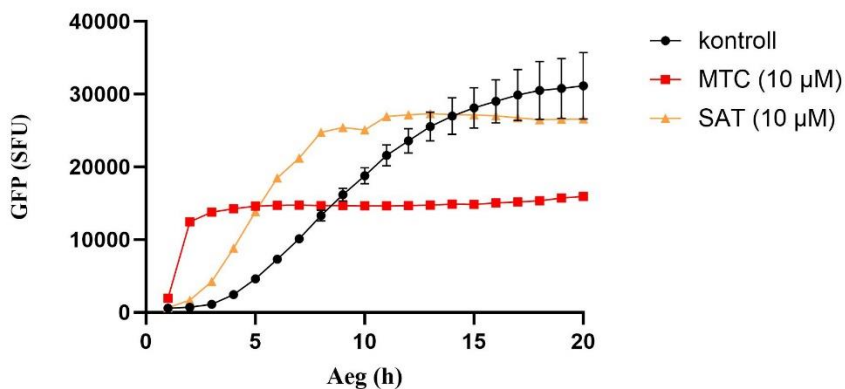
Joonis 11. SOS vastuse induktioon pANO1::*cda*' plasmiidiga kasvavas kultuuris erinevatel ravimi kontsentratsioonidel pärast kuut tundi töötlust. GFP fluorestsents on normaliseeritud kultuuri optilisele tihedusele (SFU – *specific fluorescence unit*, GFP jagatud OD₆₀₀-ga). Fluorokinoloonid (GAT, OFL) ja BLE indutseerivad GFP ekspressiooni madalamatel kontsentratsioonidel. Ülejäänud vähiravimitel on kasvavas kultuuris SOS vastus indutseeritud kõrgeimal kontsentratsioonil, kuid ka ravimivabades kontrollides (0 kontsentratsioon) on GFP ekspressioon kõrgem kui 10 μM GAT ja OFL juuresolekul. Katse on tehtud ühes korduses.

Ravimivaba kontroll näitas alates viiendast tunnist samuti GFP taseme olulist tõusu (joonis 12). Kuna esimeses kasvava faasi katses mõõdeti proove 20 tundi ning proovid lähenesid statsionaarsele kasvufaasile, oli juba antud katses näha, et reporterplasmid üleekspressiseerib GFP-d ravimivabades proovides, mis ei ole sobilik mittekasvavate bakterite SOS vastuse mõõtmiseks.

A



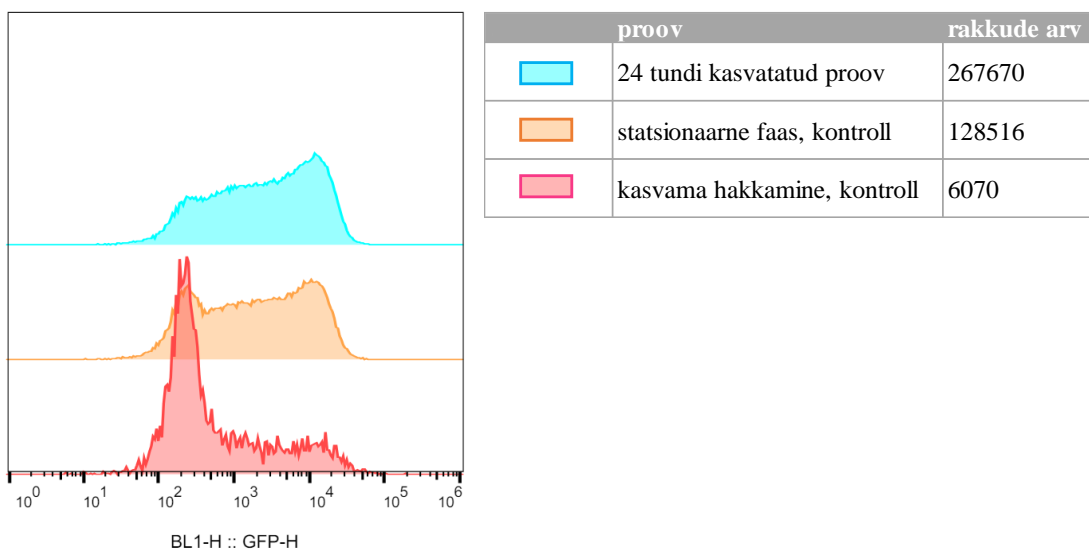
B



Joonis 12. Ravimivaba kontroll kasvavas kultuuris võrldluses kahe ravimiga. A. Kasvukõverad. **B.** SOS vastuse induktsioon, GFP on normaliseeritud kultuuri optilisele tihedusele. On näha, et ravimivabas kontrollis on GFP üleekspressioon ning ei kirjelda bakterite tavalist (stessivabades tingimustes) SOS vastuse induktsiooni – see indutseeritakse reporterplasmiidiga sõltumata ravimitötlusest.

Plasmidi ebasobivust statsionaarse (mittejaguneva) faasi kultuuri SOS vastuse uurimiseks kinnitasid läbivoolutsütomeetriga analüüsitud proovid. 24 tunni vanuses statsionaarse faasi kasvatatud rakukultuuris oli GFP valg ekspressioon kõrge tasemel sõltumata ravimitötlusest. 48 tunni vanustes statsionaarse faasi proovides oli näha bakterite rakutiheduse langust. Rohkem kui pooled rakud on kadunud (lüüsunud) ja vähemaks oli jäänud just tugevalt fluorestseeruvaid rakke. Peale bakterite lahjendamist värskesse kasvusöötmesse oli näha bakterite arvu olulist vähenemist. Proovist olid kadunud tugevalt fluorestseeruvad bakterid, enamuse rakke olid madala GFP sisaldusega (joonis 13). Ainus seletus saadud tulemustele on, et GFP valg ekspressioon pANO1::*cds* plasmidi sisaldavates bakterites toimub kultuuri vananedes ja statsionaarsesse faasi jõudes ka ilma DNA kahjustust põhjustavate ainetega lisamata. GFP akumulatsiooniga kaasneb bakterite lüüs. Seega võib eeldada, et GFP kõrge ekspressioon nii töödeldud kui ka töötlemata proovides põhjustas statsionaarsesse faasi jõudes

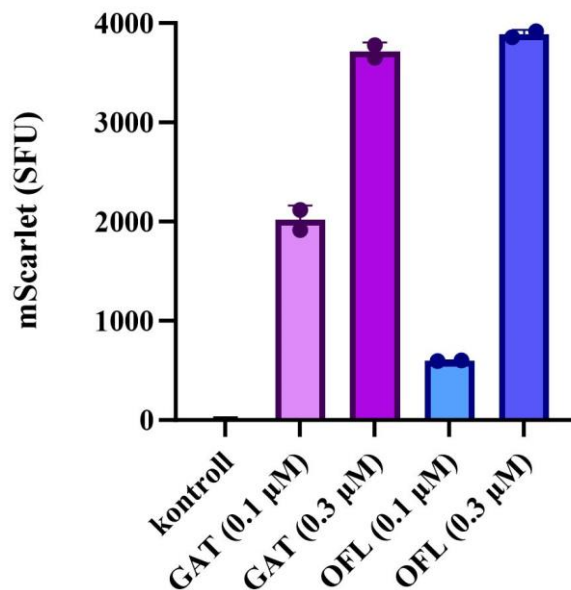
ja kasvamahakkamisel bakterite lüüsumise. Kokkuvõttes nägime, et pANO1::*cda* pole sobiv reporter statsionaarse faasi kultuuris SOS vastuse iseloomustamiseks.



Joonis 13. GFP valgu ekspressioon kolmes töötlemata proovis. Histogramm näitab sündmuste (bakterirakkude) jaotumist fluorestsentsi järgi. Bakterirakud on eelnevalt eristatud taustamürast (lisa 1). Sinise värviga on näidatud statsionaarsesse faasi kasvatatud ravimivaba proov, kus suurem osa rakke on juba kõrge GFP ekspressiooniga. Oranži värviga on näidatud statsionaarse faasi katse kontroll (48h kasvanud). Roosa värviga on näidatud kasvama hakkamisel pärast viit tundi võetud kontroll.

2.3.2. SOS vastuse esilekutsumine vähiravimite poolt reporterplasmiidiga pSC101-GFPmut2-Pcda-mScarlet-1

Selleks, et testida pSC101-GFPmut2-Pcda-mScarlet-1 sobivust reporterplasmiidina, testiti seda kõigepealt kasvavas *E. coli* kultuuris kasutades SOS vastuse käivitamiseks fluorokinoloone. Selleks lahjendati starterkultuur sada korda 3 ml LB söötmesse ning rakukultuuri kasvatati tund aega aereerides. Kasvanud bakterikultuurile lisati gatifloksatsiini ja ofloksatsiini ning plaadilugejal mõõdeti kuue tunni jooksul mScarleti fluorestsentsi intensiivsust ja OD₆₀₀ väärtust (joonis 14). Reporterplasmiid andis tugeva fluorestsentsi signaali – GAT ja OFL vahe kontrolliga oli üle kaheksa kordne. Kuna kontrollides ei esinenud SOS vastuse induktsiooni, otsustati reporterplasmidi kasutada edaspidistes katsetes.

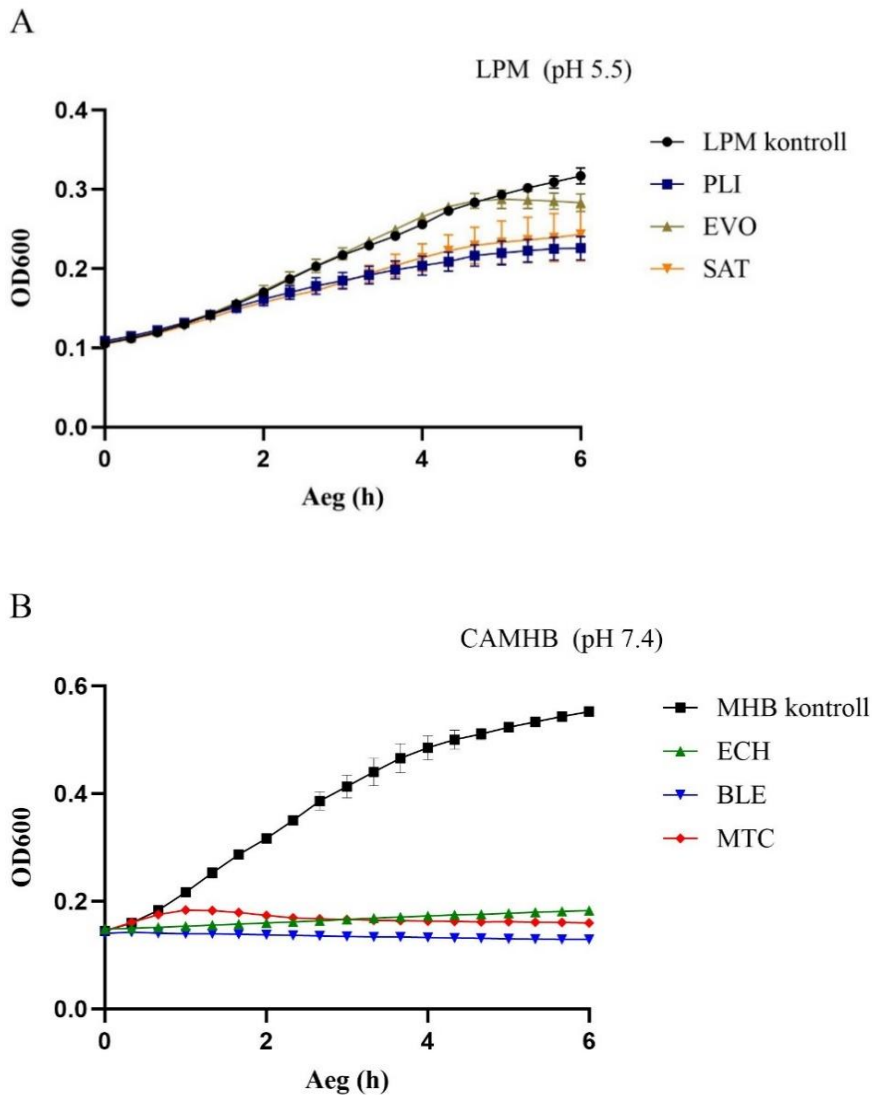


Joonis 14. SOS vastuse induktsioon plasmidi pSC101-GFPmut2-Pcda-mScarlet-1 sisaldavas kultuuris fluorokinolonidega gatifloksatsiin ja ofloksatsiin. Fluorestsentsi väärtused on võetud pärast kuut tundi ravimitöötlust, tulemused on normaliseeritud kultuuri optilisele tihedusele (SFU – *specific fluorescence unit*, mScarlet jagatud OD₆₀₀-ga). Ravimivabas proovis on SOS vastuse induktsioon minimaalne ning fluorokinolonidega, millel on madalal kontsentratsioonil teada DNA-d kahjustav toime kasvavas kultuuris, on tugev mScarleti fluorestsentsi intensiivsus.

Edasiste katsete kiirendamiseks ja lihtsustamiseks võeti kasutusele peatükis 2.2.5. kirjeldatud katseprotokoll, kus peale statsionaarse faasi bakterite ravimitöötlust pesti neid PBS-ga, lahjendati värskes söötmes 1:7 ja mõõdeti fluorestsentsi ning OD₆₀₀ mikrotiiterplaadil.

2.3.2.1. SOS vastuse esilekutsumine vähiravimite poolt kasvavas rakukultuuris

Kasvavas bakterikultuuris SOS vastuse induktsiooni mõõtmiseks lahjendati starterkultuur kahte erineva pH-ga söötmesse ning kasvatati 90 minutit, millele järgnes ravimitöötlus. Söötmete valik oli määratud uurimisgrupi poolt tehtud katses, kus tehti kindlaks, millise pH juures on ravim aktiivsem. Logaritmilises kasvufaasis olevatel rakkudel mõõdeti ravimitöötluste ajal OD₆₀₀ ja mScarlet fluorestsentsi väärtuseid. Jagunemine oli tugevalt inhibeeritud ravimitega MTC, BLE ja ECH ning nõrgemalt ravimitega PLI ja SAT. Tugevad kasvu inhibeerijad on DNA-ga kovalentselt seonduvad ühendid ning seetõttu ka tugevamad kasvavas kultuuris jagunemise inhibeerijad. Evofosfamiid (EVO) ainuke uuritav ravim, mis ei inhibeerinud viie tunni jooksul kasvu ning selle mõju avaldus teistest ravimitest aeglasemalt (joonis 15). Evofosfamiidi aeglane mõju kasvu inhibitsioonile võib olla tingitud tema aeglasest sisenemisest raku, mistõttu avaldub tema inhibeerimise efektiivsus kasvavas kultuuris alles alates viiendast tunnist.

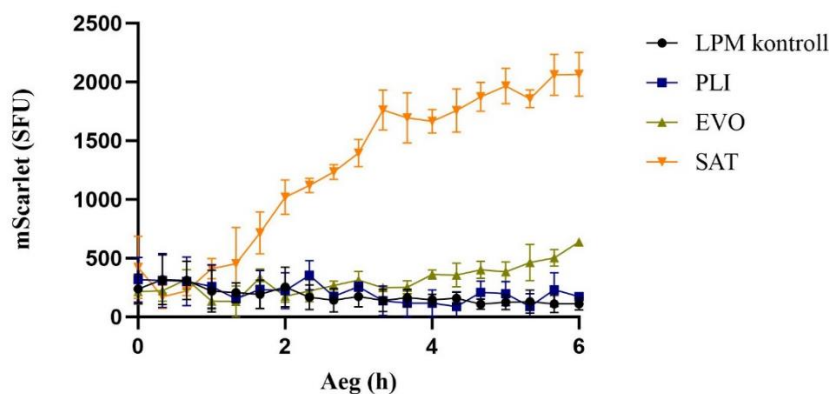


Joonis 15. Kasvu inhibitsioon ravimite poolt kasvavas kultuuris. A. Kasvu inhibitsioon LPM söötmes (pH 5.5). Plikamütsiin (PLI) ja satraplatiin (SAT) inhibeersid kasvu nõrgalt ning evofosfamiidi (EVO) inhibeeriv toime avaldus alles pärast viiendat tundi. B. Kasvu inhibitsioon CAMHB söötmes (pH 7.4). Kõik ravimid avaldasid tugevat kasvu inhibeerivat toimet rakkudele.

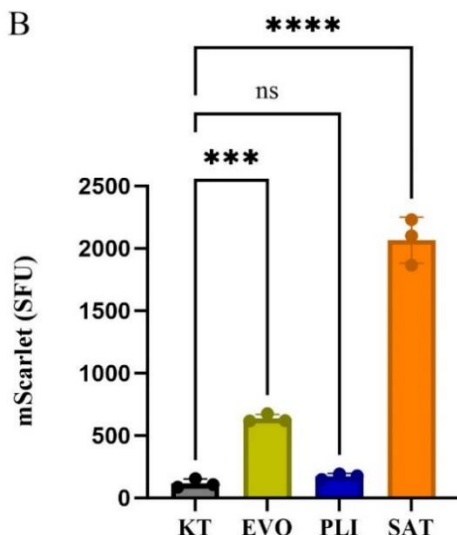
SOS vastuse induktsiooni näitas fluorestseeruv valk mScarlet. LPM söötmes inhibeersid kasvu kõige rohkem plikamütsiin ja satraplatiin, kuid neist kahest indutseeris SOS vastust tugevalt ainult satraplatiin. Evofosfamiid inhibeeris kasvavas kultuuris jagunemist alles viie tunni möödudes ning SOS vastuse induktsioon algas samal ajahetkel, seega DNA-d kahjustav toime aktiivselt jagunevates bakterites esineb, kuid mitte nii kiire toimega, kui satraplatiinil. Fluorestsentsi tugevusele tehti ka ühepoolne ANOVA (*analysis of variance*) statistiline test koos Dunnetti järeltestiga, kus viimases mõõdetud ajapunktis võrreldi iga ravimi mScarleti signaali tugevust kontrolli signaaliga. Statistiline test näitas, et nii evofosfamiid kui ka

satraplatiin indutseerisid SOS vastuse, mis oluliselt erines kontrollis mõõdetud signaalist (joonis 16).

A



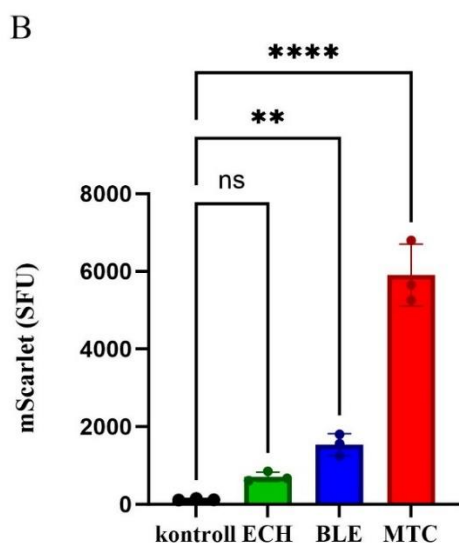
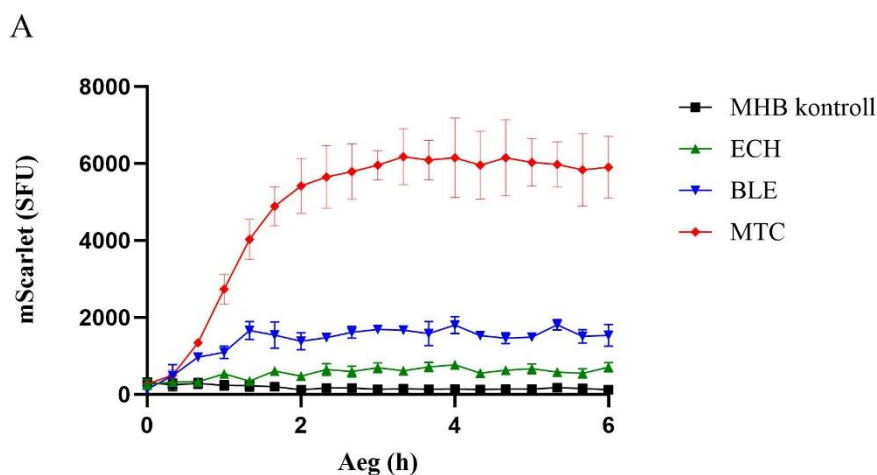
B



Joonis 16. SOS vastuse induktsioon kasvavas LPM söötmega kultuuris. A. mScarleti mõõdetud signaal kuue tunni jooksul, normaliseeritud (SFU). B. mScarleti signaali tugevus viimases mõõdetud ajapunktis. Graafikud kujutavad kolme korduse keskmist koos standardhälbega. Statistilise olulisuse leidmiseks kasutati ühepoolset sõltumatut ANOVA testi (*analysis of variance*), võrreldes iga ravimiga töödeldud proovi kontrolliga. Järeldestina kasutati Dunnetti testi; *** $P \leq 0.001$; **** $P \leq 0.0001$; ns – ei ole statistiliselt oluline.

CAMHB söötmes töödeldud ravimitega esines igas proovis tugev kasvu inhibitsioon, kuid SOS vastust indutseeris tugevalt vaid MTC. See on väga toksiline ravim ning selle tugevamalt kahjustav mõju DNA-le kasvavas kultuuris võrreldes teiste uuritavate vähivavimitega oli oodatav, sest MTC-d on varem kasutatud SOS vastuse uurimiseks kasvavates bakterikultuurides (Dörr *et al.*, 2009). SOS vastuse induktsioon oli kiire ning jõudis kahe tunniga umbes 44 korda tugevama signaalini võrreldes kontrolliga (5500 SFU), see oli ka suurim mScarleti fluorestsentsi väärtus kõikides ravimitega töödeldud kasvavates kultuurides.

Madalamat, kuid statistiliselt olulist SOS vastust indutseeris ka bleomütsiin, mis oli võrreldes ravimivaba kontrolliga umbes 13 korda tugevama signaaliga (1600-1800 SFU). Arvestades ka katseid reporterplasmiidiga pANO1::cda', võib järeldada, et bleomütsiinil on kõrgematel ravimikontsentratsioonidel SOS vastust inhibeeriv toime ning madalamatel ravimi kontsentratsioonidel suudab SOS süsteem ravimi poolt tehtud DNA kahjustused parandada. Ehhinomütsiin kasvavas rakukultuuris SOS vastust ei indutseerinud (joonis 17).

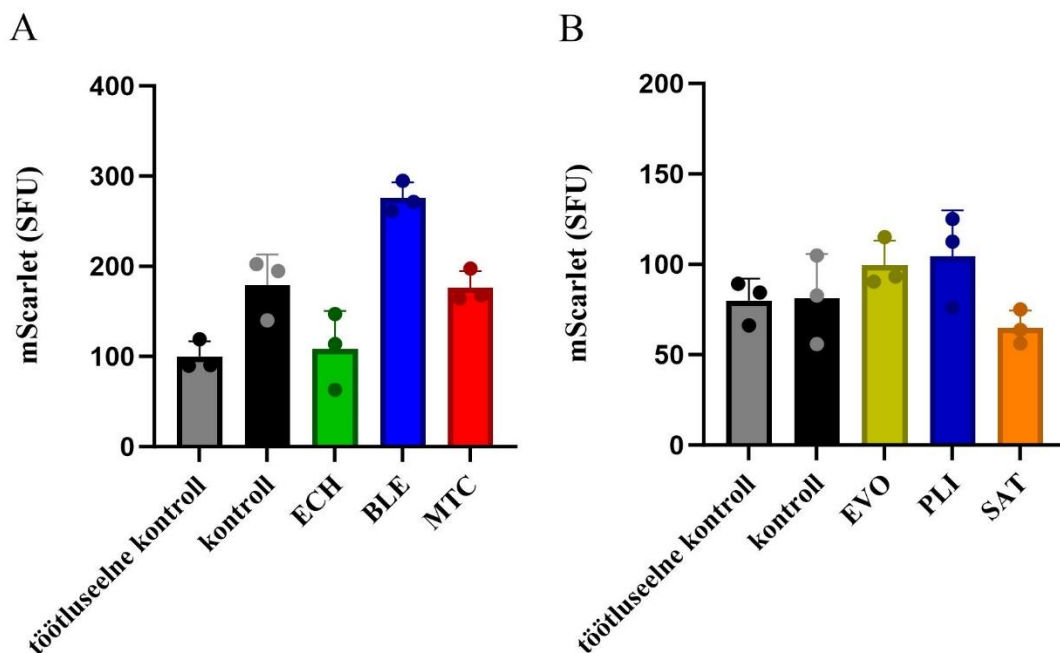


Joonis 17. SOS vastuse induksioon 1:4 lahjendatud CAMHB söötmega kasvavas kultuuris. A. mScarleti mõõdetud signaal kuue tunni jooksul, normaliseeritud (SFU). B. mScarleti signaali tugevus viimases mõõdetud ajapunktis. Graafikud kujutavad kolme korduse keskmist koos standardhällbega. Statistilise olulisuse leidmiseks kasutati ühepoolset sõltumatut ANOVA testi (*analysis of variance*), võrreldes iga ravimiga töödeldud proovi kontrolliga. Järeldustina kasutati Dunnett testi; ** $P \leq 0.01$; **** $P \leq 0.0001$; ns – ei ole statistiliselt oluline.

2.3.2.2. SOS vastuse esilekutsumine vähiravimite poolt mittejärgnevat bakterites ja nende kasvamahakkamisel

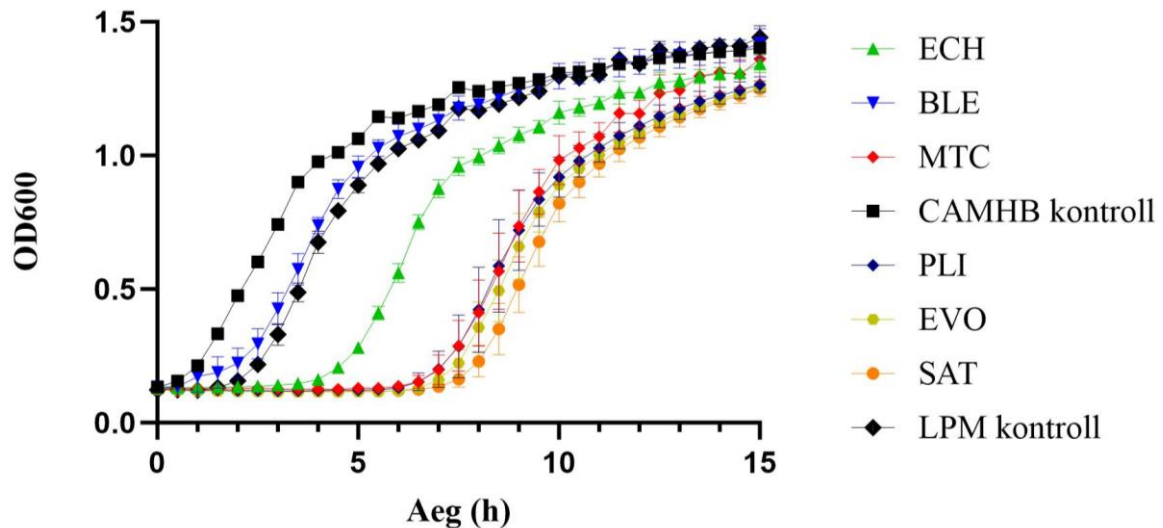
Mittekasvava (statsionaarse) rakukultuuri SOS vastuse tuvastamiseks võrreldi töötlusele eelnenud mScarleti signaali töötlusjärgse mõõtmisega. OD₆₀₀ väärtused mõõdeti tulemuste normaliseerimiseks ning töötluseelne (24h kasvanud proov) ja töötlusjärgne kontroll (48h kasvanud proov) kinnitasid, et töödeldav rakukultuur oli tõepoolest statsionaarne, jäädes enne ja pärast töötlust vahemikku 0.15–0.20 (lahjendatud proov). Samas töötluse ajal OD₆₀₀ väärtus ei langenud, mis viitab sellele, et isegi kui toimus bakterite tapmine ravimite poolt, ei põhjustanud see nende lüüsi.

Võrreldes kasvava kultuuri kontrolliga ei esinenud ravimivabas statsionaarsesse faasi kasvatatud kultuuris mScarlet valgu üleekspressiooni – kasvavas kultuuris jäi mScarlet vahemikku 100–170 SFU ning statsionaarse faasi kultuuris ei tõusnud üle 100 SFU. See viitab plasmidi paremat sobivust statsionaarses faasis rakukultuuriga katsetesse. Mitte ühegi ravimiga ei esinenud statsionaarses faasis tugevat SOS vastuse induktsiooni – CAMHB söötmes mõõdeti kõrgeim mScarleti signaal bleomütsiiniga, kus fluorestsentsi intensiivsus oli 1.5 korda kõrgem signaal võrreldes kontrolliga (keskmiselt 275 SFU) ning LPM söötmes plikamütsiiniga (keskmiselt 104 SFU) töödeldud proovides (joonis 18). MTC-ga on katseliselt tõestatud, et nii kasvavates kui mittekasvavates bakterites tekivad samasugused ristseosed DNA-s, kusjuures kasutati sama ravimi kontsentratsiooni (Kwan *et al.*, 2015). Antud katses MTC-ga töötlusel SOS vastuse induktsiooni ei esine vaatamata sellele, et on tõestatud sama mehhanism. On tõenäoline, et mittekasvavates bakterites ei ole selline DNA parandamise mehhanism võimalik või ei ole reportervalgu süntees piisav, et seda mikrotiiterplaadilugejal tuvastada. Ravimi kontsentratsioon statsionaarse faasi katseks antud katseprotokolliga valiti vastavalt uurimisgrupi eelnevates skriiningutes kasutatud kontsentratsioonile. Kuna mScarlet fluorestsentsi intensiivsus oli kõikides proovides väga madal võrreldes kasvava kultuuri katsetega, kus signaal küündis mitme tuhande SFU-ni, ei tehtud statsionaarse faasi katse tulemustega statistilisi teste.



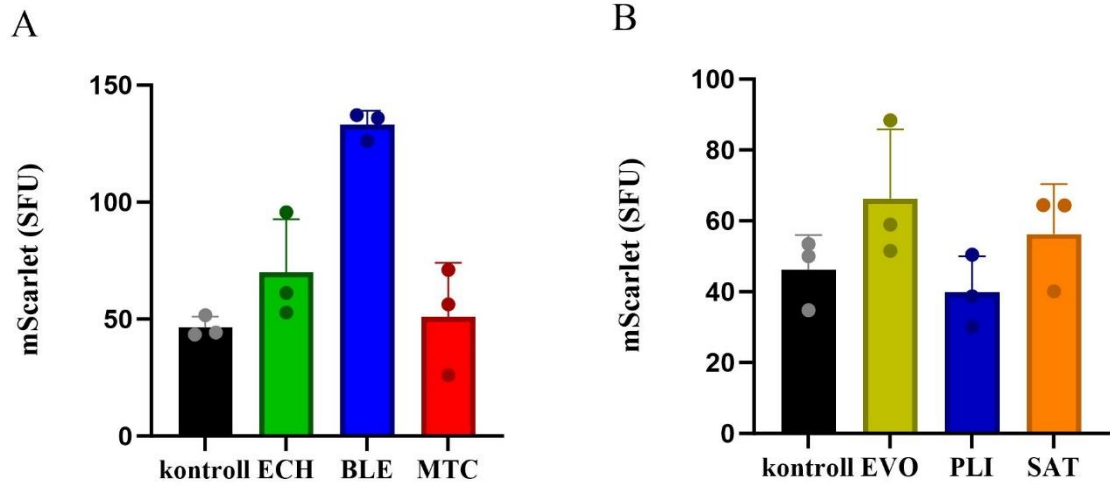
Joonis 18. SOS vastuse induktsioon statsionaarse faasi kultuurides, normaliseeritud (SFU). A. mScarleti fluorestsentsi intensiivsus 1:4 lahjendatud CAMHB söötmes töödeldud ravimitega. Töötluuseelne kontroll on statsionaarsesse faasi kasvatatud kultuuris mõõdetud mScarleti fluorestsents, kontroll on inkubatsiooni läbinud proov ilma ravimita. B. mScarleti fluorestsentsi intensiivsus LMP söötmes töödeldud ravimitega.

Statsionaarses faasis ravimitega töödeldud rakud tseptsifuugiti põhja, pesti kaks korda 1x PBS-ga ja pandi uuesti kasvama värskesse lahjendamata CAMHB söötmesse vahekorras 1:7 (25 μ l rakke ning 175 μ l CAMHB), mis tagas ravimi eemaldamise rakuvälisest keskkonnast ning ühtlasi suurema rakkude tiheduse üleskasvamise. mScarleti fluorestsentsi väärtused proovide võrdlemiseks valiti ajakõverate alusel ajahetkel, mil rakukultuur igal proovil jõudis tiheduseni $OD_{600} \approx 0.5$. Värskes söötmes kasvamahakkamisel oli näha oodatav kasvu inhibitsioon kõikide ravimite poolt, millest kõige kauem inhibeerisid kasvu mitomütsiin C, plikamütsiin, evofosfamiid ja satraplatiin (joonis 19). Evofosfamiidi mõjul kasvu inhibitsioon kasvavas kultuuris oli aeglane, kuid pärast 24 tundi statsionaarse faasi töötlust on see tugevamate inhibeerijate hulgas. See võib lisada kinnitust oletusele, et ravimi sisenemine bakterirakku on aeglane.



Joonis 19. Töötlusjärgse kasvamahakkamise kasvukõverad.

Kasvu inhibitsiooni ajal püsis kõikidel proovidel mScarleti signaal enam-vähem samal intensiivsusel (200-300 SFU), kuid kasvama hakkamisel SOS vastuse induktsiooni ei esinenud ühegi ravimiga töödeldud proovis (joonis 20). Kasvu inhibitsioon võib olla tingitud sellest, et statsionaarses faasis mõjuvad ravimid rakkudele bakteritsiidset ja surnud bakterites SOS vastust loomulikult ei indutseerita. Teine võimalus oleks, et bakterid surevad saadud DNA kahjustuse mõjul peale värskesse kasvusöötmesse viimist. SOS vastuse puudumine peale uues söötmes lahjendamist seda hüpoteesi ei toeta, sest kasvava faasi katses DNA kahjustuste tagajärjel oli SOS vastus indutseeritud. Normaliseeritud fluorestsentsi signaali graafikud näitasid mScarleti intensiivsuse langust kasvamahakkamise hetkel, sisuliselt olid need OD₆₀₀ ajakõverate pöördgraafikud. Ükski ravim, mis kasvavas rakukultuuris näitas DNA kahjustamist ja indutseeris SOS vastust, ei näitanud sama toimet edasistes katsetes. On tõenäoline, et ravimite mehhanism ei erine kasvavas faasis ja statsionaarses faasis (seda kinnitab tõestus, et MTC tekitab ristseoseid DNA-s nii kasvavates rakkudes kui ka persistorites). Ehhinomütsiin ja plikamütsiin olid ainukesed vähiravimid, mis lisaks statsionaarsele faasile ja sellejärgsele kasvamahakkamisele ei indutseerinud SOS vastust ka kasvavas rakukultuuris. Fluorestseeruva valguga madala signaali intensiivsuse tõttu ei tehtud ühelegi proovile statistilist analüüsi.



Joonis 20. Normaliseeritud mScarleti signaali intensiivsus töötlusjärgsel kasvamahakkamisel, rakukultuuri tihedusel $OD_{600} \approx 0.5$. A. Fluorestsentsi intensiivsus proovides, mida statsionaarses faasis töödeldi 1:4 lahjendatud CAMHB söötmes. B. Fluorestsentsi intensiivsus proovides, mida statsionaarses faasis töödeldi LPM söötmes.

Kokkuvõte

Käesoleva töö eesmärkideks oli leida sobilik katseprotokoll ja reporterplasmiid SOS vastuse tuvastamiseks uropatogeenses *E.coli* tüves CFT073 ning mõõta SOS vastuse induktsiooni erinevates kasvufaasides ning töötlusjärgsel kasvamahakkamisel. Antibiootikumide ja molekulaarse mikrobioloogia uurimisgrupi skriiningust tuli muuhulgas välja kuus vähiravimi kandidaati, mis näitasid kasvu inhibitsiooni pärast statsionaarse faasi bakterikultuuri ravimitöötlust. Kõik vähiravimid on erinevate mehhanismidega DNA-ga seonduvad ning seetõttu taheti välja selgitada, kas nende ravimite mõjul indutseeritakse bakterirakkudes SOS vastus. Töö käigus leiti SOS vastuse tuvastamiseks uropatogeenses *E.coli* tüves CFT073 sobiv katseprotokoll ning reporterplasmiidiks valiti pSC101-GFPmut2-Pcda-mScarlet-1, seejärel mõõdeti SOS vastuse induktsiooni.

Ainukesed ravimid, mis ei indutseerinud vaatamata kasvu inhibitsioonile SOS vastust nii kasvavas kultuuris kui ka statsionaarses faasis ja sellejärgsel kasvamahakkamisel, olid ehinomütsiin ja plikamütsiin. Kasvavas faasis näitasid SOS vastust neli ravimit: mitomütsiin C, satraplatiin, evofosfamiid ja bleomütsiin. Mittejagunevates bakterites ega ka nende töötlusele järgnenud kasvamahakkamisel ei indutseerinud ükski ravim bakterites SOS vastust. Sellele võib pakkuda erinevaid seletusi: 1) SOS vastust näitava valguga ekspressioon on statsionaarses faasis niivõrd madal, et seda ei ole võimalik tuvastada; 2) statsionaarses faasis on enamus baktereid võimetud SOS vastust indutseerima ja seeläbi oma DNA-d parandama, bakterid surevad ja töötlusjärgne kasv on seetõttu edasilükkunud. On üsna tõenäoline, et ravim töötab siiski nii jagunevates kui ka mittejagunevates bakterites sama mehhanismiga (seda on mitomütsiin C puhul ka näidatud), seega ei ole mõistlik kahtlustada uudet ravimi toimemehhanismi. SOS vastuse puudumine mittejagunevates bakterites ja nende kasvamahakkamisel aga näitab, et nende ravimite vastu puudub selle mehhanismi läbi tolerantse/resistentse tekke võimalus ning aktiivsuse tõttu raskesti ravitavate mittejagunevate bakterite vastu on need ravimid üks võimalik suund antimikroobsete ühendite väljatöötamiseks.

The induction of the SOS response by anticancer drugs in growing and stationary bacterial culture

Naomi Charlotta Andersson

Summary

In medicine, antibiotic resistance is one of the biggest problems that needs urgent attention, because discovering novel antimicrobials has slowed down significantly while resistance is constantly arising and spreading. The main causes that promote antibiotic resistance are misuse of these drugs by both medical professionals and patients, as well as overuse in agriculture and the residues of antibiotics found in the environment (Czekalski *et al.*, 2012; Peak *et al.*, 2007). The bacteria that are most difficult to treat and also need critical attention according to the World Health Organization are gram-negative bacteria. They are difficult to treat with antibiotics because of their outer membrane – antibiotics enter the cells using porins in the outer membrane, but over time they mutate and antibiotic passage is blocked (Lou *et al.*, 2011). Especially hard to treat are the gram-negative bacteria causing chronic infections, where nongrowing bacteria aren't as susceptible to antibiotic treatment (Blango ja Mulvey, 2010). The SOS response, which repairs DNA damage in cells, is another mechanism to gain antibiotic tolerance or resistance via mutations introduced while fixing DNA (Crane *et al.*, 2021; Beaber *et al.*, 2004; Cirz *et al.*, 2005). Therefore the detection of SOS response to antimicrobials is important in understanding the mechanism of potential resistance and how to target it.

The aims of this thesis were to find a suitable experiment protocol and a reporter plasmid to detect SOS response in uropathogenic *E.coli* strain CFT073 and measure the SOS response in different growth phases as well as during post-treatment regrowth. The DNA-binding anticancer drugs used for this thesis were found in the research group during a screening for antimicrobial drugs, showing activity against nongrowing bacteria. While some drugs showed SOS response induction in growing culture (mitomycin C, satraplatin, evofosfamide, bleomycin), none of the anticancer drugs induced the SOS response in the stationary phase treatment nor in the post-treatment regrowth phase. It is unlikely that these drugs have a different mechanism of action in different growth phases. The lack of SOS response could be because the cells were unable to fix the damage of the anticancer drugs during stationary phase with the SOS response as they did in the growing culture and therefore the cells died, which leads to growth inhibition during post-treatment. The bacteria could also die during post-treatment regrowth, but it is unlikely due to the lack of SOS response. Conclusively, these drugs may not be as susceptible to treatment tolerance, because no SOS response was induced, and could be a potential source for developing new antimicrobials.

Kirjanduse loetelu

Abirami, M., Gopal, J. V., & Kannabiran, K. (2015). Extraction and identification of antibacterial compound from marine *Streptomyces* sp. VITAK1 isolated from the coast of Andaman and Nicobar Islands, India. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 51(4), 406–410. <https://doi.org/10.1134/S000368381504002X>

Aedla, J., & Hinnu, M. (2020). Antibiotic detection using bioreporters based on SOS and cold shock responses. *Bakalaureusetöö. Tartu Ülikool, loodusteaduste ja tehnoloogia õppekava.*

Aich, P., & Dasgupta, D. (1990). Evidence For Two Types of Mithramycin-Mg Complex. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 173(2).

Antonoplis, A., Zang, X., Wegner, T., Wender, P. A., & Cegelski, L. (2019). Vancomycin–Arginine Conjugate Inhibits Growth of Carbapenem-Resistant *E. coli* and Targets Cell-Wall Synthesis. *ACS Chemical Biology*, 14(9), 2065–2070. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.9b00565>

Beaber, J. W., Hochhut, B., & Waldor, M. K. (2004). SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes. *Nature*, 427(6969), 72–74. <https://doi.org/10.1038/nature02241>

Bigger, J. (1944). Treatment of Staphylococcal Infections With Penicillin by Intermittent Sterilisation. *The Lancet*, 244(6320), 497–500. doi:10.1016/s0140-6736(00)74210-3

Blango, M. G., & Mulvey, M. A. (2010). Persistence of Uropathogenic *Escherichia coli* in the Face of Multiple Antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(5), 1855–1863. <https://doi.org/10.1128/AAC.00014-10>

Brown, E. D., Wright, G. D. (2016). Antibacterial drug discovery in the resistance era. *Nature*, 529(7586), 336-343. <https://doi.org/10.1038/nature17042>

Chen, J., & Stubbe, J. (2005). Bleomycins: Towards better therapeutics. *Nature Reviews Cancer*, 5(2), 102–112. <https://doi.org/10.1038/nrc1547>

Cirz, R. T., Chin, J. K., Andes, D. R., De Crécy-Lagard, V., Craig, W. A., & Romesberg, F. E. (2005). Inhibition of Mutation and Combating the Evolution of Antibiotic Resistance. *PLoS Biology*, 3(6), e176. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030176>

Coombes, B. K., Brown, N. F., Valdez, Y., Brumell, J. H., & Finlay, B. B. (2004). Expression and Secretion of *Salmonella* Pathogenicity Island-2 Virulence Genes in Response to

Acidification Exhibit Differential Requirements of a Functional Type III Secretion Apparatus and SsaL. *Journal of Biological Chemistry*, 279(48), 49804–49815. <https://doi.org/10.1074/jbc.M404299200>

Crane, J. K., Alvarado, C. L., & Sutton, M. D. (2021). Role of the SOS response in the generation of antibiotic resistance in vivo. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 65(7). Scopus. <https://doi.org/10.1128/AAC.00013-21>

Czekalski, N., Berthold, T., Caucci, S., Egli, A., & Bürgmann, H. (2012). Increased Levels of Multiresistant Bacteria and Resistance Genes after Wastewater Treatment and Their Dissemination into Lake Geneva, Switzerland. *Frontiers in Microbiology*, 3. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00106>

Duan, J.-X., Jiao, H., Kaizerman, J., Stanton, T., Evans, J. W., Lan, L., ... Matteucci, M. (2008). Potent and Highly Selective Hypoxia-Activated Achiral Phosphoramidate Mustards as Anticancer Drugs. *Journal of Medicinal Chemistry*, 51(8), 2412–2420. doi:10.1021/jm701028q

Dörr, T., Lewis, K., & Vulić, M. (2009). SOS Response Induces Persistence to Fluoroquinolones in *Escherichia coli*. *PLoS Genetics*, 5(12), e1000760. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000760>

D'Costa, V. M., King, C. E., Kalan, L., ... Wright, G. D. (2011). Antibiotic resistance is ancient. *Nature*, 477(7365), 457–461. <https://doi.org/10.1038/nature10388>

Fajardo, A., Martínez-Martín, N., Mercadillo, ... Martínez, J. L. (2008). The Neglected Intrinsic Resistome of Bacterial Pathogens. *PLoS ONE*, 3(2), e1619. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001619>

Fischbach, M. A., Walsh, C. T. (2009). Antibiotics for Emerging Pathogens. *Science*, 325(5944), 1089–1093. <https://doi.org/10.1126/science.1176667>

Goftar, M., Moradikor, N. & Kor, Z. M. (2014). DNA Intercalators And Using Them as Anticancer Drugs. *International journal of Advanced Biological and Biomedical Research*. 2. 812-822.

Harder, K. J., Nikaido, H., & Matsushashi, M. (1981). Mutants of *Escherichia coli* That Are Resistant to Certain Beta-Lactam Compounds Lack the ompF Porin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 20(4), 549–552. <https://doi.org/10.1128/AAC.20.4.549>

Hay, J., Shahzeidi, S., & Laurent, G. (1991). Mechanisms of bleomycin-induced lung damage. *Archives of Toxicology*, 65(2), 81–94. doi:10.1007/bf02034932

- Hecht, S. M. (2000). Bleomycin: New Perspectives on the Mechanism of Action¹. *Journal of Natural Products*, 63(1), 158–168. doi:10.1021/np990549f
- Hryhoriv, H., Kovalenko, S. M., Georgiyants, M., Sidorenko, L., & Georgiyants, V. (2023). A Comprehensive Review on Chemical Synthesis and Chemotherapeutic Potential of 3-Heteroaryl Fluoroquinolone Hybrids. *Antibiotics*, 12(3), 625. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12030625>
- Jampilek, J. (2022). Drug repurposing to overcome microbial resistance. *Drug Discovery Today*, 27(7), 2028–2041. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2022.05.006>
- Kenyon, C. J., & Walker, G. C. (1980). DNA-damaging agents stimulate gene expression at specific loci in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 77(5), 2819–2823. <https://doi.org/10.1073/pnas.77.5.2819>
- Kong, D., Park, E. J., Stephen, A. G., Calvani, M., Cardellina, J. H., Monks, A., Fisher, R. J., Shoemaker, R. H., & Melillo, G. (2005). Echinomycin, a Small-Molecule Inhibitor of Hypoxia-Inducible Factor-1 DNA-Binding Activity. *Cancer Research*, 65(19), 9047–9055. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-1235>
- Kreuzer, K. N. (2013). DNA Damage Responses in Prokaryotes: Regulating Gene Expression, Modulating Growth Patterns, and Manipulating Replication Forks. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(11), a012674–a012674. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012674>
- Kwan, B. W., Chowdhury, N., & Wood, T. K. (2015). Combatting bacterial infections by killing persister cells with mitomycin C. *Environmental Microbiology*, 17(11), 4406–4414. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12873>
- Lewis, L. K., Harlow, G. R., Gregg-Jolly, L. A., & Mount, D. W. (1994). Identification of High Affinity Binding Sites for LexA which Define New DNA Damage-inducible Genes in *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*, 241(4), 507–523. doi:10.1006/jmbi.1994.1528
- Little, J. W. (1991). Mechanism of specific LexA cleavage: Autodigestion and the role of RecA coprotease. *Biochimie*, 73(4), 411–421. doi:10.1016/0300-9084(91)90108-d
- Lou, H., Chen, M., Black, S. S., Bushell, ... Naismith, J. H. (2011). Altered Antibiotic Transport in OmpC Mutants Isolated from a Series of Clinical Strains of Multi-Drug Resistant *E. coli*. *PLoS ONE*, 6(10), e25825. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025825>

- Mellish, K. J., Barnard, C. F. J., Murrer, B. A., & Kelland, L. R. (1995). DNA-binding properties of novel cis- and trans platinum-based anticancer agents in 2 human ovarian carcinoma cell lines. *International Journal of Cancer*, 62(6), 717–723. doi:10.1002/ijc.2910620612
- Miller, S. I. (2016). Antibiotic Resistance and Regulation of the Gram-Negative Bacterial Outer Membrane Barrier by Host Innate Immune Molecules. *mBio*, 7(5), e01541-16. <https://doi.org/10.1128/mBio.01541-16>
- Napolitano, R. (2000). All three SOS-inducible DNA polymerases (Pol II, Pol IV and Pol V) are involved in induced mutagenesis. *The EMBO Journal*, 19(22), 6259–6265. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.22.6259>
- Norman, A., Hansen, L., & Sørensen, S. (2005). Construction of a ColD cda Promoter-Based SOS-Green Fluorescent Protein Whole-Cell Biosensor with Higher Sensitivity toward Genotoxic Compounds than Constructs Based on recA, umuDC, or sulA Promoters. *Applied and environmental microbiology*, 71, 2338–2346. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.5.2338-2346.2005>
- Peak, N., Knapp, C. W., Yang, R. K., Hanfelt, M. M., Smith, M. S., Aga, D. S., & Graham, D. W. (2007). Abundance of six tetracycline resistance genes in wastewater lagoons at cattle feedlots with different antibiotic use strategies. *Environmental Microbiology*, 9(1), 143–151. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01123.x>
- Portugal, J. (2018). Challenging transcription by DNA-binding antitumor drugs. *Biochemical Pharmacology*, 155, 336–345. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.07.030>
- Radman, M. (1975). SOS Repair Hypothesis: Phenomenology of an Inducible DNA Repair Which is Accompanied by Mutagenesis. P. C. Hanawalt & R. B. Setlow (Toim), *Molecular Mechanisms for Repair of DNA* (1k 355–367). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-2895-7_48
- Rubinstein, E., & Keynan, Y. (2014). Vancomycin Revisited – 60 Years Later. *Frontiers in Public Health*, 2. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2014.00217>
- Schatz, A., Bugle, E., & Waksman, S. A. (1944). Streptomycin, a Substance Exhibiting Antibiotic Activity Against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. *Experimental Biology and Medicine*, 55(1), 66–69. doi:10.3181/00379727-55-14461

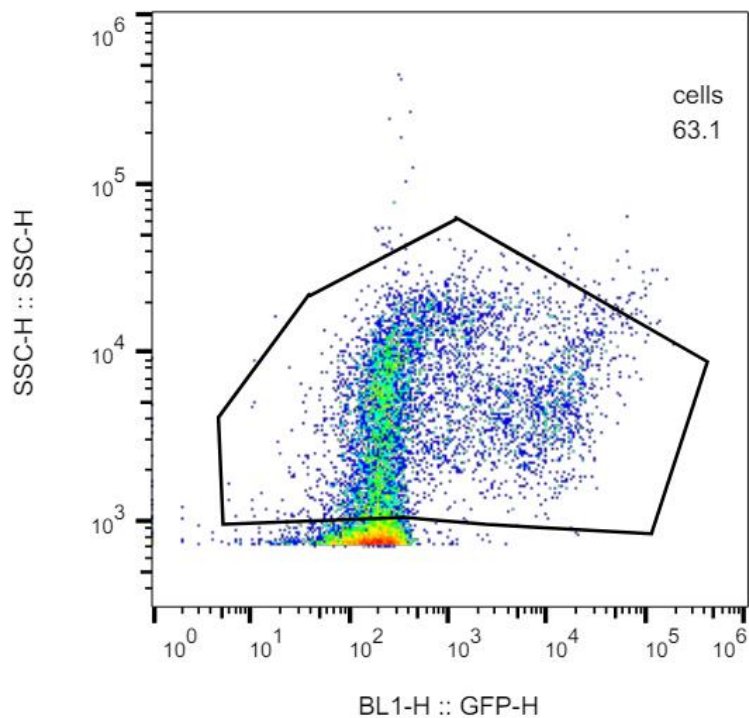
- Semenza, G. L. (2003). Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 3(10), 721–732. <https://doi.org/10.1038/nrc1187>
- Silver, L. L. (2016). Appropriate Targets for Antibacterial Drugs. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(12), a030239. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a030239>
- Tomasz, M., Lipman, R., Chowdary, D., Pawlak, J., Verdine, G. L., & Nakanishi, K. (1987). Isolation and Structure of a Covalent Cross-Link Adduct Between Mitomycin C and DNA. *Science*, 235(4793), 1204–1208. <https://doi.org/10.1126/science.3103215>
- Völzing, K. G., & Brynildsen, M. P. (2015). Stationary-Phase Persisters to Ofloxacin Sustain DNA Damage and Require Repair Systems Only during Recovery. *mBio*, 6(5), e00731-15. <https://doi.org/10.1128/mBio.00731-15>
- Wang, L., Wei, D., Huang, S., Peng, Z., Le, X., Wu, T. T., Yao, J., Ajani, J., & Xie, K. (2003). Transcription factor Sp1 expression is a significant predictor of survival in human gastric cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 9(17), 6371–6380.
- Zampaloni, C., Mattei, P., Bleicher, K. ... Bradley, K. A. (2024). A novel antibiotic class targeting the lipopolysaccharide transporter. *Nature*, 625(7995), 566–571. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06873-0>

Kasutatud veebiaadressid

1. World Health Organization: <https://www.who.int/> (kasutatud 20.05.2024)
2. European Union: https://commission.europa.eu/index_en (kasutatud 20.05.2024)

Lisad

Lisa 1. Bakterite eristamine taustamürast läbivoolutsütomeetri proovis (töötlemata kontroll kasvama hakkamisel, pärast viit tundi kasvu).



Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks.

Mina, Naomi Charlotta Andersson,

1. Annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose „SOS vastuse induktsioon vähiravimite poolt kasvavas ja mittepeljunevas bakterikultuuris“,

mille juhendaja on Niilo Kaldalu,

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi Dspace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Naomi Charlotta Andersson

24.05.2024