

TARTU ÜLIKOOL
Bioloogia-geograafiateaduskond
Molekulaar- ja Rakubioloogia Instituut
Molekulaarbioloogia õppetool

Eliisa Lukk

**Peptidüül-tRNA kuhjumise ja membraanipumpade roll
makroliidsete antibiootikumide toimes**

Magistritöö

Juhendaja:
Tanel Tenson, *PhD*

Tartu, 2007

SISUKORD

SISUKORD.....	1
KASUTATUD LÜHENDID.....	4
SISSEJUHATUS	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	8
1.1 Makroliidid.....	8
1.1.1 Makroliidide toimemehhanism	9
1.1.2 Bakterite resistentsusmehhanismid makroliidsete antibiootikumide vastu	13
1.2. Väljavool ja MDR ehk mitmeravimi resistentsus	16
1.2.1 RND transporter AcrB ning sellega seotud abivalgud TolC ja AcrA.....	18
1.3. Peptidüül-tRNA	25
1.4 Peptidüül-tRNA hüdrolaas.....	27
1.4.1 Pth mutandid	28
1.4.1.1 Pth(<i>rap</i>)	28
1.4.1.2 Pth(<i>ts</i>)	28
1.4.2 Pth substraadid	29
2. TÖÖ EESMÄRK	31
3. MATERJAL JA METOODIKA	32
3.1 Bakteritüved ja plasmiidid	32
3.2 Söötmed ja kemikaalid.....	32
3.3 Aparatuur.....	33
3.4 PCR	33
3.5 Elektroforees	36
3.6 PCR fragmentide puhastamine.....	36
3.7 Kompetentsete <i>E. coli</i> rakkude valmistamine	37
3.7.1 Kompetentsete rakkude külmutamine.....	37
3.8 Transformatsioon	37
3.9 Geenideletsiooniga tüvede valmistamine: geenide <i>tolC</i> ja <i>acrB</i> väljalülitamine.....	38
3.9.1 Rakkude kasvatamine, elektrokompetentsed rakud	38

3.9.2 Bakterirakkude transfektsioon elektroporatsiooni teel.....	39
3.10 Inhibitsioonikatsed	39
3.10.1 Josamütsiini ja erütromütsiini indutseeritud “ <i>drop-off</i> ”-i mõju Pth-d üleekspresseerivatele rakkudele	39
3.10.2 Bakterite kasvu inhibitsioon erütromütsiiniga, et hinnata AcrB ja TolC mõju bakterite resistentsusele.....	39
3.11 Bakterite nakatamine λ -faagiga	40
3.12 Transduktsioon bakteriofaag P1-ga.....	40
4. TULEMUSED	41
4.1 Josamütsiini ja erütromütsiini poolt indutseeritud peptidüül-tRNA “ <i>drop-off</i> ”-i mõju bakterite kasvule.....	41
4.1.1 C600(<i>rap</i>) tüve õigsuse kontroll ehk C600(<i>rap</i>) tüve nakatamine bakteriofaag λ -ga	46
4.2 Membraanivalgud TolC ja AcrB ja resistentsusmutatsioonide seos antibiootikumiresistentsuse kujunemises	47
4.2.1 <i>acrB</i> ja <i>tolC</i> deletsiooniga E.coli tüve koostamine	48
4.2.2 Bakterite kasvu inhibitsioon erütromütsiiniga, et hinnata membraanipumba valkude AcrB ja TolC ning mutantsete ribosoomivalkude omavahelisi seoseid.....	49
5. ARUTELU	53
KOKKUVÕTE.....	59
SUMMARY	61
KASUTATUD KIRJANDUS	63
TÄNUSÕNAD.....	69

KASUTATUD LÜHENDID

Å	ongström = 10^{-10} meetrit
ABC	<i>ATP binding cassette</i> ; ATP seondav kassett
ATP	<i>adenosine triphosphate</i> ; adenosiin trifosfaat
bp	<i>base pair</i> ; aluspaar
Da	<i>dalton</i> ; dalton
EF-G	<i>elongation factor-G</i> ; elongatsioonifaktor G
EF-Tu	<i>elongation factor-Tu</i> ; elongatsioonifaktor-Tu
Erm	<i>erythromycin ribosome methylase</i> ;
fMet-tRNA ^{fMet}	formüül-metionüül-tRNA
IF1	<i>initiation factor 1</i> ; initsatsioonifaktor 1
IF2	<i>initiation factor 2</i> ; initsatsioonifaktor 2
MDR	<i>multi drug resistance</i> ; mitmeravimi resistentsus
MFP	<i>membrane fusion protein</i> ; membraani fusioonvalk
MLS	<i>macrolide lincosamide streptogramin B</i> ; makroliid linkosamiid streptogramiin B
mRNA	<i>messenger RNA</i> ; informatsiooni RNA
OMF	<i>outer membrane factor</i> ; välismembraani komponent
ORF	<i>open reading frame</i> ; avatud lugemisraam
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> ; polümeraasi ahelreaktsioon
Pth	<i>peptidyle-tRNA hydrolase</i> ; peptidüül-tRNA hüdrolaas
RF1	<i>release factor 1</i> ; terminatsioonifaktor 1
RF2	<i>release factor 2</i> ; terminatsioonifaktor 2
RF3	<i>release factor 3</i> ; terminatsioonifaktor 3
RND	<i>resistance-nodulation-division</i> ; resistentsus-nodulatsioon-raku jagunemine
RRF	<i>ribosom release factor</i> ; ribosoomi vabastusfaktor
rRNA	<i>ribosome RNA</i> ; ribosoomi RNA

TAE	TRIS-atsetaat-EDTA puhver
Tet	<i>tetracyclin</i> ; tetratsükliin
tRNA	<i>transport RNA</i> ; transpordi RNA
U	<i>unit</i> ; ühik
Wt	<i>wild type</i> ; metsiktüüpi

SISSEJUHATUS

Seoses antibiootikumiresistentsete bakteritüvede levikuga on otsitud uusi ja tõhusamaid antibiootikume või modifitseeritud juba olemasolevaid, et tõsta nende efektiivsust resistentsete tüvede vastu. Selleks on oluline tunda antibiootikumide toimemehhanisme, nende sihtmärke rakus, seost bakterirakus toimuvate protsessidega.

Antimikroobsete ainete interaktsioone bakteriaalsete ribosoomidega on uuritud juba aastaid. Makroliidseid antibiootikume on laialdaselt uuritud tänu nende efektile transleerivale ribosoomile. Makroliidid seonduvad 70 S ribosoomi suure subühikuga (50S) peptidüültransferaasse tsentri läheduses nii Gram-positiivsetes kui Gram-negatiivsetes bakterites, blokeerides peptiidi väljumise tunneli, takistavad kasvava peptiidahela pikenemist. Bakterite resistentsus makroliidide vastu on põhiliselt tingitud märklaudkohtade modifitseerimisest ribosoomil, ribosoomivalkude mutatsioonidest või ainete aktiivsest väljapumpamisest. Mutatsioonid ribosoomivalkudes L4 või L22 põhjustavad resistentsuse ühe enam tuntud makroliidi, erütromütsiini, vastu. Teine resistentsusmehhanism makroliidide vastu on antibiootikumi rakust välja pumpamine. Gram-negatiivseid bakterirakke ümbritseb kaksikmembraanne süsteem, mis annab bakterile kaitset ja mõningaid eeliseid Gram-positiivsete bakterite ees. Enamus Gram-negatiivsete bakterite resistentsusest makroliidide suhtes kujuneb sünergiast väljavoolu pumpade ning läbi välismembraani toimuva ravimi aeglase sissetungi vahel. *E. coli*'s on kirjeldatud mitmeid resistentsust tagavaid transmembraanseid transportsüsteeme. Üks olulisemaid on kolmekomponentne AcrAB-TolC väljavoolupumba süsteem, mis viib rakust välja väga erinevaid aineid. Sellise pumba terviklikkuse rikkumine põhjustab tundlikkuse tõusu erinevate keemiliste ühendite suhtes.

Ribosoomidele seostudes põhjustavad makroliidid peptidüül-tRNAde dissotsatsiooni ehk “*drop-off*” i. Selle tulemusel tõenäoliselt valgusünteesiks vajalike vabade tRNAde hulk rakus väheneb. tRNAde normaalse taaskasutamise *Escherichia coli* rakkudes tagab ensüüm peptidüül-tRNA hüdrolaas (Pth), mis hüdrolyüsib peptiidijäägi ja tRNA vahelist estersidet, vabastades peptiidi tRNA küljest. tRNA on taas aminoatsüleerumisvõimeline ning võib osaleda translatsiooniprotsessis.

Käesoleva magistritöö teoreetiline osa annab ülevaate makroliididest ja bakterite resistentsusmehhanismidest. Pikemalt peatutakse mitmeravimi resistentsusmehhanismil, väljavoolupumpadel, millest oluliseim on *E. coli* AcrAB-TolC väljavoolupumba süsteem. Seoses makroliidide põhjustatud valgusünteesi peatamisega antakse ülevaate ka peptidüül-tRNAdest, nende enneaegsest ribosoomilt dissotseerumisest ning sellega seoses ensüümist peptidüül-tRNA hüdrolaasist (Pth-st).

Makroliidide põhimõttelist toimemehhanismi valgusünteesi inhibeerivate antibiootikumidena on uuritud, samas puudub selgus bakterirakus kujunevast reaktsioonist, mis viib antibiootikumide suhtes resistentsuse kujunemisele ning resistentsusmutatsioonide ja membraanipumpade omavahelistest seostest erütromütsiini suhtes resistentsuse tekkimisel.

Käesoleva magistritöö eksperimentaalses osas uuriti makroliidide põhjustatud peptidüül-tRNAde enneaegse ribosoomilt dissotseerumise ning nende rakku kuhjumise rolli makroliidide, josamütsiini ja erütromütsiini, põhjustatud valgusünteesi inhibitsioonis. Eksperimentaalse töö teises osas uuriti erütromütsiiniresistentsusele viivate mutatsioonide ja membraanis olevate toksiliste ainete väljavoolupumpade omavahelist seost erütromütsiiniresistentsuse tekkeks. Seda ribosoomivalkude L4 ja L22 ning membraanipumba valkude TolC ja AcrB näitel.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

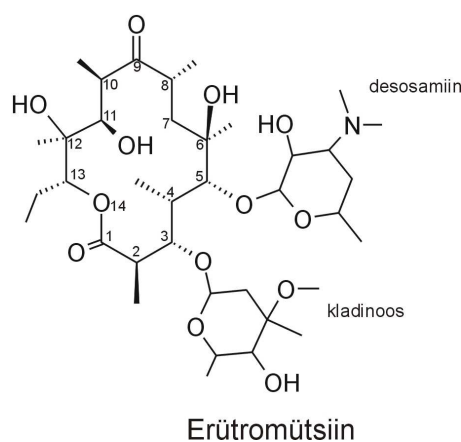
1.1 Makroliidid

Makroliidid on suur rühm valgusünteesi inhibeerivaid antibiootikume. Esmaselt isoleeriti makroliidid *Streptomyces* liikidest. Makroliidid on efektiivne antibiootikumide klass näiteks hingamisteede infektsioonide raviks, kaasa arvatud selliste infektsioonide, mida põhjustavad tüüpilised (*Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*) ja ebatüüpilised (*Chlamydia*, *Mycoplasma*, *Legionella*) patogeenid (Zhong & Shortridge, 2000). Makroliidid inhibeerivad bakterite kasvu seondudes bakterite ribosoomidele ja takistades bakterite valkude sünteesi.

Makroliidide nimi tuleneb tema struktuurist – makrotsükliisest laktoonringist, millega on seotud erinevad neutraalsed- või aminosuhkrud ning teised rühmad. Makroliidid on klassifitseeritavad vastavalt makrotsükliisese ringi süsiniku aatomite arvule. Uute komponentide lisamine looduslikele makroliididele on teinud klassifitseerimise kompleksemaks.

Kõige olulisemad makroliidsed antibiootikumid koosnevad 14-, 15- ja 16-aatomilisest laktoonringist. Neid võib jagada kahte suurde gruppi – naturaalsed ja poolsünteetilised derivaadid. Poolsünteetilisi makroliide võib veel edasi jagada kolme alagruppi vastavalt erütromütsiin A keemilise modifikatsiooni tüübile. Esimene alagrupp sisaldab asendusmodifikatsioonidega aineid. Sellised on näiteks roximütsiin, klaritromütsiin ja fluritromütsiin. Teise grupi liikmeid saadakse aglükoon A modifikatsiooniga, näiteks azithromütsiin. Kolmanda alagrupi liikmed, kuhu kuuluvad ka ketoliidid, on saadud C-3 α -L-kladinoosi modifikatsioonist (Retsema & Fu, 2001).

Keemiliste rühmade lisamisel makroliidide ringstruktuuri on märgatud makroliidide võimekuse tõus. Näiteks azithromütsiin, mille 15-lülilises laktoonringis on positsioonis C9 metüül asendatud lämmastikuga (Schlunzen *et al.*, 2003). See keemiline modifikatsioon muudab azitromütsiini *H. Influenzae* vastu erütromütsiiniga võrrelduna aktiivsemaks (Credito *et al.*, 2001). Lisaks laguneb happelises keskkonnas (pH 2) 10% erütromütsiinist umbes 3,5 sekundi jooksul. Samas kulub azitromütsiini degradatsiooniks 20 minutit (Retsema & Fu, 2001).



Joonis 1: Erütromütsiini keemiline struktuur.

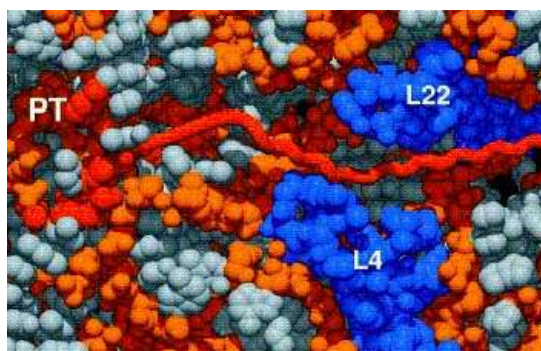
Makroliididest on kõige enam tuntud erütromütsiin. Erütromütsiin (Joonis 1) koosneb 14-lülilisest laktoonringist, mille küljes on 3-kladinoos ja 5-desosamiin suhkrujäägid.

1.1.1 Makroliidide toimemehhanism

Makroliidseid antibiootikume on laialdaselt uuritud tänu nende efektile transleerival ribosoomil. Valgusünteesi katalüüsivad ribosoom ja tsütoplasmaatilised faktorid. Bakteriaalne ribosoom (70S) koosneb kahest subühikust – 50S ja 30S, mis sisaldavad rRNA ja ribosomaalseid valke. 50S subühikul toimub tRNAde ja mRNA vaheline koodoni äratundmine. 50S subühik seondab tRNAd ja teostab peptiidi sünteesi. Peptiidsideme

süntees toimub 50S subühiku peptidüültransferaases tsentris. See tsepter koosneb RNAsst ja katalüüsib valgu elongatsioonil peptiidsidemete moodustumist.

Makroliidid seonduvad pöördvalt 50S subühikule peptidüültransferaasse keskuse (Joonis 2) läheduses nii Gram-positiivsetes kui Gram-negatiivsetes (Chittum & Champney, 1994) bakterirakkudes ja takistavad kasvava peptiidahela pikenemise protsessi, põhjustades enneaegset peptidüül-tRNA eemaldumist ribosoomilt. Makroliidid kuuluvad MLS grupi antibiootikumide hulka – makroliidid, linkosamiidid ja streptogramiin B. Linkosamiidid ja mükaroolid sisaldavad makroliidid inhibeerivad peptidüültransferaaset reaktsiooni (Poulsen *et al.*, 2000), ning nende seondumissait kattub osaliselt (Schlunzen *et al.*, 2001). Seega konkureerivad makroliidid näiteks klindamütsiiniga, mis on linkosamiid, seondumissaidi pärast. Samas erütromütsiini grupi makroliidid ja streptogramiin B tüüpi antibiootikumid ei inhibeerid peptidüültransferaaset reaktsiooni otseselt, kuid seonduvad peptidüültransferaasse keskuse (Joonis 2) kõrval oleva peptiiditunneli algusesse (Joonis 4), blokeerivad ribosoomi suurel subühikul tunneli sissepääsu (Nissen *et al.*, 2000), läbi mille peptiidahelad ribosoomist väljuvad (Tenson & Ehrenberg, 2002).

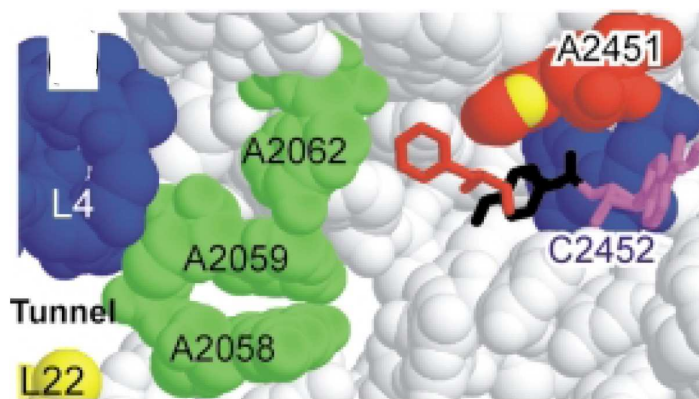


Joonis 2: Polüpeptiidi tunnel. Tunneli peptidüültransferaasse keskuse poolne ots, mis näitab suhet peptidüültransferaasse keskuse (PT) ja ribosomaalsete valkude L4 ja L22 vahel (sinised). Sünteesitav peptiid on tähistatud punase spiraalina. Oranži ja halliga on tähistatud 23S rRNA (Nissen *et al.*, 2000 järgi).

Hansen *et al* uuring näitas, et makroliidid seonduvad bakteriaalse 23S rRNAga ühendades rRNA domään II juuksenõela 35 ja domään V peptidüültransferaasset silmust (Hansen *et al.*, 1999). Arvatakse, et need kaks struktuuri on 23S rRNA tertsiaalstruktuuris üksteise lähedal ja moodustavad makroliididele ja teistele valgusünteesi inhibeerivatele ühenditele sidumistasku.

Ka eubakter *Deinococcus radioturans* ribosoomi 50S alamühiku kristallstruktuuri analüüsi andmete järgi seondub erütromütsiin peptidüül-transferaasse tsentri lähedusse, olles ühenduses vaid 23S rRNAga, mitte aga ribosomaalsete valkudega (Schlunzen *et al.*, 2001).

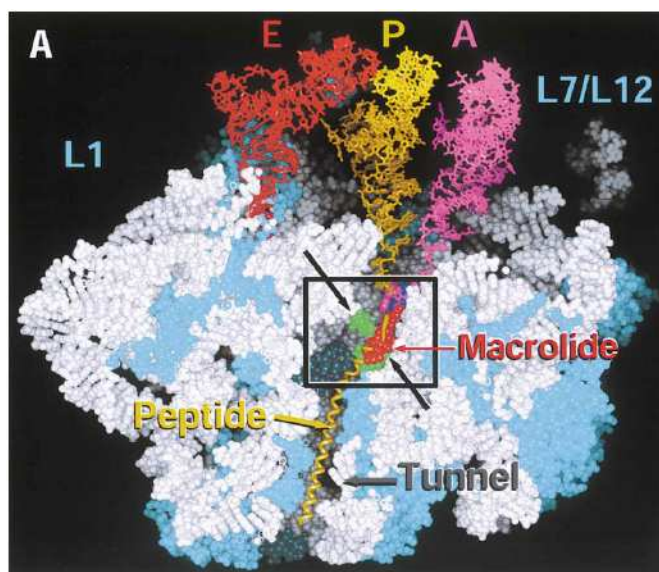
MLS antibiootikumide seondumise jaoks on vajalikud 23 S rRNA nukleotiidid A2058, A2059 ja A2062 (*E. coli* numeratsioon) (Joonis 3). Mitmed muudatused 23 S rRNAs, näiteks A2058 metülatsioon, annavad resistentsuse kõigi MLS grupi antibiootikumide suhtes (Weisblum, 1995b). Kuigi suure osa polüpeptiidi väljumise tunnelist moodustab 23S rRNA, on näiteks tunneli seina moodustumiseks vajalikud ka teatud valgud. Tunneli kõige kitsama koha moodustavad valgud L22 ja L4 (Nissen *et al.*, 2000).



Joonis 3: *Haloarcula marismortui* 50S subühik ja dipeptidüül-tRNA analoog A saidis. 23 S rRNA nukleotiidid A2058, A2059 ja A2062 (*E. coli* numeratsioon), mis on olulised makroliidi seondumise jaoks on näidatud rohelisena. Valgud L4 ja L22, mis moodustavad peptidüültransferaasse tunneli seina on näidatud vastavalt sinise ja kollasena. Punasega on näidatud peptidüültransferaasse tsentri oluline nukleotiid A2451. Dipeptidüül-tRNA analoogi osad: N-terminaalne fenüülalaniini jääk on punane, järgmine, türosiini jääk on must ning tRNA A76 on näidatud lillana (Tenson *et al.*, 2003).

MLS antibiootikumid, tõkestades peptiidahela tunnelist läbi mineku, põhjustavad peptidüül-tRNA enneaegset dissotsiiooni ribosoomilt (Menninger & Otto, 1982; Otaka & Kaji, 1975). Selline „drop-off“i juhtum toimub pärast valgusünteesi initsiatsiooni, kui kasvava valgu peptiidahel on veel lühike. Makroliidide põhjustatud peptidüül-tRNAde „drop-off“ võiks põhjustada vabade tRNAde varu ammendumist ning see võib tõenäoliselt viia valgusünteesi inhibitsioonini (Heurgue-Hamard *et al.*, 1996; Heurgue-Hamard *et al.*, 2000; Lovmar *et al.*, 2004; Ontiveros *et al.*, 1997; Tenson *et al.*, 1999).

Makroliidide juuresolekul sünteesitud oligopeptiidide pikkus varieerub sõltuvalt laktoonringi C5 positsiooni külghela ulatuvusest peptidüültransferaasse keskusele. Erütromütsiin, millel on laktoonringi C5 positsiooni külghelaks vaid monosahhariid, lubab moodustuda pikematel peptiidahelatel kui makroliidid, millel on C5 positsioonis disahhariid (Tenson *et al.*, 2003).



Joonis 4: Makroliidide sidumissait. Peptiidi väljumise tunnel on kujutatud halliga ning kasvav peptiid oranziga. Ribosomaalne RNA on valge ja ribosomaalsed valgud helesinised. Mustad nooled osutavad peptidüültransferaassele keskusele ja peptiidi väljumise tunnelile, kuhu on seondunud makroliidid (punane). Rohelised aatomid on makroliididega seonduvad alused (Hansen *et al.*, 2002).

On näidatud, et peptidüültransferaase keskuse ja antibiootikumide seondumiskoha vahelise kauguse ning antibiootikumidest tingitult ribosoomilt dissotseerunud peptidüül-tRNAde peptiidi pikkuse vahel on positiivne korrelatsioon. Antibiootikumi ja peptidüültransferaase keskuse vaheline kaugus on kõige lühem josamütsiini jaoks (4,2 Å), spiramütsiini jaoks 7 Å ning veel suurem erütromütsiini puhul (10,6 Å). Erütromütsiin põhjustab 6-8 aminohappejäägi pikkuste peptidüül-tRNAde dissotsiatsiooni ribosoomilt. 16-aatomilist laktoonringi sisaldavad josamütsiin ja spiramütsiin põhjustavad 2-4 aminohappejäägi pikkuste peptidüül-tRNAde dissotsiatsiooni (Tenson *et al.*, 2003).

1.1.2 Bakterite resistentsusmehhanismid makroliidsete antibiootikumide vastu

Resistentsus tähendab bakterite võimet vastu võidelda antibiootikumide toimele. Resistentsus paljude antibiootikumide vastu on tõsine probleem inimeste tervishoius. Kolm põhilist MLS antibiootikumide vastast resistentsus mehhanismi on:

- 1) Ribosoomi ravimit seondava saidi modifikatsioon
- 2) Antibiootikumide väljavool ühendatud välismembraani madala permeaablusega. Gram-negatiivsetel bakteritel, kaasa arvatud *E. coli*'l on erinevalt Gram-positiivsetest bakteritest kaks rakumembraani – tsütoplasmaatiline membraan ja välismembraan, mis on üksteisest eraldatud periplasmaatilise ruumiga. Gram-negatiivsete bakterite välismembraan on efektiivne takistus nii hüdrofiilsetele kui hüdrofoobsetele ühenditele (Lomovskaya *et al.*, 2007).
- 3) Antibiootikumi ensümaatilise inaktivatsioon, mis annab resistentsuse struktuurselt lähedastele antibiootikumidele. Esteraasid ja fosfoesteraasid annavad erütromütsiini ja teiste 14- ja 15-liikmeliste makroliidide vastase resistentsuse, kuid ei anna resistentsust linkosamiididele. Linkosamiidide vastu annab resistentsuse linkosamiidi nukleotidüültransferaas, mida kodeerivad *lnu(A)* ja *lnu(B)* geenid vastavalt stafülokokkides ja *Enterococcus faecium*'is (Leclercq, 2002).

Umbes poolte meditsiinis kasutatavate antibiootikumide põhiline funktsioon on inhibeerida valgusünteesi bakteri ribosoomidel. Tänu resistentsete patogeenide tüvede levikule on makroliidide kasu meditsiinis vähenenud. Ribosoomi modifikatsioonid on saavutatud spetsiifiliste nukleotiidide modifikatsiooniga 23S rRNAs spetsiifilise Erm metüültransferaasi poolt või mutatsioonidega 23S rRNAs ja L4 ja L22 ribosomaalsetes valkudes (Gabashvili *et al.*, 2001; Ng *et al.*, 2002; Tait-Kamradt *et al.*, 2000).

Ühe resistentsusmehhanismina on näidatud olevat 23 S rRNA V domääni peptidüültransferaases ringis toimuvad mutatsioonid ja posttranskriptsioonilised modifikatsioonid (Hansen *et al.*, 1999). Resistentsus tekib tihti nukleotiidi A2058 (*E. coli* numeratsioon) metüleerimise tõttu (Vester & Douthwaite, 2001), mis on kõige olulisem positsioon ribosoomiga seondumiseks nii 14- kui ka 16-aatomilise tsükliga makroliidide jaoks (Schlunzen *et al.*, 2001).

Erm (*erythromycin ribosome methylase*) geenide perekond kodeerib 23S rRNA dimetüültransferaasi, mis põhjustab 23S rRNA 2058 adenini metüülatsiooni (*E. coli* numeratsiooni süsteem) ning makroliidide seondumine ribosoomiga on seetõttu takistatud (Weisblum, 1995b). *Erm* mehhanism annab resistentsuse kõigile 14- ja 15-liikmelise ringiga makroliididele ja kui metülaasi ensüümi toodetakse konstitutiivselt, siis viib see ka 16-liikmelise ringiga makroliidide ja teiste MLS antibiootikumide vastasele resistentsusele.

Seega, resistentsus võib olla kas konstitutiivne või indutseeritud. Indutseeritava resistentsuse puhul toodab bakter inaktiivset mRNA-d, millelt metülaasi sünteesi ei toimu. mRNA muutub aktiivseks ainult induktoriks oleva makroliidi juuresolekul. Induktsioon on seotud translatsioonilise atenuaatori olemasolekuga metülaasi *erm* geenist ülesvoolu. Induktsioon toimub posttranskriptsionaalselt (Weisblum, 1995a). Konstitutiivse ekspressiooni puhul on metülaasi mRNA aktiivne ka induktori puudumisel. 16-aatomilise tsükliga makroliidide seostumiseks on oluline veel nukleotiid A2062, mille mutatsioon G-ks muudab resistentseks paljud 16-aatomilised makroliidid, kuid mitte 14- või 15-aatomilised makroliidid (Hansen *et al.*, 2002).

Resistentsust põhjustavad ka mutatsioonid ribosomaalsetes valkudes L4 ja L22 (Arevalo *et al.*, 1988; Weisblum, 1995b). Peptiidtransferaasne tsepter koosneb RNAsst ja katalüüsib peptiidsidevete moodustumist valgus elongatsiooni jooksul (Nissen *et al.*, 2000). L22 ja L4 paiknevad peptidüültransferaases tunnelis. Valgud L4 ja L22 interakteeruvad üksteisega, seostudes 23 S rRNA 5'-otsa läheduses domäänidega I ja II assotseeruva 23S rRNA järjestusega (Herold & Nierhaus, 1987). Muudatused nendes valkudes põhjustavad resistentsuse erütromütsiini suhtes paljudes bakteri näiteks *E. coli* ja *Bacilluse* tüvedes (Chittum & Champney, 1994; Schnier *et al.*, 1990).

On leitud erinevaid L4 ja L22 mutantseid bakteritüvesid. Näitkes on leitud resistentne L4 mutant, kus on toimunud A transitsioon G-ks 63. koodonis ehk Lys muutus Glu-ks valgus ning L22 mutant, kus on toimunud 9 bp deletsioon eemaldab koodonid 82-84, elimineerides valgust järjestuse Met-Lys-Arg (Arevalo *et al.*, 1988; Chittum & Champney, 1994; Weisblum, 1995b). Taolisi resistentsust põhjustavaid valkude L4 ja L22 mutatsioone on leitud teisigi.

Valkude L4 ja L22 modifikatsioonidest tulenev resistentsus töötab kahel viisil: takistades ravimi seondumist (L4) või neutraliseerides sidumise efekti (L22). L4 valgus mutatsioonid ahendavad tunneli avaused diameetrit nii, et makroliidi seondumine on takistatud. L22 mutatsioon põhjustab tunneli avaused suurenemist nii, et sünteesitav peptiid mahub sealt läbi isegi siis, kui seondunud on ka makroliidi molekul (Gabashvili *et al.*, 2001).

Ravimi väljavoolu transporterid vähendavad rakusisest ravimi kontsentratsiooni, andes seeläbi rakkudele ravimiresistentsuse.

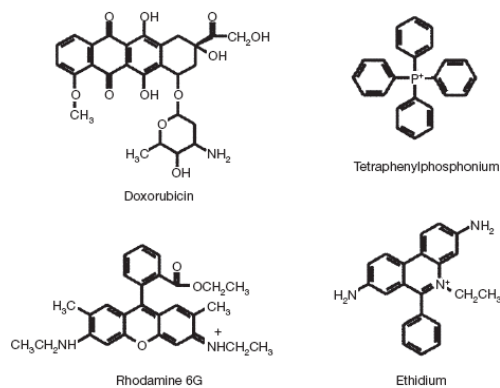
Äravoolu teel toimuv resistentsus on leitud kliiniliselt märkimisväärsetest patogeenidest, nagu *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* ja enamikust teistest Gram-negatiivsetest bakteritest. Kaks põhilist väljavoolu pumpa on Mef – Gram-positiivsetes bakterites ning AcrAB-TolC – *Haemophilus influenzae* ja *E. coli*'s (Gram-negatiivsetes bakterites) (Zhong & Shortridge, 2000). Väljavoolu teel toimuvast ravimiresistentsuse tekkimisest tuleb juttu järgnevas peatükis

1.2. Väljavool ja MDR ehk mitmeravimi resistentsus

Väljavool on mehhanism, mis tagab rakule kahjulike ainete ja antibiootikumide rakust välja pumpamise. Mõned väljavoolu süsteemid on spetsiifilised vaid ühele substraadile, kuid on ka laia spetsiifikaga väljavoolu pumpasid. Viimased transpordivad rakust välja palju erinevaid ained. Selliseid pumpasid nimetatakse MDR pumpadeks ehk mitmeravimi resistentsuse pumpadeks. Väljavoolupumpad võivad olla kodeeritud nii kromosoomilt (MDR väljavoolupumbad) kui ka plasmiidilt (näiteks *tet* geenid). Seega võib väljavoolu teel toimuv resistentsus olla vastavalt loomulikult omane või omandatud väljastpoolt. Tänu viimati mainitud geneetilistele elementidele on bakteritel võimalik väljavoolu pumpade genee levitada ka teistele bakteritüvedele. Loomulikult omaste väljavoolupumpade mutantsetes tüvedes võib antibiootikumiresistentsus tekkida näiteks väljavoolupumpade valkude üleekspressiooni tõttu. Lõpptulemuseks on see, et antibiootikumi kontsentratsioon raku sees väheneb ning bakter on selle antibiootikumi suhtes vähem tundlik.

Resistentsus paljude ravimite vastu on enamjaolt põhjustatud transporteritest, millel on lai spetsiifika laia ringi keemiliselt mitte seotud ühendite vastu, mis püüavad kinni ja pumpavad rakust välja keemiliselt väga erinevaid ühendeid, vähendades sellega nende rakusisest kontsentratsiooni (Zgurskaya & Nikaido, 2000b). Sellised väljutatavad ühendid on näiteks antibiootikumid, herbitsiidid, inimese puhul vähi kemoterapeutikumid. Multiravimi transporteritel, olgu need pärit kas eukariootsetest või prokariootsetest rakkudest, on sarnane (kuid mitte identne) multispetsiifilisus paljude lipofiilsete, planaarseste molekulide vastu, mille molekulmass väiksem kui 800 Da, tihti on need ühendid ka nõrgalt katioonsed (Joonis 5).

Antibiootikumiresistentsuse suurenemise üks oluline tekkepõhjus on selliste väljavoolupumpade olemasolu (Poole, 2001). Inimese tervishoius on MDRid tõsiseks probleemiks, kuna mõned nende substraadid on kliiniliselt kasutatavad ravimid (Higgins, 2007). Näiteks annavad MDR pumbad kliinilise resistentsuse seenevastasele ravile ning bakterites muudavad nad antibiootikumid ebaefektiivseks (Lomovskaya *et al.*, 2007; Poole, 2005).



Joonis 5: Multiravim transporterite substraadid. Kuigi multiravim transporteritel on erinev multispetsiifilisus, on nende substraatidel siiski ühiseid omadusi: planaarsus, heterotsükliilisus, lipofiilsus, molekulmass alla 800 Da ja tihti on need katioonsed (Higgins, 2007).

Ebaefektiivsed on enamuse antibiootikumide klasse (näiteks makroliidid, oksolidinonid, lipopeptiidid, glükopeptiidid, rifamütsiinid ja streptogramiinid) Gram-negatiivsete bakterite vastu ning neid kasutatakse ainult Gram-positiivsete bakterite raviks. Gram-negatiivsetel patogeenidel on loomumaseid reistentsusmehhanisme paljude antibiootikumide vastu. Näiteks tavalise haiglast saadava, paljusid eluohtlikke infektsioone tekitav patogeen *Pseudomonas aeruginosa* (Rello, 2005), oli ravitav vaid mõnega 160-st uurimuses kasutatud antibiootikumist.

Informatsiooni erinevate multiravim transporterite töömehhanismide kohta annavad struktuuri- ja biokeemilised andmed. Esimene hästi kirjeldatud multiravim transporter oli imetaja P-glükoproteiin (Leonard *et al.*, 2003), mis muudab tuumori rakud vähivastases ravis resistentseteks. Selle transporterite avastamine jääb juba mitmekümne aasta taha, kuid just viimasel ajal avaldatud struktuurid annavad parema ülevaate transporterite töömehhanismidest.

Nüüdseks on lahendatud nelja erineva transporterite superperekonna liikme kristallstruktuurid:

- 1) ABC perekond (ATP-seondav kassett: Sav1866 *Staphylococcus*’est ja imetaja P-glükoproteiin)

- 2) MFS perekond (peamine abistaja superperekond: EmrD *E. coli* 'st)
- 3) RND perekond (resistentsus-nodulatsioon-raku jagunemine: AcrB *E. coli* 'st)
- 4) SMR perekond (väike multiravimi resistentsus: EmrE *E. coli* 'st)

Olulisemad ja enam kirjeldatud neist neljast transporterite perekonnast on ABC perekond ja RND perekond. Pikemalt on käesolevas töös kirjeldatud RND perekonna esindajat ning temaga seotud membraanivalke TolC-d ning AcrA-d.

1.2.1 RND transporter AcrB ning sellega seotud abivalgud TolC ja AcrA

Väljavool on kõige efektiivsem koostöös teiste resistentsusmehhanismidega. Enamus Gram-negatiivsete bakterite resistentsusest makroliidide suhtes kujuneb sünergiast väljavoolu pumpade ning läbi välismembraani toimuva ravimi aeglase sissetungi vahel, kusjuures võtmefaktoriks resistentsuse kujunemisel on siiski väljavoolupumbad. Selline koostöö on võimalik tänu ravimitransporterite unikaalsele ülesehitusele: pumbad transpordivad ravimeid läbi nii sise- kui välismembraanist. Kuna ravimid läbivad välismembraani aeglaselt, siis selline otsene äravool on eriti efektiivne resistentsuse tekkeks.

Väga oluline grupp väljavoolupumpasid põhineb kolmeosalisele ülesehitusele, mille koosseisus on väljumiskanal (*E. coli* TolC, *Pseudomonas aeruginosa* OprM) (OMF), energiat andev sisemembraani transporter [resistentsus-nodulatsioon-raku jagunemise (RND) valgud] ja periplasmaatiline adaptorvalk ehk tuntud ka kui membraani fusioonvalk (MFP). Kõik komponendid on ainete transpordiks väga vajalikud.

Resistentsus-nodulatsioon-raku jagunemise (RND) valgud on leitud nii prokarüootsetest kui eukarüootsetest rakkudest ja neil on lai substraadi spetsiifilisus ja füsioloogiline roll. Need transporterid ei saa energiat mitte ATP seondamisest/hüdrolüüsist vaid prootonite liigutamist läbi raku membraani vastu elektrokeemilist gradienti.

Kõige paremini iseloomustatud RND valk on *E. coli* AcrB, mis annab resistentsuse paljudele antibiootikumidele, erinevas suurusjärgus (Zgurskaya & Nikaido, 1999). Hästi on uuritud AcrB-AcrA-TolC MDR kolmikpumba süsteem *E. coli*'s. AcrB on sisemembraani valk, millel on palju substraadi sidumise saite, et ära tunda ja väljutada erinevate keemiliste struktuuridega ühendeid. AcrB teeb koostööd ja on seotud välismembraani valguga TolC ja membraani-fusioonvalguga AcrA-ga (Fralick, 1996; Poole, 2001; Tikhonova & Zgurskaya, 2004). TolC on välismembraani valk, mis moodustab kanali, mida mööda osakesed saavad liikuda läbi periplasmast ja välismembraanist. On näidatud, et *E. coli* valguga TolC puudumine annab ülitundlikkuse erinevatele inhibiitoritele, sealhulgas sapphappele, detergentidele ja hüdrofoobsetele antibiootikumidele.

TolC on seotud ka teistsuguste aktiivsustega, sealhulgas kolitsiini impordi (Nagel de Zwaig & Luria, 1967), α -hemolüsiini sekretsiooni (Wandersman & Delepelaire, 1990) ja poriini regulatsiooniga (Misra & Reeves, 1987; Morona & Reeves, 1982).

AcrA on lipoproteiin, mis paikneb periplasma regioonis ning kuulub MFP (membraani fusioonvalgud) perekonda. Biokeemilised uuringud näitavad, et AcrA interakteerub AcrB-ga (Zgurskaya & Nikaido, 2000a). Funktsioneerides membraani fusioonvalguna, ühendab ta AcrB ja TolC, et AcrAB-TolC süsteem saaks mürke väljutada otse väliskeskkonda. Arvatakse, et AcrA – 1 on peale membraanide fuseerumisel osalemise transpordil ka teisi rolle, millest on vähe teada (Zgurskaya & Nikaido, 1999).

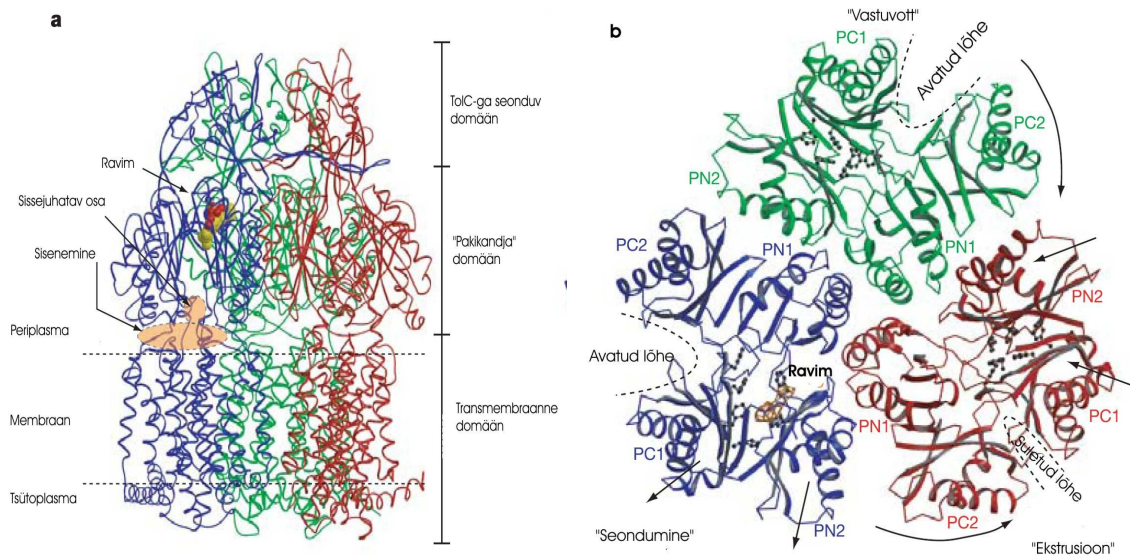
AcrAB-TolC väljavoolu pump *E. coli*'s annab resistentsuse laiale inhibiitorite ringile, mis on oma olemuselt hüdrofoobsed. AcrAB-TolC osaleb *E. coli*'s lahustite (White *et al.*, 1997), värvide, detergentide ja lipofiilsete antibiootikumide nagu novabiotsiin, erütromütsiin, fusiidhape (Zgurskaya & Nikaido, 1999) ja kloksatsilliini (Nikaido *et al.*, 1998) resistentsuse süsteemis. Üleekspressiooni korral genereerib see süsteem resistentsust ka paljudele üldiselt kasutatud antibiootikumidele nagu tetratsükliin (Okusu *et al.*, 1996).

AcrAB operon on identifitseeritud peale *E. coli* ka paljudest teistest organismidest. Näiteks *Haemophilus influenzae*'st, kus ükskõik kumma geeni, kas *acrA* või *acrB*, inaktiivatsioon tõstis tundlikkust makroliididele, värvidele, nagu etiidium bromiid. AcrAB-TolC masin

töötab ka *Enterococcus aerogenes* es. Ka AcrAB lähedane homoloog *Pseudomonas aeruginosa* MexAB annab loomumomase resistentsuse paljude kliiniliselt oluliste antibiootikumide vastu (Li *et al.*, 1994).

Lahendatud on AcrB atomaarne struktuur nii üksi (Murakami *et al.*, 2002) kui inhibiitoriga seondunult (Yu *et al.*, 2003). AcrB koosneb 12 membraani-ulatuva α -heeliksiga transmembraansesest domäänist ja suurest periplasmaatilisest domäänist. Funktsionaalne transporter koosneb kolmest protomeerist, seega on kompleksis kokku 36 membraani-ulatavat α -heeliksit.

Trimeerne AcrB koosneb kolmest membraaniga paralleelsest kihist: transmembraanne domään, „pakikandja” domään ja TolC-ga seonduv domään (Joonis 6 A) (Murakami *et al.*, 2002; Murakami & Yamaguchi, 2003). Substraati seondav tasku on olemas iga protomeeri „pakikandja” domäänis. Selles domäänis on funktsionaalselt oluline heeliksiste kimp – kesksed heeliksid, mis koosneb kolmest α -heeliksist igas protomeeris. “Pakikandja” domään koosneb neljast subdomäänist – PN1, PN2, PC1 ja PC2, mis on pakitud β -lehtedeks ümbritsema mahukat taskut (Joonis 6 B) (Murakami *et al.*, 2002). AcrB kristallstruktuuride (ka minotsükliini ja desoksürubitsiiniga seotud AcrB kristallstruktuur) kohaselt on ravimite sidumise õõnsus periplasmaatilises domäänis. See õõnsus on ääristatud hüdrofoobsete ja aromaatsete aminohapetega. Aromaatsed aminohappe jäägid, Phe136 ja Phe178 (PN2) ja Phe610, Phe615, Phe617 ja Phe628 (PC1), võivad seonduda hüdrofoobsete või aromaatsne-aromaatsne interaktsioonidega ravimi molekuliga (Joonis 6 B). On ka mõned polaarsed jäägid, Gln176 ja Asn274, mis võivad ravimi molekuliga moodustada vesiniksidemeid ning aitavad neutraliseerida katioonsete ravimite laengut (Murakami *et al.*, 2006).

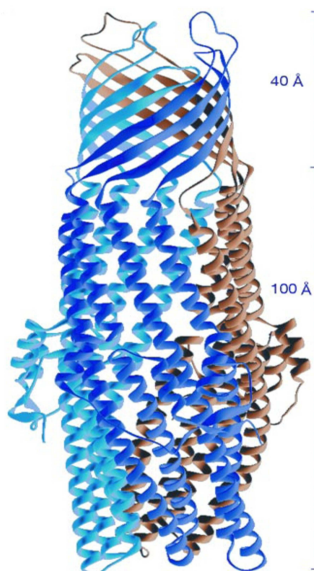


Joonis 6: AcrB-minotsükliin kompleksi struktuur. Kolm AcrB protomeeri on eraldi värvitud (sinine, punane, roheline). Seondunud substraat minotsükliin on näidatud periplasmaatilises domäänis värviliste kuulidena ning on esindatud vaid ühes monomeeris. **A.** Vertikaalne vaade membraani tasandi suhtes. Näidatud on umbakaudne membraani kaksikkihi paiknemine. Periplasmaatiline pool on üleval ja transmembraanne regioon all (Murakami *et al.*, 2006). **B.** Väljalõige “pakikandja” domäänist. Paralleelne vaade membraani tasandi suhtes. Kolm periplasmaatilist domääni erinevad natuke struktuuri poolest. Näidatud on “seondumise”, “vastuvõtu” ja “ekstrusiooni” subühik. Fenüülalaniini jäägid, sealhulgas ka substraati siduva tasku omad, on näidatud kerade ja pulkadena. Ravim on joonisel kujutatud oranži värviga. Nooled näitavad subdomäänide suhtelist liikumist võrreldes algse seisundiga (Murakami *et al.*, 2006).

TolC-ga seonduvas domäänis AcrB avaneb lehtri taoliselt ning ulatub TolC otsani – AcrB ja TolC seonduvad otseselt. AcrA struktuurid näitavad, et AcrA ümbritseb TolC-AcrB kompleksi.

Lahendatud on ka TolC kristallstruktuur (Koronakis *et al.*, 2000) ning see erineb teistest välismembraani valkudest. TolC on pooritaoline molekul, millele annavad kuju kaks eraldiseisvat domääni, mille moodustatud struktuuri teljepikkus on 140 Å (Joonis 7). Sellest struktuurist 100 Å moodustab diameetriga 35 Å α -heelikaalse poori, mis ulatub periplasmasse. Ülejäänud 40 Å moodustab välismembraani ulatuva β -silindri. Seega

välismembraanis olev segment koosneb β -ahelatest, kusjuures sügavale periplasmasse ulatuv regioon koosneb põhiliselt α -heeliksitest. TolC nagu AcrB on trimeerne. Üks kanal ehk tunnel moodustub TolC trimeerist.



Joonis 7 : TolC üldine ülesehitus. Protomeerid on eraldi värvitud. β -silinder paikneb ülal ja α -heelikaalne domään alumises osas (Koronakis *et al.*, 2000).

Kuna TolC võib paarduda paljude teiste transporteritega peale AcrB, täidab ta üldist rolli ja vähest või ei mingit funktsiooni transpordi spetsiifilisuse või suunatundlikkuse määramises.

On näidatud, et TolC funktsioneerib ka AcrAB-st sõltumatult. TolC deletsiooniga tüved olid tundlikumad kui AcrAB deletsiooni mutandid (Fralick, 1996). Need andmed näitavad, et TolC võib osaleda ka mõnes teises väljavoolusüsteemis. Näiteks on TolC peale AcrAB väljavoolu süsteemi ka EmrAB ravimi väljavoolusüsteemi kolmandaks komponendiks (Sulavik *et al.*, 2001).

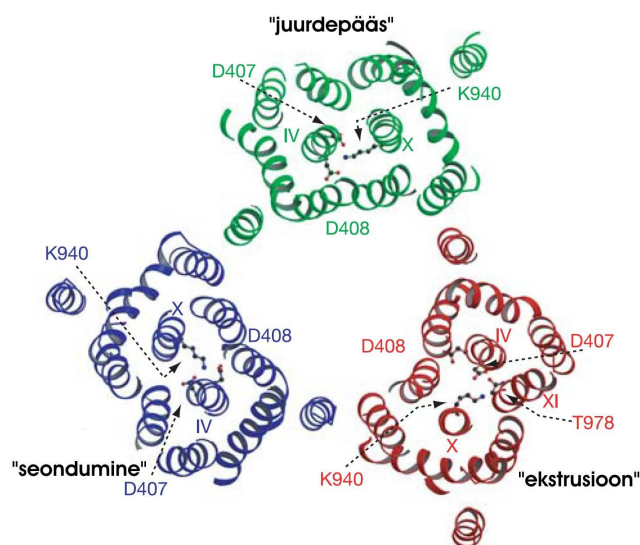
Sellest, et substraati-seondav sait paikneb periplasmaatilises domäänis, on oletatud, et rakust väljutamiseks korjab AcrB ravimid üles membraani periplasmaatilisel poolel. Varem arvati vanemate struktuuranalüüside põhjal, et AcrB transpordib ravimeid ka otse

tsütoplastmast. Seda toetas ka asjaolu, et on näidatud, et homologne valk AcrD transpordib aminoglükosiide tsütoplastmast (Aires & Nikaido, 2005).

Ravimi ekspordi protsess toimub kolmes osas, kus igal AcrB protomeeril on kolm erinevat konformatsiooni: „juurdepääs”, „seandumine” ja „ekstrusioon” (Murakami *et al.*, 2002). Seega substraati ära tundvaid saite on küll kolm, kuid vaid üks sait on ühel antud ajahetkel okupeeritud substraadi poolt. Seda saiti nimetaksegi seandumissaidiks (Joonis 6 B). Teine sait ehk ekstrusioonsait on periplasmas suletud, kuid avatud TolC-ga seonduvas saidis, mis näitab, et ta just vabastas substraadi rakust väljutamiseks TolC-le. Selles saidis on ravimi tasku väiksem ja fenüülalaniini kõrvalahelad joondunud nii, et ravim ei saaks siseneda. Kolmas sait ehk ligipääsusait on suletud TolC teeraja poolt, kuid avatud periplasma poole, olles ilmselt valmis substraati vastu võtma.

Kõik kolm periplasmaatilist domääni võtavad kordamööda omaks kõik kolm konformatsiooni, viies substraadi läbi periplasmaatiliste domäänide TolC teeratta ja rakust välja.

Paljude antibiootikumide märklauad paiknevad periplasmaatilises ruumis (näiteks β -laktaamide märklauaks on raku seina komponendid). Järelikult resistentsuse tagamiseks laiale antibiootikumide spektrile, peab aktiivne transport neid transportima läbi välismembraani. Kuna välismembraan pole võimeline säilitama elektrokeemilist gradienti või tagama ATP juurdepääsu või teisi energiat-andvaid protsesse, on vajalik, et energia tootmiseks vajalikud valgud paikneksid tsütoplastmaatilises membraanis. AcrB on üks selliseid transportereid. Ravimi eksportimiseks on AcrB-l vaja prootonite poolt liikumapanevat jõudu (Thanassi *et al.*, 1997). AcrB on prooton-substraat antiporter (Zgurskaya & Nikaido, 1999).



Joonis 8: AcrB transmembraanse domääni pinna struktuur vaadatuna periplasmaatiliselt poolelt. Kolm AcrB protomeeri on eraldi värvitud (sinine, punane, roheline). Kolme funktsionaalselt olulise laetud jäägi kälgahelad – Asp407, Asp408 ja Lys940 – ja funktsionaalselt oluline jääk Thr978 on näidatud kuulide ja pulkadena. Rooma numbrid näitavad transmembraanse heeliksi numbreid (Murakami et al., 2006).

Energia ülekannet vahendab AcrB transmembraanne domään periplasmaatilise domääni konformatsiooniliste muutuste kaudu. Konformatsioonilisi muutusi indutseeritakse prootonite liikumisega läbi membraani vastu elektrokeemilist gradienti. Prootonite liikumist vahendavad kolm transmembraanse domääni laetud jääki (Asp407, Asp408, Lys940) (Joonis 8), mis on konserveerunud kõigi RND valkude seas ja on funktsionaalselt vajalikud (Murakami *et al.*, 2002). Tänu konformatsiooni muutustele on võimalik ravimi transport.

1.3. Peptidüül-tRNA

Rakus esinevad vabad tRNAd enne süntetaasi reaktsiooni, aminoatsüül-tRNAd valgusünteesil ja peptidüül-tRNAd sünteesi käigus nii ribosoomidele seondununa, kui erijuhtudel sealt vabanenuna („*drop-off*“) (Caplan & Menninger, 1979).

Peptidüül-tRNAdel on ribosoomis kaks seandumiskohta: enne translokatsiooni ribosoomi A/P saidis ja pärast translokatsiooni ribosoomi P/P saidis. Stabiilsemalt on peptidüül-tRNA seotud ribosoomi P/P saidis. Normaalse valgusünteesi terminatsiooni puhul hüdrolüüsib estersideme tRNA ja peptiidijäägi vahel ribosoom.

Peptidüül-tRNAd võivad ribosoomilt translatsiooni käigus dissotseeruda. Vabad peptidüül-tRNAd lagundatakse elujõulises bakterirakus peptidüül-tRNA hüdrolaasi (Pth) poolt. Normaalses rakus on vabade peptidüül-tRNAd kontsentratsioon tavaliselt väike ja põhjustatud juhuslikust „*drop-off*“ ist transleerivatelt ribosoomidelt (Menninger, 1976).

„*Drop-off*“ iks nimetatakse peptidüül-tRNA dissotsieerumist ribosoomilt translatsiooni vigade tõttu. Selline dissotsatsioon põhjustab peptidüül-tRNAd akumulatsiooni. Vabad tRNAd ammenduvad, valgusüntees inhibeeritakse ning see peatab bakteriraku kasvu. Vastavate tRNAd üleekspressioon supresseerib spetsiifilise peptidüül-tRNA akumulatsiooni ja toksilisuse (Cruz-Vera et al 2003).

Peptidüül-tRNAd dissotsatsioon domineerib lühikesi oligopeptiide kandvate tRNAd puhul, mis on tekkinud valgusünteesi esimeses elongatsioonitsükklis või kui ORF on väga lühike (Valadez *et al.*, 2001). „*Drop-off*“ i toimumise määr väheneb märgatavalt oligopeptiidide pikkuse kasvades. Üle 5 aminohappe jäägiga valgu ahela puhul „*drop-off*“ i määr väheneb (Heurgue-Hamard *et al.*, 2000). See võib olla tingitud asjaolust, et RF-2 sõltuv peptiidi vabastamine on vastastikuses sõltuvuses valgu pikkusega – efektiivsus kasvab kui valguahel pikeneb (Heurgue-Hamard *et al.*, 2000).

Peptidüül-tRNA akumulatsiooni mõjutavad terminatsiooni efektiivsus, peptidüül-tRNA „*drop-off*“ i kiirus ribosoomilt ja Pth poolt katalüüsitud hüdrolüüsi efektiivsus (Valadez *et al.*, 2001). Peptidüül-tRNA akumuleerub, kui peptidüül-tRNA sünteesi määr ja „*drop-off*“

ületavad terminatsiooni ja Pth hüdrolyüsi määra. Väheneb aminoatsüleerumisvõimeliste tRNAde kontsentratsioon ja suureneb vabade peptidüül-tRNAde tase (Cruz-Vera *et al.*, 2003).

Peptidüül-tRNAde enneaegne dissotsatsioon võib olla indutseeritud antibiootikumide (näiteks linkosamiidid, makroliidid) poolt (Menninger & Otto, 1982). Erütromütsiin, karbomütsiin, spiramütsiin stimuleerivad peptidüül-tRNA dissotsiooni ribosoomilt translokatsiooni käigus (Menninger & Otto, 1982; Menninger *et al.*, 1994). Antibiootikumid nagu makroliidid, linkosamiidid, streptogramiin B (MLS antibiootikumid) tõkestavad kasvava peptiidi sisenemist ribosoomi peptiiditunnelisse. Edasine peptiidi elongatsioon on inhibeeritud ja peptidüül-tRNA ainuke tee ribosoomist lahkumiseks on „*drop-off*“. MLS antibiootikumidel ja kasvaval peptiidi ahelal on ribosoomis kattuv sidumiskoht. Peptiidi ahela kasvamisel üle teatud kriitilise piiri peptidüül-tRNA afiinus ribosoomile kasvab ja antibiootikumid pole võimelised konkureerima sidumiskoha pärast (Tenson *et al.*, 2003).

Peptidüül-tRNAde suurenenud dissotsiooni määra üheks põhjuseks on ka aminohapete nälg. Aminohapete nälja korral kasvab translatsiooni *missense* vigade arv – sobimatud aminoatsüül-tRNAd loevad “nälgivaid” koodoneid ja produtseeritakse vigu sisaldavaid peptidüül-tRNAsid. Caplan ja Menninger 1979 on pakkunud “ribosoomi toimetamise” hüpoteesi, mille järgi vigased peptidüül-tRNAd dissotseeruvad ribosoomilt suurema tõenäosusega. Aminoatsüül-tRNA valepaardumisest tingitud vead tuntakse translatsiooniprotsessis ära ning vigased peptidüül-tRNAd eemaldatakse ribosoomilt. Viimast protsessi nimetatakse toimetamiseks (Caplan & Menninger, 1979).

Siiski on „ribosoomi toimetamise“ hüpotees kahtluse all, kuna vigaste peptidüül-tRNAde eemaldamise protsessi energeetiline kulu oleks rakule suurem kui elada vigadega (Kurland & Ehrenberg, 1985). Erinevad isoaktseptoorid tRNAd võivad dissotseeruda erineval määral (Dincbas *et al* 1999). Näiteks fMet-Phe-tRNA^{Phe} on kiiresti dissotseeruv.

Peptidüül-tRNAde dissotsiooni kiirus ribosoomilt sõltub transleeritavatest koodonitest. Lüsiini, treoniini, asparagiini tRNAde perekonnad akumuleeruvad kiiremini. Glütsiini,

leutsiini, tsüsteiini koodonitele vastavad tRNAd akumuleeruvad aeglaselt (Cruz-Vera *et al.*, 2003). tRNA^{Lys} soodumus „drop-off“ üks võib olla seotud ebatavalise antikoodonlingu konformatsiooniga (Heurgue-Hamard *et al.*, 1996). Selle liigi tRNAd üleekspressioon plasmiidilt supresseerib Pth(*ts*) temperatuuritundlikuse, kusjuures teiste tRNA liikide üleekspressioon efekti ei oma (Heurgue-Hamard *et al.*, 1996).

Peptidüül-tRNAd „drop-off“ ribosoomilt pole täielikult spontaanne juhtum, vaid võib olla katalüüsitud valgusünteesi faktorite poolt (RRF, RF3, EF-G; 2, IF1, IF2) poolt (Dincbas *et al.*, 1999).

1.4 Peptidüül-tRNA hüdrolaas

Vigase valgusünteesi käigus dissotseerub ribosoomilt peptidüül-tRNA molekul. Nende enneaegselt ribosoomilt vabanenud peptidüül-tRNAd retsükleerimiseks on vajalik ensüüm peptidüül-tRNA hüdrolaas.

Peptidüül-tRNA hüdrolaas (Pth: EC 3.1.1.29) hüdrolyüsib estersidemeid peptidüüljäägi ja tRNA vahel.

Pth omab ka *in vitro* hüdrolyütilist aktiivsust: muudab peptidüül-tRNAd või N-atsetüül-aminoatsüül-tRNAd vabadeks tRNAdeks ja peptiidideks või N-atsetüül-aminohapeteks. Iga N-blokeeritud aminoatsüül-tRNA on Pth substraadiks, välja arvatud fMet-tRNA^{Met}, mille suhtes Pth aktiivsus on väga madal (Dutka *et al.*, 1993). Substraadiks pole ka aminoatsüül-tRNAd ja ribosoomile seondunud peptidüül-tRNAd (Menninger, 1976).

Pth normaalne funktsioneerimine on eelduseks normaalsele valgusünteesile (Menninger, 1976). Pth tõkestab dissotseerunud peptidüül-tRNAd akumulatsiooni, mis inhibeeriks valgusünteesi. Pth oluline funktsioon on tRNAd taastootmine, sest sageli kasutatavate tRNAd nälg võib inhibeerida valgu biosünteesi (Heurgue-Hamard *et al.*, 1996).

1.4.1 Pth mutandid

1.4.1.1 Pth(*rap*)

Pth(*rap*) valgu spetsiifiline aktiivsus on madalam kui Pth(*wt*) valgu aktiivsus, kuid Pth(*rap*) ja Pth(*wt*) stabiilsused on võrreldavad (Cruz-Vera *et al.*, 2000).

Pth(*rap*) mutandis on Arg133 muteerunud histidiiniks. Arg133 on üks kahest positiivselt laetud aminohappejäägist, mis interakteerub peptidüül-tRNA 5'fosfaadiga (Schmitt *et al.*, 1997). Nõrgenenud interaktsiooni tRNA 5'fosfaadiga, kompenseerib pikem peptidüül-tRNA peptiidiahel. Pth(*wt*) efektiivsus fMet-Lys-tRNA^{Lys} hüdrolüüsimsil on 75 korda kõrgem kui Pth(*rap*) puhul, aga oktapeptidüül-tRNA puhul jääb Pth(*wt*) efektiivsus vaid 10 korda kõrgemaks (Heurgue-Hamard *et al.*, 1996; Heurgue-Hamard *et al.*, 2000).

Pth(*rap*) mutant ei võimalda bakteriofaag λ vegetatiivset kasvu. Faagi mutandid, mis on võimelised kasvama sellises bakteris sisaldavad mutatsiooni *bar* lookuses paiknevas minigeenis (Valadez *et al.*, 2001).

1.4.1.2 Pth(*ts*)

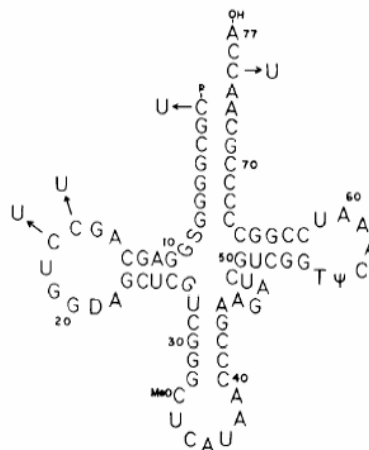
Pth(*Ts*) mutant on temperatuuritundlik *E. coli* tüvi. Pth(*Ts*) valk on *in vivo* väga ebastabiilne nii mittepermissiivse (43 °C) kui ka permissiivse (30 °C) temperatuuri juures, kuid tema spetsiifiline aktiivsus on võrreldav metsiktüüpi ensüümiga (Pth(*wt*)). Pth(*Ts*) kontsentratsioon on madal juba 30 °C juures, kuid langeb veelgi 43 °C juures (Cruz-Vera *et al.*, 2000).

Temperatuuri-tundliku Pth fenotüübi tekke eest vastutab Gly100 mutatsioon asparagiiniks. Ebastabiilse rakulise Pth(*Ts*) valgu kontsentratsiooni suurendavad: geeni koopiaarvu tõus ja üleproduktioon, mis võimaldavad raku kasvu mittepermissiivsetel temperatuuridel. *In vivo* ebastabiilne Pth(*Ts*) valk toetab raku kasvu vaid siis, kui tema kontsentratsioon on kõrge, võimaldades valgusünteesi (Cruz-Vera *et al.*, 2000).

1.4.2 Pth substraadid

Pth(*Ts*) tüve viimisel kõrgesse temperatuuri (40 °C juurde), toimub järsk peptidüül-tRNAde fraktsiooni suurenemine. Need akumulunud tRNA molekulid ei aktsepteeri aminohapet tavalises aminoatsüleerimisreaktsioonis, sest aminoatsüül-tRNA süntetaasi töötamiseks vajalik terminaalne (2', 3')-OH grupp on esterifitseeritud peptiidi jäägiga suhteliselt stabiilse ester-sidemega, mis pole atakeeritav vastava aminoatsüül-tRNA süntetaasi poolt. Aminohappe aktseptorne aktiivsus on maskeeritud kuni aktiivse Pth-ga töötlemiseni. Pärast Pth töötlust oli tRNAsid võimalik aminoatsüleerida (Menninger, 1976).

Pth interakteerub tRNA aktseptor linguga analoogselt EF-Tu-ga (Fromat *et al* 1999). Aminoatsüül-tRNA ära tundmiseks EF-Tu poolt on vajalik 3'-terminaalses CCA järjestuses C nukletotiidi olemasolu. Kui 3'-terminaalne CCA -OH järjestuses muuta C → U-ks, väheneb aminoatsüül-tRNA afiinsus EF-Tu-le (Joonis 9). Bisulfit-modifitseeritud fMet-tRNA^{fMet}-d, millest 70-80% sisaldasid CUA-OH hüdrolüüsimise kiirus Pth poolt on võrreldav modifitseerimata fMet-tRNA^{fMet} lõikamiskiirusega. Järelikult C₇₅→U₇₅ modifikatsioon omab väikest või ei oma efekti fMet-tRNA^{fMet} hüdrolüüsi kiirusele (Schulman & Pelka, 1975).



Joonis 9: C konversioon U-ks bisulfit-modifitseeritud *E. coli* tRNA^{fMet} molekulis (Schulman & Pelka, 1975).

Peptidüül-tRNA hüdrolüüsiks on vaja peptidüül-tRNA struktuurseid omadusi: aminohappe L-konformatsioon, vähemalt ühe peptiidsideme olemasolu, substraadi tRNA aktseptorheeliksi 1-72 aluspaardumine, et täpselt reguleerida tRNA 5'-fosfaat-grupi positsiooni Pth aktiivtsentris (Schmitt *et al.*, 1997; Schulman & Pelka, 1975).

Ensümaatilist lõikamist hõlbustab 5'-terminaalse fosfaadi olemasolu aluspaardunud aktseptorheeliksi lõpus. 5'-fosfaatgrupi eemaldamine N-atsetüül-fenüülalanüül-tRNA^{Phe} või bisulfitiga modifitseeritud fMet-tRNA^{fMet} puhul, vähendab hüdrolüüsi kiirust. 5'-fosfaatgrupi eemaldamine modifitseerimata fMet-tRNA^{fMet}-lt selle tRNA hüdrolüüsi tasemele efekti ei oma (Schulman & Pelka, 1975).

Aktseptorheeliksi 1 ja 72 aluspaari vesiniksidemetega paardumine või mittepaardumine mõjutab N-atsetüül-aminoatsüül-tRNAde hüdrolüüsi efektiivsust Pth poolt.

N-atsetüül-metionüül-tRNA^{fMet} (initsiaator tRNA) on mittetundlik Pth töötuse suhtes. See on tingitud tRNA^{fMet} nukleotiidsest järjestusest. N-atsetüül-metionüül-tRNA^{fMet} mittetundlikkus Pth suhtes ei sõltu tRNAga esterifitseeritud aminohappest, sest N-atsetüül-metionüül-tRNA^{mMet} (elongaator tRNA) on Pth-le heaks substraadiks. Kui aga tRNA^{fMet} keemiliselt modifitseerida Na-bisulfitiga, muutub N-atsetüül-metionüül-tRNA^{fMet} Pth-le heaks substraadiks. Bisulfiti toimel C₁ vahetatakse U vastu ja võimaldab aluspaarduda A₇₂ nukleotiidiga, mis on Pth aktiivsuse kasvu põhjus (Schulman & Pelka, 1975). 1 ja 72 aluspaari mittepaardumine initsiaator tRNA^{fMet} -is seletab Pth väikest aktiivsust N-atsetüül-metionüül-tRNA^{fMet} vastu (Dutka *et al.*, 1993).

2. TÖÖ EESMÄRK

Käesoleva töö eesmärgiks oli vaadelda kahte aspekti makroliidide põhjustatud bakterite kasvu inhibitsioonis:

- 1) peptidüül-tRNA kuhjumise rolli;
- 2) resistentsusmutatsioonide ja membraanipumpade omavahelisi funktsionaalseid seoseid (ribosoomivalkude L4 ja L22 ning membraanipumba valkude TolC ja AcrB näitel).

3. MATERJAL JA METOODIKA

3.1 Bakteritüved ja plasmiidid

Eksperimentide läbiviimiseks kasutati *Escherichia coli* tüvesid C600 (*thr-1 leu-6 thi-1 supE44 tonA lacY1*), C600(*rap*) (*pth (rap) zch::Tn10*) (Guarneros *et al.*, 1987), MG1655 (F- λ -*ilvG- rfb-50 rph-1*), erütromütsiiniresistentsed MG1655 ribosoomivalkude mutandid: L4ery^R(Lys63Glu), Δ L4ery^R(Δ 63-63), L22ery^R(Δ 82-84) (tehtud Vladimir Vimberg'i poolt).

Käesolevas töös kasutatud plasmiidid:

- pKD46 - Red-helper plasmiid (Datsenko & Wanner, 2000)
- pKD13 (Datsenko & Wanner, 2000)
- pUC $_{pth}$ – pUC19 plasmidi baasil valmistatud ekspressioonikonstruktsioon Pth valgu üleekspressiooni analüüsimiseks (Dutka *et al.*, 1993).
- pUC19 - Sisaldab ampitsilliini resistentsusgeeni, bakteriaalset *origin*'i ja unikaalseid restriktaaside lõikamiskohti klonereerimise jaoks.

3.2 Söötmed ja kemikaalid

Baktereid kasvatati temperatuuridel 37 °C ja 30 °C. Vastavalt bakteritüvele ja resistentsusmarkeritele lisati söötmesse antibiootikume: ampitsilliin (lõppkontsentratsioon 100 µg/ml) (Balkanpharma-Razgrad AD), kanamütsiin (lõppkontsentratsioon 25 µg/ml) (Sigma), erütromütsiin (lõppkontsentratsioon 50 µg/ml) (Amresco), tetratsükliin (lõppkontsentratsioon 25 µg/ml).

Transformatsiooni selektsioonil kasutati ampitsilliini, erütromütsiini vastavalt 100 µg/ml ja 50 µg/ml ning kanamütsiini-resistentsed (Km^R) transformandid selekteeriti 25 µg/ml kanamütsiini sisaldaval LB-agarsöötmele.

- Luria-Bertani (LB) vedelsööde (10 g/l trüptooni, 5 g/l pärmiekstrakti, 10 g/l NaCl) (Sambrook & Russell, 2001).
- LB tardsööde, mille saamiseks lisati LB vedelsöötmesse agarit 1,5 %-lise lõppkontsentratsioonini (Sambrook & Russell, 2001).
- M9 sööde: mineraalainete segu M9 5-kordne kontsentraat (64 g Na₂HPO₄*7H₂O, 15 g KH₂PO₄, 2,5 g NaCl, 5,0 g NH₄Cl, vesi kuni 1 liitrini) 20 ml, 40% glükoosi 0,5 ml, mikroelemendid 250 µl, sõltuvalt katsest ka aminohapped 400 µl, vesi kuni 1 liitrini.
- SOB sööde: (Sambrook & Russell, 2001).
- SOC sööde: SOB + 20 mM glükoos

Induktsiooniks kasutati L-arabinoosi kontsentratsioonil 2 mM. PCR-i testidel kasutati *Taq* polümeraasi (Fermentas). Kloneerimiseks ja mutageeniseks kasutati *Taq* ja *Pfu* (Fermentas) 10:1 segu vastavalt *Taq*-kasutusjuhendile. PCR reaktsiooniks olid veel vajalikud dNTP, PCR puhver (NH₄(SO₄)₂⁺;MgCl₂⁻), BSA, MgCl₂ (Fermentas). Oligonukleotiidid on pärit firmalt DNA Technology A/S (Taani). Elektroforeesil kasutati TAE puhvrit (40 mM Tris-atsetaat, 1 mM EDTA).

3.3 Aparatuur

Tsentrifugimiseks kasutati Eppendorf Centrifuge 5415R tsentrifuugi.

Kontsentratsioonid mõõdeti spektrofotomeetril Heliosβ (Thermo Electron Corporation).

Elektroporatsioonil kasutati Biorad elektroporaatorit.

3.4 PCR

PCR viidi läbi firma *Fermentas* reagentide kasutades ning tootja poolt soovitatud protokollide järgides. Geeni eemaldamiseks vajaliku inserdi, kanamütsiini geeni, amplifitseerimiseks plasmiidilt pKD13 korrati järgmist tsükli 30 korda: denaturatsioon 95 °C juures 1 minut,

praimerite seundumine 55 °C juures 1 minut, ekstensioon 72 °C juures 1 minut 30 sekundit; ahelate täissünteesimine 72 °C 10 minutit. Kasutatud praimerid on toodud tabelis 1.

Tabel 1. Deletsioonigatüvede valmistamisel kasutatud praimerid

Nimetus	Järjestus
tolC praimer 1 (<i>forward</i>)	5' AAT TTT ACA GTT TGA TCG CGC TAA ATA CTG CTT CAC AAG GAA TGC AAG TGT AGG CTG GAG CTG CTT C 3'
tolC praimer 2 (<i>reverse</i>)	5' TTT ACG TTG CCT TAC GTT CAG ACG GGG CCG AAG CCC CGT CGT CAT CAA TTC CGG GGA TCC GTC GAC C 3'
acrB praimer 1 (<i>forward</i>)	5' TGC TCA GCC TGA ACA GTC CAA GTC TTA ACT TAA ACA GGA GCC GTT AAG ACG TGT AGG CTG GAG CTG CTT C 3'
acrB praimer 2 (<i>reverse</i>)	5' ATG CAT AAA AAA GGC CGC TTA CGC GGC CTT AGT GAT TAC ACG TTG TAT CAA TTC CGG GGA TCC GTC GAC C 3'

Geenideletsiooniga tüvede õigsuse kontrollimiseks, nende tüvede genoomselt DNA-lt amplifitseeriti DNA fragmente korrates järgmist tsüklit 25 korda: 95 °C 1 minut, 55 °C 1 minut; 72 °C 1 minut; ahelate täissünteesimine 72 °C 5 minutit. Kasutatud praimerid on toodud tabelis 2.

Tabel 2. Geenideletsiooniga tüvede õigsuse kontrollimise töös kasutatud praimerid

Nimetus	Järjestus
tolCright:	5' ATG GCT GGT CGA AAT TGA AG 3'
tolCleft:	5' CTT GAC CAC AAG GAA TGC AA 3'
acrBright:	5' CTT ACG CGG CCT TAG TGA TT 3'
acrBleft:	5' AGT GGC TGG TGA CAG AAG GT 3'
K1:	5' CAG TCA TAG CCG AAT AGC CT 3'
K2:	5' CGG TGC CCT GAA TGA ACT GC 3'

PCR fragmentide pikkused:

Kanamütsiini resistentsusgeeni pikkus 1257 bp.

Kanamütsiini resistentsus geeni pikkus, amplifitseerituna *acrB* geeni väljalülitamiseks konstrueeritud praimeritega, on 1467 bp ja amplifitseerituna *tolC* geeni väljalülitamiseks konstrueeritud praimeritega, on 1383 bp.

tolC geeni pikkus amplifitseerituna *tolC* geeni väljalülitamiseks konstrueeritud praimeritega on 1568 bp. *tolC* geeni asendumist kanamütsiiniresistentsusgeeniga kontrolliti *tolC* geeni 3' ja 5' otstest välja poole jäävatele aladele komplementaarseid järjestusi sisaldavate praimeritega: praimerid tolCright ja tolCleft. DNA produkti pikkus 1594 bp

Kanamütsiini resistentsusgeeni sisene praimer K1 ja tolCright: DNA produkti pikkus 507 bp. Kanamütsiini resistentsusgeeni sisene praimer K2 ja tolCleft: DNA produkti pikkus 653 bp.

acrB geeni pikkus amplifitseerituna *acrB* geeni väljalülitamiseks konstrueeritud praimeritega on 3218 bp. *acrB* geeni asendumist kanamütsiiniresistentsusgeeniga kontrolliti *acrB* geeni 3' ja 5' otstest välja poole jäävatele aladele komplementaarseid järjestusi sisaldavate praimeritega: praimerid acrBright ja acrBleft. DNA produkti pikkus 3331 bp

Kanamütsiini resistentsusgeeni sisene praimer K1 ja acrBright: DNA produkti pikkus 431 bp. Kanamütsiini resistentsusgeeni sisene praimer K2 ja acrBleft: DNA produkti pikkus 813 bp.

3.5 Elektroforees

PCR-i fragmentide analüüsimiseks kasutati elektroforeesi 1x TAE (TRIS/atsetaat/EDTA) puhvris, 1 %-lises agaros-TAE geelis, mis sisaldas DNA visualiseerimiseks 0,5 µg/ml etiidiumbromiidi. 20 µl PCR segule lisati 4 µl 6 kordset foreesi värvilahust (Fermentas). Elektroforeesiti pingel 100 V.

Molekulmassi markeriks kasutati 1 kb Ladder ja pBR322AluI markerit (Fermentas).

3.6 PCR fragmentide puhastamine

PCR-i fragmentide geelist puhastamiseks kasutati Mo Bio *Ultra Clean™ 15 DNA Purification Kit*'i. PCR produktile lisati 3 osa *Ultra Salt* puhvrit (1 µl 1 mg kohta). Lisati *Ultra Bind* maatriksit 5 µl + 1 µl iga oodatava µg DNA kohta. Saadud lahust inkubeeriti pidevalt segades 5 minutit toatemperatuuril ja tsentrifuugiti seejärel lauatsentrifuugiga (*Heraeus Biofuge Pico*) 13 000 rpm 5 sekundit. Eemaldati supernatant ning sade lahustati 1 ml *Ultra Wash* puhvris, seejärel tsentrifuugiti 13 000 rpm 5 sekundit. Eemaldati supernatant ja tsentrifuugiti uuesti 13 000 rpm 5 sekundit, eemaldades seejärel viimased pesulahuse jäägid. Sade lahustati kasutatud DNA maatriksi kogusest 2 korda suuremas mahus H₂O-s ning seejärel inkubeeriti toatemperatuuril 5 minutit, et DNA maatriksi küljest vabaneks. Maatriks eraldati tsentrifuugides 13 000 rpm 1 minut ning DNA'd sisaldav vesifaas kanti üle uude tuubi.

3.7 Kompetentsete *E. coli* rakkude valmistamine

E. coli C600, C600(*rap*), MG1655, L4ery^R, ΔL4ery^R, L22ery^R kompetentsed rakud valmistati CaCl₂ meetodil:

Värskelt LB-agarosplaadilt külvati üksikkoloonia LB-vedelsöötmesse ja kasvatati üleöö.

Üleöökkultuurist inokuleeriti 100 korda lahjendatud bakterirakukultuur LB-vedelsöötmesse.

Inkubeeriti 37 või C600(*rap*) puhul 30 °C juures 220 rpm loksutil kuni kultuuri OD (A550 nm) on ligikaudu 0,5. Rakud kanti tsentrifuugi tuubi ja tsentrifuugiti 4 °C juures 10 minut

5000 rpm. Eemaldati söötme jäägid. Rakud suspendeeriti õrnalt 1/2 kultuuri mahus jääkülma 0,1 M CaCl₂ ja tsentrifuugiti 4 °C juures 10 minut 5000 rpm. Eemaldati söötme

jäägid ning resuspendeeriti ¼ kultuuri mahus jääkülma 0,1 M CaCl₂, hoiti jääl 20 minutit.

Tsentrifuugiti 4 °C juures 10 minut 5000 rpm. Sööde eemaldati ning rakud resuspendeeriti 1/20 kultuuri mahus jääkülma 0,1 M CaCl₂. Rakke hoiti üleöö jääl + 4 °C juures.

3.7.1 Kompetentsete rakkude külmutamine

Bakterirakukultuurile lisati säilitamiseks steriilset 50 % glütserooli lõppkontsentratsioonini 15 %. Rakud külmutati ja säilitati -70 °C juures.

3.8 Transformatsioon

E. coli C600, C600(*rap*), MG1655, L4ery^R, ΔL4ery^R, L22ery^R kompetentsed rakud valmistati CaCl₂ meetodil. Jääl hoitud kompetentsetele rakkudele lisati 1 plasmiidset DNAd

(pUC19 ja pUC*pth* C600 ja C600(*rap*) ning pKD46 MG1655, L4ery^R, ΔL4ery^R, L22ery^R puhul) ja inkubeeriti 30 minutit jääl. DNA rakku sisestamiseks kasutati kuumašokki (42 °C

45 sekundit). Pärast seda jahutati rakud 1 minuti jooksul jääl ning turgutati 10 minutit 200 μl LB söötmes toatemperatuuril. Seejärel plaaditi raku suspensioon antibiootikumi (Amp

100 μg/ml) sisaldavatele LB tardsöötme tassidele, L4, ΔL4, L22 puhul sisaldas LB tardsööde veel lisaks ka Ery 50 μg/ml. Plaatide inkubeeriti 30 °C juures üleöö.

C600, C600(*rap*) tüvedesse transformeeriti plasmiidid pUC(*pth*) või pUC19. MG1655, L4ery^R, Δ L4ery^R, L22ery^R kompetentsetesse rakkudesse transformeeriti *Red* rekombinaasi ekspressiooni plasmidi pKD46 (Amp^R).

3.9 Geenideletsiooniga tüvede valmistamine: geenide *tolC* ja *acrB* väljalülitamine

Mutantsed tüved MG1655 Δ *tolC*, MG1655 Δ *acrB*, L4ery^R Δ *tolC*, L4ery^R Δ *acrB*, Δ L4ery^R Δ *tolC*, Δ L4ery^R Δ *acrB*, L22ery^R Δ *tolC* ja L22ery^R Δ *acrB* on valmistatud MG1655, L4ery^R, Δ L4ery^R, L22ery^R tüvedest kasutades Kirill A. Datsenko ja Barry L. Wanner protokoll (Datsenko & Wanner, 2000) modifikatsiooni.

3.9.1 Rakkude kasvatamine, elektrokompetentsed rakud

Red plasmidi kandvaid transformante kasvatati 40 ml SOB kultuuris (0,5 ml kolvis), lisatud, ampitsilliin (100 μ g/ml), L-arabinoos (2 mM) ning L4ery^R, Δ L4ery^R, L22ery^R rakkude puhul ka erütromütsiin (50 μ g /ml). Võeti inokulum üleöökultuurist ning tehti lahjendus tiheduseni OD (A600 nm) 0,08. Kasvatati 30° C juures kuni OD (A600 nm) = 0,3 – 0,6.

Seejärel tehti elektrokompetendid:

Jääl jahutatud rakud tsentrifugeeriti Sorvalli *swing-out* rootoris 10 minutit 5000 rpm. Eemaldati hoolikalt söötmejääd. Rakud resuspendeeriti 1/10 kultuuri mahus jääkülmas 10 % glütseroolis. Tsentrifugeeriti Eppendorfi jahutusega lauafuugis 4 °C juures 1 minut 10 000 rpm. Pärast neljakordset rakkude pesemist eelpool kirjeldatud viisil, lisati rakkude sademele umbes kaks mahtu 10% glütserooli. Saadi elektrokompetentsed rakud kahe poratsiooni jaoks (à 40 μ l)

3.9.2 Bakterirakkude transfektsioon elektroporatsiooni teel

Segati jääl 40 µl rakke ja 1 µl puhastatud PCR produkti (ühe poratsiooni jaoks arvestatakse 10-100 ng DNAd). Poreeriti 0,2 cm küvettides, kasutades Biocardi Bacterial 2 programmi *E. coli* jaoks (25 µF, 200 ohmi, 2500 V). Turgutamiseks lisati 1 ml SOC söödet ning loksutati 220 rpm 37 °C juures 1 tund. Rakuspensioon külvati kanamütsiini (25 µg/ml) sisaldavale LB-agarosplaadile kanamütsiini geeni sisaldavate transformantide selekteerimiseks. Plaate inkubeeriti 24 tundi 37 °C juures.

3.10 Inhibitsioonikatsed

3.10.1 Josamütsiini ja erütromütsiini indutseeritud “*drop-off*” i mõju Pth-d üleekspresseerivatele rakkudele

E. coli C600 ja C600(*rap*) üleöökultuuridest (mis on kasvanud 37 °C juures 220 rpm) tehti lahjendused 10 ml LB vedelsöötmesse algtiheduseni OD (A600 nm) 0,1. Kasvatati 37 °C juures 220 rpm kuni tiheduseni OD₆₀₀=0,4-0,6. Tehti lahjendus OD (A600 nm) 0,1-ni 2 ml LB-söötmesse, kuhu lisatud kasvavas kontsentratsioonis antibiootikumi (vastavalt kas erütromütsiini või josamütsiini). Kasvatati 4 h 37 °C juures 220 rpm ning mõõdeti optiline tihedus OD (A600 nm).

Kasutatud erütromütsiini või josamütsiini kontsentratsioonid (µg/ml): 0; 5; 10; 25; 50; 75; 100; 150; 250; 350

Antibiootikumi alglahjendust lisati söötmesse 10 µlⁱs.

3.10.2 Bakterite kasvu inhibitsioon erütromütsiiniga, et hinnata AcrB ja TolC mõju bakterite resistentsusele

Üleöökultuurist (mis on kasvanud 37 °C juures 220 rpm) tehti lahjendus 10 ml LB-sse kuni OD (A600 nm) 0,1. *acrB* ja *tolC* mutantide puhul lisati Kana 25 µg/ml ning L4ery^R, ΔL4ery^R, L22ery^R tüvede korral Ery 50 µg/ml. Kasvatati 37 °C juures 220 rpm kuni

tiheduseni OD (A600 nm) 0,4-0,6. Tehti lahjendus OD (A600 nm) 0,1-ni 2 ml LB-söötmesse, kuhu lisati erütromütsiini.

Kasvatati 4 h 37 °C juures 220 rpm ning mõõdeti optiline tihedus OD (A600 nm).

Kasutatud erütromütsiin kontsentratsioonid (µg/ml): 0; 0,5; 0,75; 1; 1,25; 1,5; 2,5; 5; 7,5; 10; 25 ning 0; 5; 10; 25; 50; 75; 100; 150; 250; 350

Antibiootikumi alglahjendust lisati söötmesse 10 µl'is.

3.11 Bakterite nakatamine λ-faagiga

0,4 % maltoosi ja 10 mM MgSO₄ sisaldavas LB-söötmesse tehti üleökultuurist 100 kordne lahjendus ja kasvatati 2 tundi 30 °C juures. Seejärel lisati bakterikultuur pakitud faagile ja inkubeeriti 10 minutit 37 °C juures. Faagi ja bakterite segu lisati Top-agarosile (0,5% agaros LB-söötmes) ning valati eelsoojendatud LB-agarosplaadile. Agarosil lasti plaadil tarduda 10 minutit ning inkubeeriti 37 °C juures üleöö.

3.12 Transduktsioon bakteriofaag P1-ga

Üleökultuurist tehti 10 kordne lahjendus LB-söötmesse, mis sisaldas 0,2 % glükoosi ja 5 mM CaCl₂-te. Inkubeeriti 37 °C juures 1,5 tundi 220 rpm. Seejärel lisati 100 µl P1 lüsaati (ligikaudu 10⁸ faagi/ml) ning inkubeeriti samadel tingimustel 2 tundi. Nakatatud kultuur töödeldi 5 minuti jooksul 5000 rpm kloroformiga lüüsunud rakkude sadestamiseks ning seejärel töödeldi samadel tingimustel kloroformiga .

Määrati faagi tiiter.

Nakatamiseks 1 ml retsipientrakkude hilisesse log-faasi jõudnud kultuuri töödeldi 10 µl 1 M CaCl₂ lahusega ning lisati P1 faagi lüsaati. Inkubeeriti 30 minutit 37 °C juures ja lisati 200 µl 1 M Na-tsitraati. rakud tsentrifuugiti 6000 rpm 3 minuti jooksul. Osa söödet eemaldati ning nakatatud rakud plaaditi 25 µl/ml kanamütsiini ja 10 mM Na-tsitraati sisaldavale agarosplaadile. Rakke kasvatati 37 °C juures üleöö.

4. TULEMUSED

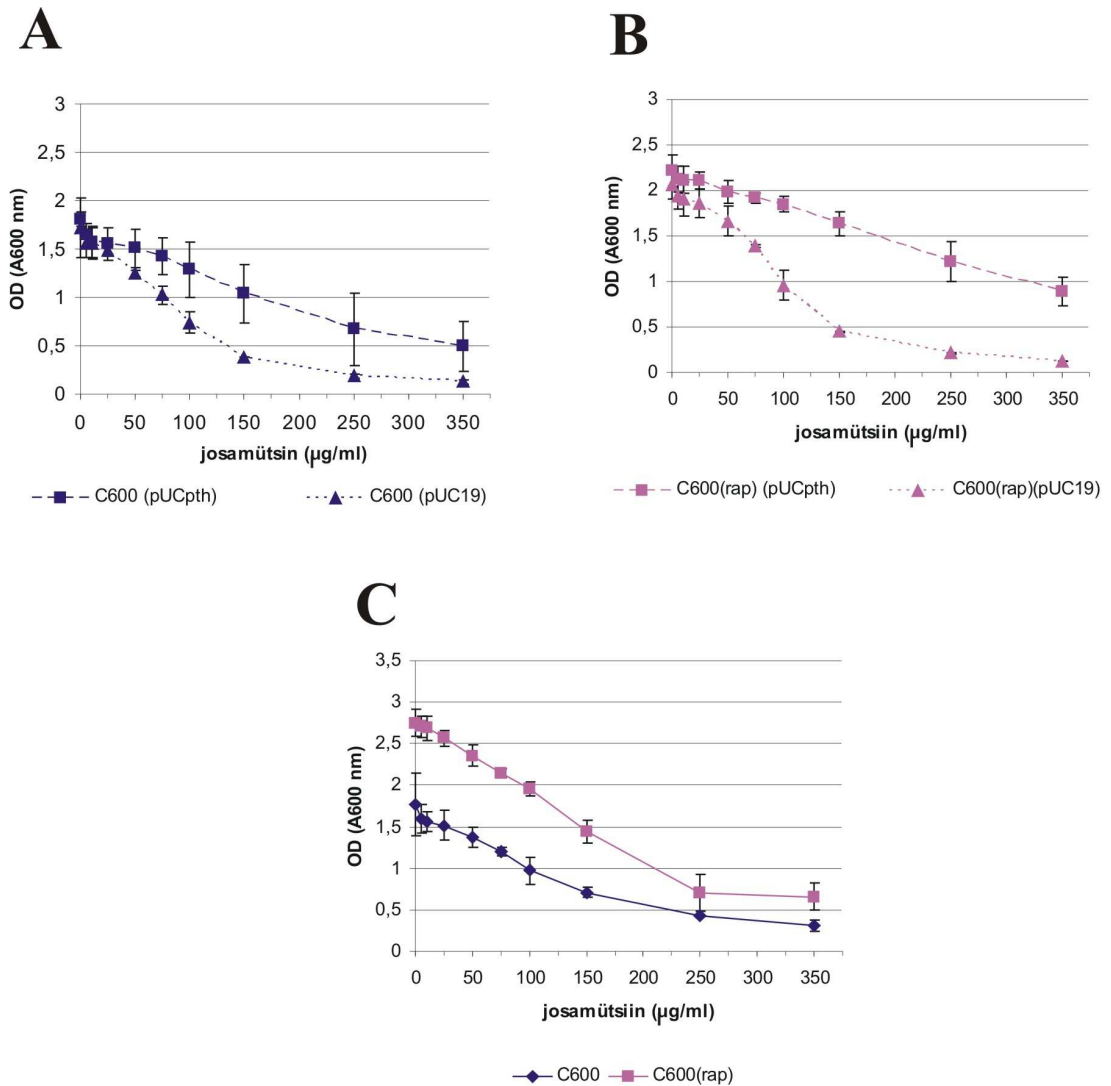
4.1 Josamütsiini ja erütromütsiini poolt indutseeritud peptidüül-tRNA “drop-off”i mõju bakterite kasvule

Makroliidide indutseeritud „drop-off” võib olla bakteri rakkudele toksiline, kuna on tõenäoline, et peptidüül-tRNA akumulereerumine rakus vähendab vabade tRNA isoaktseptorite varu (Heurgue-Hamard *et al.*, 1996; Heurgue-Hamard *et al.*, 2000; Tenson *et al.*, 1999). On teada, et makroliidid põhjustavad peptidüül-tRNAde „drop-off”i ribosoomidelt nii *in vitro* (Otake & Kaji, 1975) kui ka *in vivo* (Menninger & Otto, 1982).

Ensüüm Pth hüdrolüüsib peptidüül-tRNAd ja N-atsetüül-aminoatsüül-tRNAd vabadeks tRNAdeks ja peptiidideks või N-atsetüül-aminohapeteks vastavalt, suurendades sellega aminoatsüleerumisvõimeliste tRNAde kogust. Käesolevas töös vaadeldi, kas makroliidide põhjustatud peptidüül-tRNAde kuhjumine mõjutab bakterite elulisust eeldusel, et ensüümi Pth üleekspressioon taastab vabade tRNAde varu. Selleks transformeeriti Pth üleekspressiooni plasmiid pUC $_{pth}$ *E. coli* tüvede C600 ja Pth defitsiitse tüve C600(*rap*) kompetentsetesse rakkudesse. Kontrolltüvedena kasutati samu *E. coli* tüvesid, kuhu oli transformeeritud pUC19 plasmiid või plasmiid jäetud lisamata. Bakterite kasvu pärssimiseks lisati kasvukeskkonda anibiootikume erütromütsiin ja josamütsiin. Josamütsiin ja erütromütsiin kuuluvad kahte erinevasse makroliidide klassi ning on näidatud, et need inhibeerivad valgusünteesi erineval moel (Poulsen *et al.*, 2000). Josamütsiin on 16-lülilise laktooni ringiga ning erütromütsiin on 14-lülilise laktooni ringiga

makroliid, mis mõlemad seonduvad ribosoomi suure subühiku peptidüültransferaasse tsentri lähedusse, kuid blokeerivad valgusünteesi erineva peptiidi pikkuse juures (Tenson *et al.*, 2003). Josamütsiini juuresolekul tekib kõige rohkem dipeptiide (Lovmar *et al.*, 2004), kuid erütromütsiin võimaldab sünteesida veidi pikemaid peptiidijuppe enne kasvava valgu elongatsiooni inhibeerimist.

E. coli üleöökultuuridest tehti lahjendused 10 ml LB vedelsöötmesse algtiheduseni OD (A600 nm) 0,1. Kasvatati ning eksponentsiaalse kasvufaasi alguses OD (A600 nm) 0,4-0,6 tehti lahjendus algtiheduseni OD (A600 nm) 0,1 2 ml LB vedelsöötmesse, kuhu oli lisatud antibiootikumi, ühel juhul erütromütsiin, teisel juhul josamütsiini. Peale 4 h bakterikultuuri inkubeerimist 37 °C juures mõõdeti bakterirakkude tihedus OD (A600 nm). Saadi inhibitsioonikõverad, mis näitavad, et nii erütromütsiini kui josamütsiini lisamine on mõjunud mõlemale katses kasutatud *E. coli* bakteritüve metsiktüüpi Pth-ga C600 (joonis 10 paneelid A ja C; joonis 11 paneelid A ja C) ja mutantse Pth-ga C600(*rap*) (joonis 10 paneelid B ja C; joonis 11 paneelid B ja C) kasvule pärssivalt. Jooniselt 10 on näha, et Pth üleekspressiooni plasmidi sisaldavate tüvede kasv on saanud eelise võrreldes tüvedega, mis ei sisalda Pth üleekspressiooni plasmidi. Tundub, et josamütsiini põhjustatud peptidüül-tRNAde „*drop-off*” mõjutab bakterite kasvu, sest Pth üleekspressiooniga tüvede kasv on küll inhibeeritud, kuid vähemal määral võrreldes Pth üleekspressiooni plasmidi mitte sisaldava bakteritüvega. See tähendab, et Pth-d üleekspressioneerivad tüved taluvad paremini samas suurusjärgus josamütsiini kontsentratsioone tänu Pth ensümaatilisele aktiivsusele vabastada isoaktseptoorseid aminoatsüleerumisvõimelisi tRNAsid peptidüül-tRNA kompleksist. Järelikult võib Pth-d mitteüleekspresserivates tüvedes olla rohkem peptidüül-tRNAsid, millest tuleneb bakterite halvem antibiootikumi talumine.

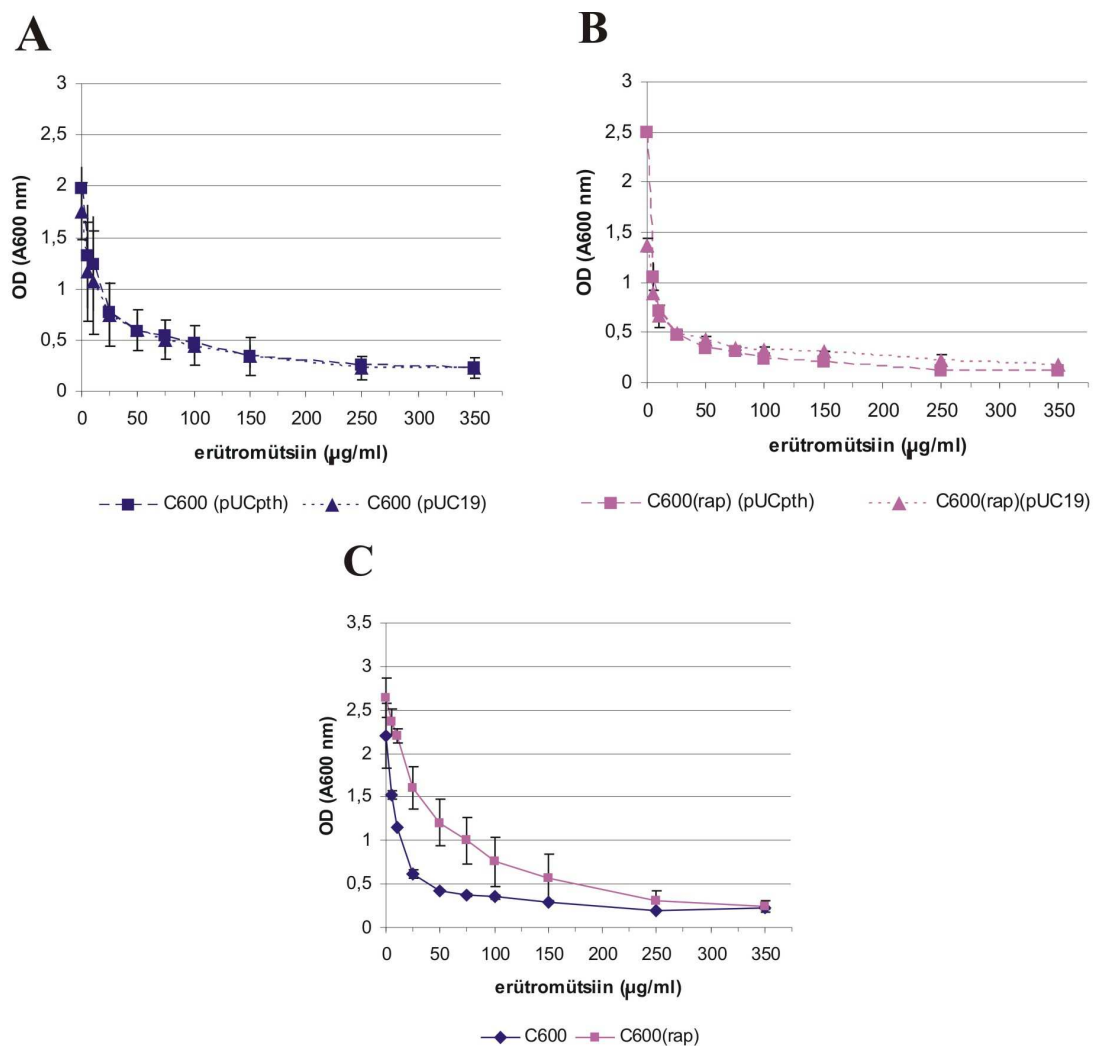


Joonis 10: Bakterite kasvu inhibitsioon josamütsiiniga ning ensüümi Pth üleekspressiooni mõju bakterite elulisusele. *E. coli* üleökultuuridest tehti lahjendused 10 ml LB vedelsöötmesse algtiheduseni OD (A600 nm) 0,1. Eksponentsiaalse kasvufaasi alguses OD (A600 nm) 0,4-0,6 tehti lahjedus algtiheduseni OD (A600 nm) 0,1 2 ml LB vedelsöötmesse, kuhu oli lisatud josamütsiini. Peale 4 h bakterikultuuri inkubeerimist 37 °C juures, mõõdeti bakterirakkude tihedus OD (A600 nm). Josamütsiini lisamine on mõjunud mõlemale katses kasutatud *E. coli* bakteritüve metsiktüüpi Pth-ga C600 (paneel A ja C) ja mutantse Pth-ga C600(rap) (paneel B ja C) kasvule pärssivalt. Pth üleekspressiooni plasmidi sisaldavate tüvede kasv on saanud eelise võrreldes tüvedega, mis ei sisalda Pth üleekspressiooni plasmidi.

Sama olukord aga ei kehti joonis 11 puhul, kus kasvu inhibeerimiseks on kasutatud erütromütsiini – kasv on inhibeeritud kõigi uuritud bakterikultuuride, nii Pth üleekspressiooniplasmidi sisaldava kui mittesisaldavate, puhul võrreldaval tasemel. Seega,

kui bakteritüvi sisaldas Pth üleekspressiooni plasmidi, andis see bakterile suurema elulisuse võrrelduna Pth üleekspressiooni plasmidi mitte sisaldava tüvega. Kuid selline Pth üleekspressioon andis efekti vaid siis, kui bakterikultuur kasvas josamütsiini manulusel. Erütromütsiin on kõiki bakteritüvesid inhibeerinud võrreldaval tasemel.

Bakterite kasvu inhibitsioon saabub kui makroliidid on blokeerinud ribosoomid ning valgusüntees peatub. Valgusünteesi peatumine on kasvu inhibitsiooni esmane põhjus. Järgnevalt täispikke peptiide ei toodeta ning raku kuhjuvad ebaküpsed peptidüül-tRNAd, mis vähendavad valgusünteesiks vajalike isoaktseptoorsete tRNAd kontsentratsiooni. Selline peptidüül-tRNAd "drop-off" on sekundaarne kasvu inhibeeriv mehhanism. Antud katse näitab, et bakterite kasvu inhibitsiooniks on josamütsiini puhul vajalik kõrgem antibiootikumi kontsentratsioon kui erütromütsiini puhul, kuna samaväärne kasvu inhibitsioon on erütromütsiini puhul saavutatud madalama kontsentratsiooni juures võrreldes josamütsiiniga ehk metsiktüüpi tüve, C600, puhul oli vajalik 250 µg/ml josamütsiini, et saavutada samaväärne inhibitsiooni tase kui 50 µg/ml erütromütsiiniga (joonised 10 C ja 11 C). Rakuvabas süsteemis on näidatud, et josamütsiin seondub ribosoomiga stabiilsemalt kui erütromütsiin, mille puhul on näidatud, et ribosoomiga seondumine ja ribosoomilt vabanemine toimub kiiremini (Lovmar *et al.*, 2004).



Joonis 11: Bakterite kasvu inhibitsioon erütromütsiiniga ning ensüümi Pth üleekspressiooni mõju bakterite elulisusele. *E. coli* üleökultuuridest tehti lahjendused 10 ml LB vedelsöötmesse algtiheduseni OD (A600 nm) 0,1. Eksponentsiaalse kasvufaasi alguses OD (A600 nm) 0,4-0,6 tehti lahjedus algtiheduseni OD (A600 nm) 0,1 2 ml LB vedelsöötmesse, kuhu oli lisatud kasvavas kontsentratsioonis erütromütsiini. Peale 4 h bakterikultuuri inkubeerimist 37 °C juures, mõõdeti bakterirakkude tihedus OD (A600 nm). Erütromütsiini lisamine on mõjunud mõlemale katses kasutatud *E. coli* bakteritüve metsiktüüpi Pth-ga C600 (paneel A ja C) ja mutantse Pth-ga C600(rap) (paneel B ja C) kasvule pärssivalt juba madalate kontsentratsioonide juures. Pth üleekspressiooni plasmidi sisaldavate tüvede kasv on võrreldav Pth üleekspressiooni plasmidi mitte sisaldavate tüvedega.

Järelikult küllastava josamütsiini kontsentratsiooni korral peaks täispikkade valkude süntees olema peatatud, kuid erütromütsiini puhul mitte. Antud katse tulemused aga näitavad, et erütromütsiini põhjustatud bakteri kasvu inhibitsioon saabub madalamate kontsentratsioonide juures kui josamütsiini põhjustatud inhibitsiooni puhul. Näib, et *in vivo* süsteemis mõjutab antibiootikumide toimemehhanismi lisategurid, nagu näiteks membraani permeaablus konkreetsele antibiootikumile. Gram-negatiivse raku puhul peab makroliid läbima rakku ümbritseva kaksikmembraani enne, kui jõuab oma sihtmärkkohta, ribosoomile. Antud juhul oleks erütromütsiini membraani läbimise võime parem kui seda on josamütsiinil ning sellisel juhul saabub kasvu inhibitsioon antud antibiootikumi kontsentratsioonil kiiremini. Väga tähtsat rolli võivad mängida ka membraanis olevad väljavoolupumbad, millede jaoks võib üks antibiootikum olla parem substraat kui teine. Antud katse puhul oleks josamütsiin väljavoolupumpadele parem substraat kui erütromütsiin. Tänu sellele jõuab josamütsiini rakku vähem.

Kokkuvõtvalt võib antud katsete põhjal öelda, et josamütsiini puhul on peptidüül-tRNA kuhjumine suur ja seega ka oluline inhibitsioonis. Erütromütsiini puhul, aga peptidüül-tRNAde kuhjumine olulist tähtsust ei oma, kuna inhibitsiooni põhjuseks võib olla ribosoomi peatamine. Nagu ka eelpool mainitud, makroliidide esmane mehhanism kasvu inhibeerimiseks tuleneb valgusünteesi blokeerimisest, siis josamütsiini, aga mitte erütromütsiini, toksilisuse põhjus bakteritele on mõjutatud ka peptidüül-tRNAde akumulierumisest bakteri rakku, tänu millele valgusünteesiks vajalike aminoatsüleerumisvõimeliste tRNAde hulk väheneb.

4.1.1 C600(*rap*) tüve õigsuse kontroll ehk C600(*rap*) tüve nakatamine bakteriofaag λ -ga

Raske on anda seletust C600(*rap*) tüve paremale kasvule võrreldes C600 tüvega (Joonis 10 C), kuna C600(*rap*) tüvi omab mutantset Pth-d, mille spetsiifiline aktiivsus on madalam kui Pth(*wt*) valgu aktiivsus. Samuti ei olnud see tüvi josamütsiinile tundlikum kui metsiktüüpi

tüvi (Joonis 10 C). See tähendab, kui Pth üleekspressioon annab josamütsiini suhtes resistentsuse, siis võik eeldada, et alandamine põhjustab ülitundlikust. Sellist olukorda katse tulemused ei näidanud. Mutantse tüve tundlikkus josamütsiini suhtes Pth üleekspressiooniplasmiidi puudumisel oli võrreldav metsiktüüpi omaga. Tüve õigsuse kontrollimiseks nakatati C600(*rap*) rakke λ -faagiga, kuna Pth(*rap*) mutant ei võimalda bakteriofaag λ vegetatiivset kasvu. Nii oli, C600(*rap*) tüvi ei võimaldanud bakteriofaag λ vegetatiivset kasvu samas, kui kontrolliks võetud Pth(*wt*)-d sisaldav C600 tüvi võimaldas.

4.2 Membraanivalgud TolC ja AcrB ja resistentsusmutatsioonide seos antibiootikumiresistentsuse kujunemises

Gram-negatiivsete bakterite, nagu *E. coli*, membraanid sisaldavad antibakteriaalsete ühendite väljutamiseks väljavoolu süsteeme (Paulsen *et al.*, 1997; Thanassi & Hultgren, 2000). Mitme ravimi väljavoolupumbad koosnevad kolmest osast: energiat andev sisemembraani komponent, välismembraanis olev “väljumiskanal” TolC ning neid kahte valku siduv periplasmaatiline valk. *E. coli* peamine väljavoolu pump on AcrA-AcrB-TolC valkude süsteem, mis annab resistentsuse paljudele erinevate keemiliste omadustega ühenditele. Antud katses uuriti resistentsusmutatsioonide ja membraanipumpade omavahelisi seoseid. Selleks deleteeriti kas välismembraani valgu *tolC* või sisemembraani valgu *acrB* geenid bakteriraku kromosoomist, et näha kas ja kuidas see mõjutab tundlikkust erütromütsiini suhtes. Katses kasutati nii metsiktüüpi *E. coli* tüve kui ka ribosoomivalgude L4 ja L22 mutatsiooniga *E. coli* tüvesid L4ery^R, Δ L4ery^R, L22ery^R. Ribosoomivalgud L4 ja L22 on ribosoomi suure subühiku peptiidi väljumise tunneli seinakomponendid. Muutus ükskõik kummas valgus võib põhjustada resistentsust erütromütsiini suhtes. Erütromütsiin, nagu teisedki makroliidid, interakteerub ribosoomi suure subühikuga peptidüültransferaasse keskuse ja polüpeptiidi tunneli läheduses ning blokeerib valgusünteesi. Kuid mutantset L4 valku sisaldavad ribosoomid ei seo enam erütromütsiini ning muudetud L22 valguga ribosoomid neutraliseerivad erütromütsiini sidumise efekti. Eksperimentaalselt on

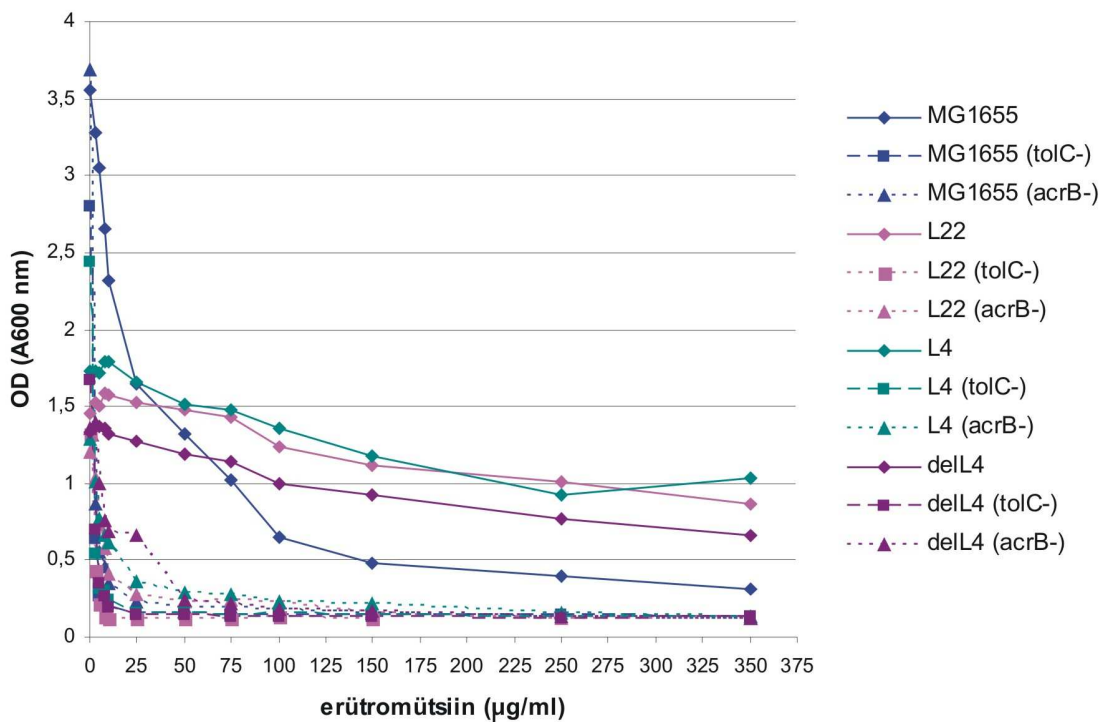
näidatud, et erütromütsiini seondumise kiiruskonstant metsiktüüpi ribosoomide puhul on $1,0 \pm 0,1$ ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$), kuid mutantse L22 ribosoomi valgu puhul 50 korda madalam ehk $0,019 \pm 0,0006$ ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) ning mutantse L4 ribosoomi valgu puhul veelgi madalam, olles L4 puhul $0,0040 \pm 0,0006$ ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) ja ΔL4 puhul $0,0096 \pm 0,001$ ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Makroliidide seondumiskineetika ribosoomide suhtes on oluline makroliidide toimemehhanismi mõistmiseks. Meie koostööpartnerite (Karin Nilsson, Martin Lovmar, Måns Ehrenberg Uppsala Ülikoolist) poolt koostatud mudel ennustas, et L22 ja L4 mutatsioonidest põhjustatud resistentsuse tekkimiseks on oluline, et membraaniga seotud sündmused oleksid kiired. Selle ennustuse testimiseks viisime läbi järgnevalt kirjeldatud katsed.

4.2.1 *acrB* ja *tolC* deletsiooniga *E.coli* tüve koostamine

acrB või *tolC* geenide deletsioon *E. coli* metsiktüüpi MG1655 tüve ning erütromütsiiniresistentse ribosoomivalgu mutantsete *E. coli* tüvede L4ery^{R} , $\Delta\text{L4ery}^{\text{R}}$, L22ery^{R} kromosoomist saavutati nende geenide asendamisega kanamütsiini resistentsusgeeniga vastavalt Kirill A. Datsenko ja Barry L. Wanner'i protokollile (kirjeldatud Materjal ja meetodika peatükis) ning ühe erandi puhul (L4ery^{R} *acrB* geeni asendamine kanamütsiini resistentsusgeeniga) kasutati *acrB* deletsioonimarkeri transduktsiooni P1 faagi abil. Kõiki deletsiooniga tüvesid kontrolliti vastava kromosomaalse ala analüüsimisega PCR meetodil, kasutades amplifitseerimiseks oligonukleotiidseid primereid, millele vastavad komplementaarsed alad jäävad väljapoole deleteeritud DNA ala ning kuna *tolC* geeni pikkus kattub peaaegu kanamütsiini resistentsusgeeni pikkusega, ka kanamütsiini resistentsusgeeni siseseid primereid. PCRil saadi oodatud pikkusega produktid (pikkused toodud peatükis Materjal ja Meetodika).

4.2.2 Bakterite kasvu inhibitsioon erütromütsiiniga, et hinnata membraanipumba valkude AcrB ja TolC ning mutantsete ribosoomivalkude omavahelisi seoseid

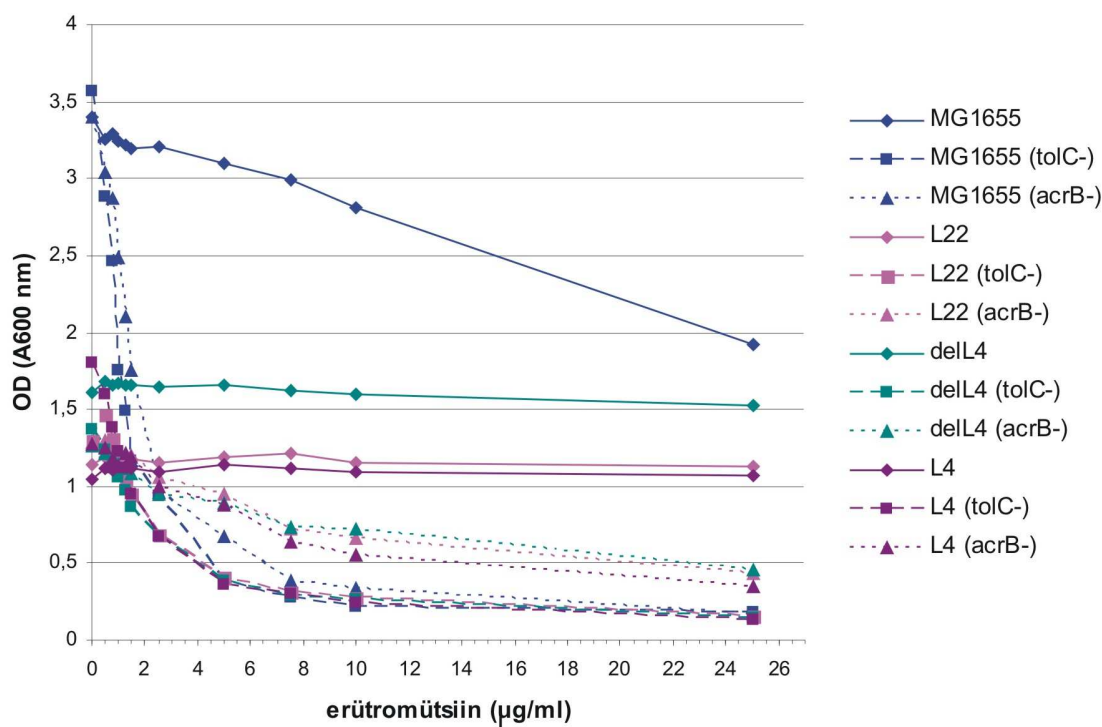
Testiti saadud deletsiooniga tüvede tundlikkust erütromütsiinile. *E. coli* üleöökuultuuridest tehti lahjendused 10 ml LB vedelsöötmesse algtiheduseni OD (A600 nm) 0,1. Kasvatati ning ksponentsiaalse kasvufaasi alguses OD (A600 nm) 0,4-0,6 tehti lahjedus algtiheduseni OD (A600 nm) 0,1 2 ml LB vedelsöötmesse, kuhu oli bakterite kasvu inhibeerimiseks lisatud erütromütsiini kontsentratsioonidel 0-350 µg/ml või 0-25 µg/ml. Peale 4 h bakterikultuuri inkubeerimist 37 °C juures mõõdeti bakterirakkude tihedus OD (A600 nm). Saadi inhibitsioonikõverad (joonis 12 ja 13), mis näitavad, et lähtetüvede ja deletsiooniga tüvede erütromütsiini tundlikkus on erinev. Algsed tüved on erütromütsiini suhtes märkimisväärselt resistentsemad kui membraanivalkude TolC ja AcrB deletandid, mis näitavad suurt erütromütsiinitundlikkuse tõusu. See näitab, et uuritav väljavoolupump on *E. coli*'s oluline makroliidide resistentsuse põhjustaja. Erütromütsiin on neile mõju avaldanud juba väga madalatel kontsentratsioonidel. Tänu sellele koonduvad joonisel 12 deletsiooniga tüved ühte punkti (katkendlikud jooned) ning raske on vahet teha kumma geeni, kas AcrB või TolC, deletsioon muudab rakud erütromütsiini suhtes tundlikumaks. Nagu oodatud mõjutab erütromütsiin ribosoomivalgu mutantsete *E. coli* tüvede L4ery^R, ΔL4ery^R, L22 ery^R kasvu vähem (roheline, roosa, tumelilla pidev joon), kuna nendes tüvedes tehtud mutatsioonid vastavalt L4 või L22 ribosoomivalgus muudavad rakud erütromütsiini suhtes resistentseteks.



Joonis 12: Bakterite kasvu inhibitsioon erütromütsiiniga. *E. coli* üleöökultuuridest tehti lahjendused 10 ml LB vedelsöötmesse algtiheduseni OD (A600 nm) 0,1. Eksponentsiaalse kasvufaasi alguses OD (A600 nm) 0,4-0,6 tehti lahjendus algtiheduseni OD (A600 nm) 0,1 2 ml LB vedelsöötmesse, kuhu oli bakterite kasvu inhibeerimiseks lisatud erütromütsiini. Peale 4 h bakterikultuuri inkubeerimist 37 °C juures, mõõdeti bakterirakkude tihedus OD (A600 nm). Erütromütsiini lisamine on mõjunud metsiktüüpi *E. coli* bakteritüve MG1655 ja mutantsete *E. coli* tüvede L4ery^R, ΔL4ery^R, L22 ery^R *acrB* ja *tolC* deletantide kasvule pärssivalt juba madalate kontsentratsioonide juures. Vähesel määral on erütromütsiin mõjutanud *E. coli* tüvede L4ery^R, ΔL4ery^R, L22 ery^R kasvu. Katsetulemused on esitatud vähemalt kolme katse keskmise tulemusena.

Inhibitsioon on selgelt näha ka metsiktüüpi *E. coli* MG1655 rakkudes (tumesinine pidevjoon), mis madalate erütromütsiini kontsentratsioonide puhul on saavutanud suurema kasvu, kuid kõrgemate kontsentratsioonide juures langeb erütromütsiiniresistentsete tüvedega võrreldes madalamale tasemele. Samas talub metsiktüüpi tüvi erütromütsiini paremini kui *tolC* ja *acrB* deletsiooniga bakteritüved.

Selleks, et näha, kas kasv on inhibeeritud *tolC* ja *acrB* deletsiooni puhul samaväärselt või esineb nende vahel erinevusi, muudeti erütromütsiini kontsentratsioone nii, et need jääksid vahemikku 0-25 µg/ml (joonis 13).



Joonis 13: Bakterite kasvu inhibitsioon erütromütsiiniga. *E. coli* üleöökultuuridest tehti lahjendused 10 ml LB vedelsöötmesse algtiheduseni OD (A600 nm) 0,1. Eksponeentsiaalse kasvufaasi alguses OD (A600 nm) 0,4-0,6 tehti lahjedus algtiheduseni OD (A600 nm) 0,1 2 ml LB vedelsöötmesse, kuhu oli bakterite kasvu inhibeerimiseks lisatud erütromütsiini. Peale 4 h bakterikultuuri inkubeerimist 37 °C juures, mõõdeti bakterirakkude tihedus OD (A600 nm). Erütromütsiini lisamine on inhibeerinud metsiktüüpi *E. coli* bakteritüve MG1655 ja mutantsete *E. coli* tüvede L4ery^R, ΔL4ery^R, L22 ery^R *acrB* ja *tolC* deletantide kasvule. Antud erütromütsiini kontsentratsioonid ei ole mõjutanud *E. coli* tüvede L4ery^R, ΔL4ery^R, L22 ery^R kasvu. Katsetulemused on esitatud vähemalt kolme katse keskmise tulemusena.

Üldjoontes jäi olukord samaks nagu näidatud joonis 12 puhul, kuid nüüd tuli esile *tolC* ja *acrB* deletsiooni erinevus. Nagu jooniselt näha muudab välismembraani valgu geeni *tolC* deleteerimine bakterirakud erütromütsiini suhtes tundlikumaks võrreldes bakterirakkudega, kus oli deleteeritud sisemembraani valgu geen *acrB*. Sellest saab järeldada, et TolC on erütromütsiini resistentsuse tekkimisel olulisem komponent kui AcrB. See on seletatav

asjaoluga, et TolC võiks kuuluda peale AcrAB-TolC süsteemi ka mõnda teise väljavoolupumba süsteemi. Sel juhul teevad TolC valgud AcrB valgu puudumisel koostööd mõne teise membraanipumbasüsteemi komponentidega.

Katsed näitavad, et kui *tolC* geen puudub, siis sellises geneetilises tagapõhjas ribosoomivalkude mutatsioonid resistentsust ei anna. See on kooskõlaline ka mutantsetele ribosoomidele erütromütsiini seondumise kineetilise mudeliga, mille kohaselt metsiktüüpi ja erütromütsiiniresistentsete tüvede vahel olev erinevus puudub tüvedes, kus puudub *tolC* geen.

5. ARUTELU

Bakterite kasvu on võimalik inhibeerida mitmeti, kasutades erinevatele rakuosadele või rakumehhanismidele mõjuvaid ravimeid.

Käesoleva töö eemärgiks oli uurida makroliidide mõju bakterite kasvule läbi kahe vaatenurga: esiteks kui makroliid jõuab oma sihtmärk-kohani rakus, kas makroliidi põhjustatud peptidüül-tRNAde kuhjumine ja sellest tulenev vabade tRNAde ammendumine võib olla oluline makroliidide toimemehhanism ja kui palju see võiks inhibeerida rakkude kasvu. Teiseks, kui palju mõjutab makroliidide resistentsust mitme ravimi väljavoolupumbad kui resistentsust andev mehhanism ning selle omavaheline seos ribosoomivalkude L4 ja L22 resistentsusmutatsioonidega. Makroliidide sihtmärk bakterirakus on ribosoom. Seondudes 70 S ribosoomi suurele subühikule (50 S) põhjustavad makroliidid peptidüül-tRNAde dissotseerumist ribosoomilt translatsiooni elongatsiooni käigus ehk “*drop-off*” (Menninger & Otto, 1982). Käesoleva töö esimeses katselises osas kasutati makroliidsete antibiootikumide võimaliku toimemehhanismi uurimiseks kahte makroliidset antibiootikumi, josamütsiini ja erütromütsiini, mis küll mõlemad põhjustavad peptidüül-tRNAde “*drop-off*” ribosoomilt, kuid teevad seda läbi erineva mehhanismi. Josamütsiin on 16-lülilise laktoonringiga makroliid, mis seondudes peptidüültransferaasse tsentri läheduses, ei võimalda üle kolme aminohappeliste peptiidide sünteesi. Erütromütsiini, mis on 14-lülilise laktoonringiga makroliid, seondumiskoha ja peptidüültransferaasse tsentri vaheline kaugus võimaldab sünteesida pikemaid peptiide (6-8 aminohappe jäägilisi). Seostudes ribosoomi suurele subühikule peptiiditunneli algusesse (Hansen *et al.*, 2002) inhibeerivad makroliidid valgusünteesi, tõkestades peptiidahela edasise kasvamise. Seetõttu stimuleerivad makroliidid peptidüül-tRNAde dissotsatsiooni

ribosoomilt (Menninger & Otto, 1982; Tenson *et al.*, 2003). Siit võib tuleneda makroliidide põhjustatud kasvuinhibitsiooni sekundaarne efekt – suur hulk tRNAsid on viidud peptidüül-tRNA vormi, mida translatsioonis enam efektiivselt kasutada ei saa. Järgneb bakterirakkude kasvu inhibitsioon.

Nagu kirjeldatud, inhibeerivad josamütsiin ja erütromütsiin bakterite kasvu (joonis 10, 11). Rakuvabas süsteemis on näidatud, et josamütsiin seondub ribosoomiga stabiilsemalt kui erütromütsiin – josamütsiini puhul toimub „*drop-off*” palju kiiremini kui josamütsiini enda dissotseerumine ribosoomilt. Samas erütromütsiin seondub ribosoomiga ja vabaneb ribosoomilt kiiremini (Lovmar *et al.*, 2004). Järelikult küllastava kontsentratsiooni korral täispikkade valkude süntees on peatatud josamütsiini puhul, kuid erütromütsiini puhul mitte. Erütromütsiini toime elusatele bakterirakkudele näib olevat tugevam kui josamütsiini toime, kuna nagu näha joonistel 10 ja 11 on erütromütsiin sama aja jooksul inkubeeritud rakukultuure inhibeerinud madalama kontsentratsiooni juures. Katses kasutatud *E. coli* metsiktüüpi C600 tüve puhul on samaväärne josamütsiini inhibitsioon näha ligikaudu viis korda kõrgema kontsentratsiooni juures. See võib tuleneda bakterirakku ümbritseva membraani olemasolust. Erinevad ained difundeeruvad läbi membraani erineva efektiivsusega. Bakterirakkudes on olemas mehhanism enneaegselt dissotseerunud peptidüül-tRNAde taaskasutamiseks. Peptidüül-tRNA hüdrolaas ehk Pth on oluline ensüüm tRNAde normaalseks taaskasutamiseks *E. coli* rakkudes. Hüdroolüüsides peptiidi ja tRNA vahelist estersidet, vabastab peptiidi tRNA küljest. Seejärel on tRNA taas aminoatsüleerumisvõimeline ning võib osaleda translatsiooniprotsessis. Makroliidide toimet inhibeerida valgusünteesi tänu peptidüül-tRNAde kuhjumisele rakus hinnati kasutades ensüümi Pth. Pth üleekspressiooniplasmiid viidi *E. coli* rakkudesse, et rakul oleks normaalsest rohkem Pth-d võitlemaks makroliidide tekitatud aminoatsüleerumisvõimeliste tRNAde nälja vastu. Tõepoolest, Pth-d üleekspresserivate tüvedes oli bakterikultuuride kasv märgatavalt parem võrrelduna Pth-d mitteüleekspresserivate rakkudega. Selline olukord kehtis siiski vaid josamütsiini puhul, kuna katsetes erütromütsiiniga polnud olulisi muutusi märgata. Seda võiks selgitada asjaoluga, et erütromütsiin suudab kiiresti kõik ribosoomid pidevalt küllastada ja

valgusünteesi peatada. Sellisel juhul ei omaks Pth aktiivsus erütromütsiini puhul mõju. Nagu eelpool mainitud, on rakuvabas süsteemis näidatud, et josamütsiin seondub ribosoomidega stabiilsemalt kui erütromütsiin ning on oletatud, et kui erütromütsiini kontsentratsioon on kõikide ribosoomide küllastamiseks piisav, jääb siiski umbes 50 % ribosoomidest võimeliseks sünteesima pikki peptiide (Lovmar *et al.*, 2004). Nagu eelpool mainitud võib *in vivo* süsteemis antibiootikumide toimemehhanismi mõjutada ka mitmeid lisategureid nagu näiteks antibiootikumi rakku jõudmine. Siin on oluline roll membraani permeaablusel konkreetsele antibiootikumile. Gram-negatiivse raku puhul peab makroliid läbima rakku ümbritseva kaksikmembraani enne, kui jõuab oma sihtmärkkohta, ribosoomile. Võib olla, et üks antibiootikum läbib membraani edukamalt kui teine. Antud juhul võiks erütromütsiini membraani läbimise võime olla parem kui josamütsiinil ning sellisel juhul saab teda rakku kiiremini suurem kogus, sellega seoses ka tugevam kasvu inhibitsioon antud antibiootikumi kontsentratsioonil. Samas võivad rolli mängida ka raku membraanis olevad antibiootikume rakust väljutavad väljavoolupumbad, mille jaoks võib üks antibiootikum olla parem substraat kui teine. Nende võimaluste kohta andmed puuduvad. Samas on näidatud ka, et Pth aktiivsus sõltub peptiidahela pikkusest. Väidetavalt toimub Pth ja peptidüül-tRNA maksimaalne interaktsioon siis, kui peptiidi ahela pikkus on 3-4 aminohappe jääki (Shiloach *et al.*, 1975). Josamütsiin põhjustab 2-4 aminohappejäägi pikkuste peptidüül-tRNAde dissotsiatsiooni ning erütromütsiin lubab moodustuda 6-8 aminohappe pikkustel peptiididel enne, kui ribosoom peatub ja toimub „drop-off” (Tenson *et al.*, 2003). Selle kohaselt oleks josamütsiini tekitatud peptidüül-tRNAde sobivaks substraadiks Pth-le, kuid erütromütsiini põhjustatud 6-8 aminohappe pikkuste peptidüül-tRNAde suhtes Pth aktiivsus langeks.

Antud katsete puhul võib lühidalt järeldada, et erütromütsiini puhul, kus põhjustatud kasvuinhibitsioon polnud komplementeeritav Pth üleekspressiooniga, tuleneb inhibitsioon põhiliselt ribosoomi peatamisest. Josamütsiini puhul bakterite kasv taastus mõnevõrra Pth üleekspressiooniga ning kasvu inhibitsioon võib põhjustatud olla ka peptidüül-tRNAde kuhjumisest.

Käesoleva töö antud katses kasutati kahte *E. coli* tüve: metsiktüüpi Pth-ga C600 ning defektse Pth-ga C600(*rap*), mille Pth aktiivsus on madalam kui metsiktüüpi Pth-1 (Cruz-Vera *et al.*, 2000). Seega peaks C600(*rap*) tüve kasv olema kehvem. Kuna aga katse tulemused näitavad, et makroliidi mõjul kasvanud kultuuride kasv ei erine oluliselt või on isegi mutantse ensüümiga tüve kasv parem, jääb mulje, et tüvede vahel esineb erinevus ribosoomide küllastamisel makroliididega – C600(*rap*) tüve puhul jääks osa ribosoomi vabaks, mis võimaldab mõningast valgusünteesi jätkumist. Samas näitavad kasvukõverad C600(*rap*) tüvele edukamat kasvu ka antibiootikumi puudumisel. Järelikult peavad olema selles tüves mehhanismid, mis aitavad bakteritel kasvada vaatamata puudulikule Pth-le.

Selleks, et makroliid saaks raku eluvõimet pärssida, peab ta kõigepealt jõudma raku ja sinna ka püsima jääma, ilma et teda rakust väljutataks ning seejärel on makroliidil võimalus ribosoomiga seondumiseks. Gram-negatiivsetel bakteritel, nagu eelpool mainitud, ümbritseb raku kaksikmembraan, mille vahele jääb veel periplasmaatiline ala. Antibiootikumid saavad raku siseneda tänu läbi membraani toimuvale difusioonile. Selle tõttu on antibiootikumide inhibeeriv toime Gram-positiivsete bakterite suhtes tugevam, kuna läbida tuleb vaid üks membraan. Gram-negatiivsete bakterite membraanides on lisaks olemas veel süsteemid, mis püüavad rakule toksilise aine kinni ning väljutavad selle tagasi väliskeskkonda, ilma, et see kahjulik aine saaks üldse mõju avaldama hakatagi. Sellist olukorda arvesse võttes uuriti ühe põhilise *E. coli* rakus töötava väljavoolupumba võimet tagada resistentsust erütromütsiinile. Kirjanduses on palju kirjeldatud *E. coli*'le mitme ravimi väljavoolupumpa AcrAB-TolC süsteemi olemasolu. On näidatud, et see väljavoolupump omab laia substraadispetsiifikat, olles võimeline rakust väljutama väga erinevaid aineid (Sulavik *et al.*, 2001).

Selleks, et uurida AcrAB-TolC võimet tagada resistentsust makroliidide suhtes, tehti käesolevas töös erinevate omadustega bakteritüvedesse kahte tüüpi mitmeravimi väljavoolupumba mutatsioone. Esiteks deleteeriti selle pumba sisemembraani komponenti AcrB-d kodeeriv geen. Teist tüüpi mutatsiooni puhul deleteeriti sama pumba välismembraani komponent TolC-d kodeeriv geen. Testiti saadud tüvede tundlikkust makroliidide suhtes, kasutades ühte enim tuntud makroliidi erütromüsiini, mis nagu

eelpool kirjeldatud, peab kasvu inhibitoorse toime avaldamiseks jõudma ribosoomile. AcrB ja TolC tähtsust resistentsuse tagamisel uuriti seoses erütromütsiini resistentsusmutatsiooniga ribosoomivalkudes L4 ja L22. Selleks kasutati vastavaid mutantseid tüvesid - *E. coli* tüved L4ery^R, ΔL4ery^R, L22ery^R. Ribosoomivalgud L4 ja L22 on ribosoomi suure subühiku peptiidi väljumise tunneli seinakomponendid. Ka käesoleva töö katsed näitasid, et need erütromütsiiniresistentsed tüved polnud erütromütsiini suhtes tundlikud, kuna nende kasv oli peaaegu mõjutamatu erütromütsiini poolt (Joonis 11). Kõrgetel erütromütsiini kontsentratsioonidel oli metsiktüüpi *E. coli* kasv märksa madalamal tasemel. Et näha, kas väljavoolupumba rikkumine mõjutab selliste resistentsete tüvede kasvu, lülitati L4ery^R, ΔL4ery^R, L22ery^R tüvedes samuti, nagu seda tehti metsiktüüpi *E. coli* tüves, välja *tolC* ja *acrB* geen. Metsiktüüpi *E. coli* tüves, mis juba niigi on tundlik erütromütsiini suhtes, põhjustas nii *tolC* kui ka *acrB* deletsioon suurt tundlikkuse tõusu erütromütsiini suhtes. Samasugune kasvu inhibitsioon toimus ka erütromütsiiniresistentsete mutantsete tüvede puhul. Kõikide tüvede mõlemad geeni deletandid on kõrgetel erütromütsiini kontsentratsioonidel omandanud sama tundlikkuse taseme, kuid vähendades erütromütsiini kontsentratsioone oli näha erinevus. Geneetilises tagapõhjas, kus kromosoomist puudus *tolC* geen, ribosoomivalkude mutatsioonid erütromütsiini resistentsust ei anna. Samas *acrB* deletandid olid mõningal määral *tolC* deletantidest resistentsemad. Asjaolust, et *tolC* deletant oli tundlikum erütromütsiini suhtes kui *acrB* deletant ja võrdse inhibitsiooni taseme saavutamiseks oli *acrB* deletandi puhul vajalik kõrgem erütromütsiini kontsentratsioon (joonised 12 ja 13), võib TolC ilmselt funktsioneerida ka AcrB-st sõtumatult. Sellist ideed, et TolC võib funktsioneerida ka ilma AcrB-ta ja anda panust resistentsuse tekkeks, on kirjeldatud ka varem (Fralick, 1996). Järelikult resistentsuse avaldamiseks peavad membraaniga seotud protsessid olema kiired. AcrAB-TolC pumba olemasolul makroliidid pumbatakse rakust kiiresti välja. Sellises olukorras on rakkude tundlikkuses makroliidide suhtes oluline makroliidi seondumiskineetika ribosoomile. Sellepärast ongi kasv inhibeeritud metsiktüüpi ribosoomide puhul, kus erütromütsiini seondumise kiiruskonstant on 15 korda kõrgem kui mutantse L22 ribosoomivalguga ribosoomi puhul ja 50 korda kõrgem kui L4 mutatsiooni puhul. Samas geneetilises tagapõhjas, kus kromosoomist oli deleteeritud *acrB* geen,

väljavoolupump töötab, kuid vähemal määral. Ribosoomivalkude mutatsioonide efekt oli näha vaid mõningal määral ning metsiktüüpi tüve *acrB* deletandi kasv oli inhibeeritud samal tasemel nagu *tolC* deletantidel. Kuid *tolC* deletantide puhul AcrAB-TolC pump on ebaefektiivne. Järelikult määrab viimasel juhul erütromütsiiniga seondunud ribosoomide fraktsiooni suuruse, millele järgnevalt bakteriraku kasvukiirus vähenema hakkab, pigem erütromütsiini rakku sisenemise kiirus, mitte erütromütsiini ribosoomile seondmise kineetika.

Sellest, et membraanis paikneva reistentsust tagava väljavoolupumba rikkumine muutis isegi erütromütsiiniresistentsed tüved erütromütsiini suhtes tundlikuks, võib järeldada, et see väljavoolupump on antibiootikumiresistentsuse tekkimisel väga oluline komponent. Rikutud väljavoolupump pole võimeline läbi rakumembraani rakku difundeerunud antibiootikumi väljutama. Erütromütsiin saab edasi liikuda ribosoomini ja blokeerida neil toimuvat valgusünteesi. Seega antibiootikumi rakku sisenemise kiirust kompenseerib väljavoolupumpade olemasolu. Olukorras, kus erütromütsiini rakust välja ei pumbata saab teda lõpuks rakku koguses, mis on võimeline siduma nii palju ribosome, et järgneb bakterite kasvu inhibitsioon.

KOKKUVÕTE

Kirjandusest on teada, et makroliidid põhjustavad *Escherichia coli* rakkudes valgusünteesi inhibitsiooni ning raku kasvu peatumist. On võimalik, et ribosoomidele seondunud makroliidide põhjustatud peptidüül-tRNAde kuhjumisel raku vabade tRNAde varu ammendub. tRNAde normaalse taaskasutamise *E. coli* rakkudes tagab ensüüm peptidüül-tRNA hüdrolaas. Selleks, et makroliid pääseks ribosoomile, peab ta esmalt difundeerima läbi raku membraani. Gram-negatiivsete bakterite rakumembraanides on aga väljavoolu pumbad, mis pumpavad välja väga erinevaid rakule toksilisi aineid. Seal hulgas ka makroliide. Üks olulisemaid pumpasid on AcrAB-TolC süsteem. Membraani läbitavus ja läbi pumpade rakust väljutamise kiirus võivad olla olulised erütromütsiini resistentsuse tekkimisel ribosoomivalkude L4 ja L22 resistentsusmutatsiooniga tüvedes.

Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida kahte aspekti makroliidide põhjustatud bakterite kasvu inhibitsioonis: josamütsiini ja erütromütsiini põhjustatud bakterite kasvu inhibitsiooni ja Pth üleekspressiooni põhjal hinnata peptidüül-tRNAde kuhjumise rolli ning membraanipumpade ja resistentsusmutatsioonide omavahelist seost resistentsuse kujunemisel.

Läbiviidud eksperimentide tulemused võib kokku võtta järgnevalt:

- 1) Josamütsiini indutseeritud peptidüül-tRNAde „drop-off”-i mõju uurimine bakterite kasvule näitas, et tüvedes, kus toimus Pth üleekspressioon, oli bakterite kasv josamütsiini juuresolekul märksa edukam. Pth üleekspressiooniplasmiidi mitte sisaldavate tüvede kasv oli josamütsiinile tundlikum.
- 2) Samas erütromütsiini suhtes Pth üleekspressioon resistentsust ei andnud – kõigi tüvede kasv oli samaväärselt inhibeeritud.

Järelikult erütromütsiini põhjustatud kasvu inhibitsioon tuleneb otseselt ribosoomi peatamisest. Josamütsiini toksilisuse põhjus bakteritele on mõjutatud peale ribosoomi peatamise ka peptidüül-tRNAde akumulatsioonist bakteri raku.

- 3) Resistentsusmutatsioonide ja membraanipumpade omavaheliste seoste uurimiseks tehtud katsed näitasid, et ribosoomivalkude L4 ja L22 mutantsed tüved omasid erütromütsiinile resistentsust vaid siis, kui rakumembraanis oli olemas terviklik AcrAB-TolC väljavoolupumba süsteem. Kromosoomist *tolC* või *acrB* geeni deleteerimine muutis kõik katses kasutatud *E. coli* tüved erütromütsiini suhtes tundlikuks. Siiski *acrB* deleteerimisel jäi mõningasel määral ribosoomide mutatsioonide efekt näha, järelikult polnud pumba töö täielikult häiritud. Sellest, et *tolC* deletsioon muutis tundlikuks ka erütromütsiinile resistentsed bakteritüved, võib järeldada, et erütromütsiiniresistentsuse tekkeks peavad membraaniga seotud sündmused olema kiired. AcrAB-TolC pumba olemasolul pumbatakse erütromütsiin kiiresti välja ning raku tundlikkuse erütromütsiini suhtes määrab erütromütsiini seondumiskineetika ribosoomile. *tolC* puudumisel antibiootikumi rakust välja ei pumbata ning nüüd on oluline raku kasvu inhibeerimiseks, kui kiiresti saab erütromütsiini rakku sellises koguses, mis suudaks hakata valgusünteesi pärssima.
- 4) AcrAB-TolC süsteemis olulisem komponent näib olevat TolC, mille inaktiveerimise puhul oli bakterite tundlikus erütromütsiinile suurem kui AcrB inaktiveerimisel.

SUMMARY

The role of peptidyl-tRNA accumulation and membrane pumps in the inhibition of cell growth by macrolide antibiotics

Eliisa Lukk

It is known that macrolides cause the inhibition of protein biosynthesis that leads to the reduction of cell growth. It has been suggested that these compounds induce dissociation of peptidyl-tRNA from the ribosome. Accumulation of the peptidyl-tRNA causes depletion of the free tRNA pool. The normal recycling of tRNAs. in *Escherichia coli* is assured by the enzyme peptidyl-tRNA hydrolase (Pth). In order to bind to the the ribosome the macrolide has to first diffuse through the cell membrane. Gram-negative bacteria are characterized by a protective double-membrane system and have transmembrane efflux-pumps. These pumps determine resistance to many toxic compounds, including macrolides. In *E. coli* the AcrAB-TolC efflux-pump plays a major role in resistance to antibiotic.

The aim of this study was to investigate two aspects of bacterial growth inhibition caused by macrolides: first, to determine the role of peptidyl-tRNA accumulation in the inhibition of cell growth caused by josamycin and erythromycin and second, to estimate the relationship between membrane pumps and resistance mutations.

The results of this study are:

- 1) Pth overexpression gives resistance to josamycin.
- 2) The same experiment with erythromycin did not give the same results – the Pth overexpression did not provide resistance to erythromycin

Therefore, the growth inhibition caused by erythromycin is caused by direct inhibition of ribosomes. The toxicity of josamycin to bacterial cells is caused by the inhibition of ribosomes and also by the accumulation of peptidyl-tRNAs inside the bacterial cell.

- 3) Strains with mutant L4 and L22 ribosomal proteins were resistant to erythromycin only if the cell membrane contained an intact AcrAB-TolC efflux pump system. The L4 and L22 mutations did not confer erythromycin resistance in the *tolC* background. Thus, it can be concluded that to ensure the resistance to erythromycin, the membrane-involved processes must be rapid. There is a lack of difference among the wild-type and mutants in the *tolC* deletion-mutant strains.
- 4) In the AcrAB-TolC system, the TolC component seems to be the most important, because in the case of *tolC* mutants, the sensitivity of bacteria to erythromycin is greater as compared to the *acrB* knock-out strains.

KASUTATUD KIRJANDUS

Aires, J. R. & Nikaido, H. (2005). Aminoglycosides are captured from both periplasm and cytoplasm by the AcrD multidrug efflux transporter of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **187**, 1923-1929.

Arevalo, M. A., Tejedor, F., Polo, F. & Ballesta, J. P. (1988). Protein components of the erythromycin binding site in bacterial ribosomes. *J Biol Chem* **263**, 58-63.

Caplan, A. B. & Menninger, J. R. (1979). Tests of the ribosomal editing hypothesis: amino acid starvation differentially enhances the dissociation of peptidyl-tRNA from the ribosome. *J Mol Biol* **134**, 621-637.

Chittum, H. S. & Champney, W. S. (1994). Ribosomal protein gene sequence changes in erythromycin-resistant mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **176**, 6192-6198.

Credito, K. L., Lin, G., Pankuch, G. A., Bajaksouzian, S., Jacobs, M. R. & Appelbaum, P. C. (2001). Susceptibilities of *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* to ABT-773 compared to their susceptibilities to 11 other agents. *Antimicrob Agents Chemother* **45**, 67-72.

Cruz-Vera, L. R., Toledo, I., Hernandez-Sanchez, J. & Guarneros, G. (2000). Molecular basis for the temperature sensitivity of *Escherichia coli* pth(Ts). *J Bacteriol* **182**, 1523-1528.

Cruz-Vera, L. R., Hernandez-Ramon, E., Perez-Zamorano, B. & Guarneros, G. (2003). The rate of peptidyl-tRNA dissociation from the ribosome during minigene expression depends on the nature of the last decoding interaction. *J Biol Chem* **278**, 26065-26070.

Datsenko, K. A. & Wanner, B. L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 6640-6645.

Dincbas, V., Heurgue-Hamard, V., Buckingham, R. H., Karimi, R. & Ehrenberg, M. (1999). Shutdown in protein synthesis due to the expression of mini-genes in bacteria. *J Mol Biol* **291**, 745-759.

Dutka, S., Meinnel, T., Lazennec, C., Mechulam, Y. & Blanquet, S. (1993). Role of the 1-72 base pair in tRNAs for the activity of *Escherichia coli* peptidyl-tRNA hydrolase. *Nucleic Acids Res* **21**, 4025-4030.

- Fralick, J. A. (1996).** Evidence that TolC is required for functioning of the Mar/AcrAB efflux pump of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **178**, 5803-5805.
- Gabashvili, I. S., Gregory, S. T., Valle, M., Grassucci, R., Worbs, M., Wahl, M. C., Dahlberg, A. E. & Frank, J. (2001).** The polypeptide tunnel system in the ribosome and its gating in erythromycin resistance mutants of L4 and L22. *Mol Cell* **8**, 181-188.
- Guarneros, G., Machado, G., Guzman, P. & Garay, E. (1987).** Genetic and physical location of the *Escherichia coli* rap locus, which is essential for growth of bacteriophage lambda. *J Bacteriol* **169**, 5188-5192.
- Hansen, J. L., Ippolito, J. A., Ban, N., Nissen, P., Moore, P. B. & Steitz, T. A. (2002).** The structures of four macrolide antibiotics bound to the large ribosomal subunit. *Mol Cell* **10**, 117-128.
- Hansen, L. H., Mauvais, P. & Douthwaite, S. (1999).** The macrolide-ketolide antibiotic binding site is formed by structures in domains II and V of 23S ribosomal RNA. *Mol Microbiol* **31**, 623-631.
- Herold, M. & Nierhaus, K. H. (1987).** Incorporation of six additional proteins to complete the assembly map of the 50 S subunit from *Escherichia coli* ribosomes. *J Biol Chem* **262**, 8826-8833.
- Heurgue-Hamard, V., Mora, L., Guarneros, G. & Buckingham, R. H. (1996).** The growth defect in *Escherichia coli* deficient in peptidyl-tRNA hydrolase is due to starvation for Lys-tRNA(Lys). *Embo J* **15**, 2826-2833.
- Heurgue-Hamard, V., Dinibas, V., Buckingham, R. H. & Ehrenberg, M. (2000).** Origins of minigene-dependent growth inhibition in bacterial cells. *Embo J* **19**, 2701-2709.
- Higgins, C. F. (2007).** Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters. *Nature* **446**, 749-757.
- Koronakis, V., Sharff, A., Koronakis, E., Luisi, B. & Hughes, C. (2000).** Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export. *Nature* **405**, 914-919.
- Kurland, C. G. & Ehrenberg, M. (1985).** Constraints on the accuracy of messenger RNA movement. *Q Rev Biophys* **18**, 423-450.
- Leclercq, R. (2002).** Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. *Clin Infect Dis* **34**, 482-492.
- Leonard, G. D., Fojo, T. & Bates, S. E. (2003).** The role of ABC transporters in clinical practice. *Oncologist* **8**, 411-424.

- Li, X. Z., Livermore, D. M. & Nikaido, H. (1994).** Role of efflux pump(s) in intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to tetracycline, chloramphenicol, and norfloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* **38**, 1732-1741.
- Lomovskaya, O., Zgurskaya, H. I., Totrov, M. & Watkins, W. J. (2007).** Waltzing transporters and 'the dance macabre' between humans and bacteria. *Nat Rev Drug Discov* **6**, 56-65.
- Lovmar, M., Tenson, T. & Ehrenberg, M. (2004).** Kinetics of macrolide action: the josamycin and erythromycin cases. *J Biol Chem* **279**, 53506-53515.
- Menninger, J. R. (1976).** Peptidyl transfer RNA dissociates during protein synthesis from ribosomes of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **251**, 3392-3398.
- Menninger, J. R. & Otto, D. P. (1982).** Erythromycin, carbomycin, and spiramycin inhibit protein synthesis by stimulating the dissociation of peptidyl-tRNA from ribosomes. *Antimicrob Agents Chemother* **21**, 811-818.
- Menninger, J. R., Coleman, R. A. & Tsai, L. N. (1994).** Erythromycin, lincosamides, peptidyl-tRNA dissociation, and ribosome editing. *Mol Gen Genet* **243**, 225-233.
- Misra, R. & Reeves, P. R. (1987).** Role of micF in the tolC-mediated regulation of OmpF, a major outer membrane protein of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **169**, 4722-4730.
- Morona, R. & Reeves, P. (1982).** The tolC locus of *Escherichia coli* affects the expression of three major outer membrane proteins. *J Bacteriol* **150**, 1016-1023.
- Murakami, S., Nakashima, R., Yamashita, E. & Yamaguchi, A. (2002).** Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB. *Nature* **419**, 587-593.
- Murakami, S. & Yamaguchi, A. (2003).** Multidrug-exporting secondary transporters. *Curr Opin Struct Biol* **13**, 443-452.
- Murakami, S., Nakashima, R., Yamashita, E., Matsumoto, T. & Yamaguchi, A. (2006).** Crystal structures of a multidrug transporter reveal a functionally rotating mechanism. *Nature* **443**, 173-179.
- Nagel de Zwaig, R. & Luria, S. E. (1967).** Genetics and physiology of colicin-tolerant mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **94**, 1112-1123.
- Ng, L. K., Martin, I., Liu, G. & Bryden, L. (2002).** Mutation in 23S rRNA associated with macrolide resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob Agents Chemother* **46**, 3020-3025.

- Nikaido, H., Basina, M., Nguyen, V. & Rosenberg, E. Y. (1998).** Multidrug efflux pump AcrAB of *Salmonella typhimurium* excretes only those beta-lactam antibiotics containing lipophilic side chains. *J Bacteriol* **180**, 4686-4692.
- Nissen, P., Hansen, J., Ban, N., Moore, P. B. & Steitz, T. A. (2000).** The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science* **289**, 920-930.
- Okusu, H., Ma, D. & Nikaido, H. (1996).** AcrAB efflux pump plays a major role in the antibiotic resistance phenotype of *Escherichia coli* multiple-antibiotic-resistance (Mar) mutants. *J Bacteriol* **178**, 306-308.
- Ontiveros, C., Valadez, J. G., Hernandez, J. & Guarneros, G. (1997).** Inhibition of *Escherichia coli* protein synthesis by abortive translation of phage lambda minigenes. *J Mol Biol* **269**, 167-175.
- Otaka, T. & Kaji, A. (1975).** Release of (oligo) peptidyl-tRNA from ribosomes by erythromycin A. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**, 2649-2652.
- Paulsen, I. T., Park, J. H., Choi, P. S. & Saier, M. H., Jr. (1997).** A family of gram-negative bacterial outer membrane factors that function in the export of proteins, carbohydrates, drugs and heavy metals from gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Lett* **156**, 1-8.
- Poole, K. (2001).** Multidrug resistance in Gram-negative bacteria. *Curr Opin Microbiol* **4**, 500-508.
- Poole, K. (2005).** Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother* **56**, 20-51.
- Poulsen, S. M., Kofoed, C. & Vester, B. (2000).** Inhibition of the ribosomal peptidyl transferase reaction by the mycarose moiety of the antibiotics carbomycin, spiramycin and tylosin. *J Mol Biol* **304**, 471-481.
- Rello, J. (2005).** Bench-to-bedside review: Therapeutic options and issues in the management of ventilator-associated bacterial pneumonia. *Crit Care* **9**, 259-265.
- Retsema, J. & Fu, W. (2001).** Macrolides: structures and microbial targets. *Int J Antimicrob Agents* **18 Suppl 1**, S3-10.
- Schlunzen, F., Zarivach, R., Harms, J., Bashan, A., Tocilj, A., Albrecht, R., Yonath, A. & Franceschi, F. (2001).** Structural basis for the interaction of antibiotics with the peptidyl transferase centre in eubacteria. *Nature* **413**, 814-821.

Schlunzen, F., Harms, J. M., Franceschi, F., Hansen, H. A., Bartels, H., Zarivach, R. & Yonath, A. (2003). Structural basis for the antibiotic activity of ketolides and azalides. *Structure* **11**, 329-338.

Schmitt, E., Mechulam, Y., Fromant, M., Plateau, P. & Blanquet, S. (1997). Crystal structure at 1.2 Å resolution and active site mapping of Escherichia coli peptidyl-tRNA hydrolase. *Embo J* **16**, 4760-4769.

Schnier, J., Gewitz, H. S., Behrens, S. E., Lee, A., Ginther, C. & Leighton, T. (1990). Isolation and characterization of Bacillus stearothermophilus 30S and 50S ribosomal protein mutations. *J Bacteriol* **172**, 7306-7309.

Schulman, L. H. & Pelka, H. (1975). The structural basis for the resistance of Escherichia coli formylmethionyl transfer ribonucleic acid to cleavage by Escherichia coli peptidyl transfer ribonucleic acid hydrolase. *J Biol Chem* **250**, 542-547.

Shiloach, J., Bauer, S., de Groot, N. & Lapidot, Y. (1975). The influence of the peptide chain length on the activity of peptidyl-tRNA hydrolase from E. coli. *Nucleic Acids Res* **2**, 1941-1950.

Sulavik, M. C., Houseweart, C., Cramer, C. & other authors (2001). Antibiotic susceptibility profiles of Escherichia coli strains lacking multidrug efflux pump genes. *Antimicrob Agents Chemother* **45**, 1126-1136.

Zgurskaya, H. I. & Nikaido, H. (1999). Bypassing the periplasm: reconstitution of the AcrAB multidrug efflux pump of Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 7190-7195.

Zgurskaya, H. I. & Nikaido, H. (2000a). Cross-linked complex between oligomeric periplasmic lipoprotein AcrA and the inner-membrane-associated multidrug efflux pump AcrB from Escherichia coli. *J Bacteriol* **182**, 4264-4267.

Zgurskaya, H. I. & Nikaido, H. (2000b). Multidrug resistance mechanisms: drug efflux across two membranes. *Mol Microbiol* **37**, 219-225.

Zhong, P. & Shortridge, V. D. (2000). The role of efflux in macrolide resistance. *Drug Resist Updat* **3**, 325-329.

Tait-Kamratt, A., Davies, T., Cronan, M., Jacobs, M. R., Appelbaum, P. C. & Sutcliffe, J. (2000). Mutations in 23S rRNA and ribosomal protein L4 account for resistance in pneumococcal strains selected in vitro by macrolide passage. *Antimicrob Agents Chemother* **44**, 2118-2125.

Tenson, T., Herrera, J. V., Kloss, P., Guarneros, G. & Mankin, A. S. (1999). Inhibition of translation and cell growth by minigene expression. *J Bacteriol* **181**, 1617-1622.

- Tenson, T. & Ehrenberg, M. (2002).** Regulatory nascent peptides in the ribosomal tunnel. *Cell* **108**, 591-594.
- Tenson, T., Lovmar, M. & Ehrenberg, M. (2003).** The mechanism of action of macrolides, lincosamides and streptogramin B reveals the nascent peptide exit path in the ribosome. *J Mol Biol* **330**, 1005-1014.
- Thanassi, D. G., Cheng, L. W. & Nikaido, H. (1997).** Active efflux of bile salts by *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **179**, 2512-2518.
- Thanassi, D. G. & Hultgren, S. J. (2000).** Multiple pathways allow protein secretion across the bacterial outer membrane. *Curr Opin Cell Biol* **12**, 420-430.
- Tikhonova, E. B. & Zgurskaya, H. I. (2004).** AcrA, AcrB, and TolC of *Escherichia coli* Form a Stable Intermembrane Multidrug Efflux Complex. *J Biol Chem* **279**, 32116-32124.
- Valadez, J. G., Hernandez-Sanchez, J., Magos, M. A., Ontiveros, C. & Guarneros, G. (2001).** Increased bar minigene mRNA stability during cell growth inhibition. *Mol Microbiol* **39**, 361-369.
- Wandersman, C. & Delepelaire, P. (1990).** TolC, an *Escherichia coli* outer membrane protein required for hemolysin secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 4776-4780.
- Weisblum, B. (1995a).** Insights into erythromycin action from studies of its activity as inducer of resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **39**, 797-805.
- Weisblum, B. (1995b).** Erythromycin resistance by ribosome modification. *Antimicrob Agents Chemother* **39**, 577-585.
- Vester, B. & Douthwaite, S. (2001).** Macrolide resistance conferred by base substitutions in 23S rRNA. *Antimicrob Agents Chemother* **45**, 1-12.
- White, D. G., Goldman, J. D., Demple, B. & Levy, S. B. (1997).** Role of the *acrAB* locus in organic solvent tolerance mediated by expression of *marA*, *soxS*, or *robA* in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **179**, 6122-6126.
- Yu, E. W., McDermott, G., Zgurskaya, H. I., Nikaido, H. & Koshland, D. E., Jr. (2003).** Structural basis of multiple drug-binding capacity of the AcrB multidrug efflux pump. *Science* **300**, 976-980.
- Sambrook J, Russell DW. (2001).** Molecular Cloning : A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.*

TÄNUSÕNAD

Suurimad tänud minu juhendajale Tanel Tensonile eksperimentaalse töö suunamise ja kasulike nõuannete eest magistritöö kavandamisel ning töö kirjutamisel. Tänan ka Aksel Soosaart abi ja juhendamise eest praktilise töö teostamisel ning kõiki teisi meie labori inimesi abi ja sõbraliku õhkkonna eest.