Preživljenje stanica bakterije Escherichia coli DH5alpha osjetljivih i otpornih na aminoglikozide u uvjetima osmotskog i kiselinskog stresa

Maglica, Vedrana

Master's thesis / Diplomski rad

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:021424

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Vedrana Maglica

Preživljenje stanica bakterije *Escherichia coli* DH5α osjetljivih i otpornih na aminoglikozide u uvjetima osmotskog i kiselinskog stresa

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2015.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Molekularna biologija s genetičkim inženjerstvom i izrađen je na Zavodu za biokemiju i molekularnu biologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Gordane Maravić Vlahoviček.

Zahvaljujem se svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Gordani Maravić Vlahoviček na ukazanom povjerenju te strpljenju i pomoći pri izradi ovog diplomskog rada. Veliko hvala dr. sc. Dariji Vidučić na neprocijenjivoj pomoći u odrađivanju eksperimentalnog dijela rada.

Posebno se zahvaljujem svojim prijateljicama, mojim Opatijkama koje su uz mene sve ove godine te mojim predivnim ženama s farmacije koje su mi uljepšale ove fakultetske dane.

Najviše od svega se zahvaljujem mami Adi i tati Željku, na ljubavi i podršci koju mi pružaju svaki dan.

SADRŽAJ

1. UVOD 1

1.1. Antibiotici 1

1.1.1. Sinteza proteina 3

1.1.1.1. Struktura ribosoma 3

1.1.1.2. Translacija 4

1.1.2. Antibiotici koji inhibiraju sintezu proteina 7

1.2. Aminoglikozidni antibiotici 8

1.2.1. Struktura 9

1.2.2. Mehanizam djelovanja 9

1.3. Rezistencija na antibiotike 11

1.4. Rezistencija na aminoglikozidne antibiotike 12

1.4.1.1. 16S rRNA metil-transferaze iz bakterija koje proizvode aminoglikozide 15

Metil-transferaza Sgm 15

1.4.1.2. 16S rRNA metil-transferaze iz patogenih sojeva bakterija .. 17

Metil-transferaza ArmA 17

Metil-transferaza RmtA 19

Metil-transferaza RmtB 20

Metil-transferaza RmtC 22

1.5. Biološki učinak rezistencije na bakterijsku stanicu 23

1.5.1. Biološki učinak 16S rRNA metil-transferaza na bakterijsku stanicu 23

1.6. Preživljenje *E. coli* u stresnim uvjetima 24

2. OBRAZLOŽENJE TEME 25

3. MATERIJALI I METODE 26

3.1. Materijali 26

3.1.1. Standardne kemikalije 26
3.1.2. Hranjivi mediji 26

3.2. Bakterijski soj i plazmidi 27

3.3. Hranjive podloge i uzgoj bakterija 28

3.3.1. Faze rasta bakterijske kulture 28
3.3.2. Rast na tekućoj hranjivoj podlozi 29
3.3.3. Rast na krutoj hranjivoj podlozi 30

3.4. Transformacija bakterija 30

3.4.1. Priprema kemijski kompetentnih stanica 30
3.4.2. Transformacija 31

3.5. Određivanje preživljenja u stresnim uvjetima *E. coli* divljeg tipa i *E. coli* koja sadrži gen za 16S rRNA metil-transferazu koja uzrokuje rezistenciju na aminoglikozide 31

3.5.1. Osmotski stres 33
3.5.2. Kiselinski stres 33

4. REZULTATI 34

4.1. Osmotski stres 34
4.2. Kiselinski stres 36

5. RASPRAVA 39

6. ZAKLJUČAK 45

7. LITERATURA 46

8. SAŽETAK 53

9. SUMMARY 54

10. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA 55

11. BASIC DOCUMENTATION CARD 56

1. UVOD

Otkriće i uvođenje antibiotika u terapiju je jedan od glavnih razloga smanjenja morbiditeta i mortaliteta te produljenja životnog vijeka. Antibiotici su i danas ostali jedni od najbitnijih lijekova u kliničkoj upotrebi i upravo zbog toga pojava novih mehanizama rezistencije kod patogenih bakterijskih sojeva predstavlja sve veću opasnost za ljudsko zdravlje (Andersson i Hughes, 2010). S porastom infekcija uzrokovanih višestruko-rezistentnim sojevima bakterija, u upotrebu se vraćaju aminoglikozidni antibiotici kao jedna od preostalih opcija liječenja, pogotovo kod gram-negativnih patogena (Becker i Cooper, 2013). U zadnjih desetak godina došlo je do otkrića patogenih sojeva bakterija koje ostvaruju rezistenciju na aminoglikozide putem metilacije 16S rRNA, mehanizma koji je bio ograničen samo na bakterije koje su prirodni proizvođači antibiotika. Posebno je zabrinjavajuća globalna raširenost patogenih mikroorganizama koji pokazuju višestruku rezistenciju stvaranjem metalo-β-laktamaza te 16S rRNA metil-transferaza (Wachino i Arakawa, 2012).

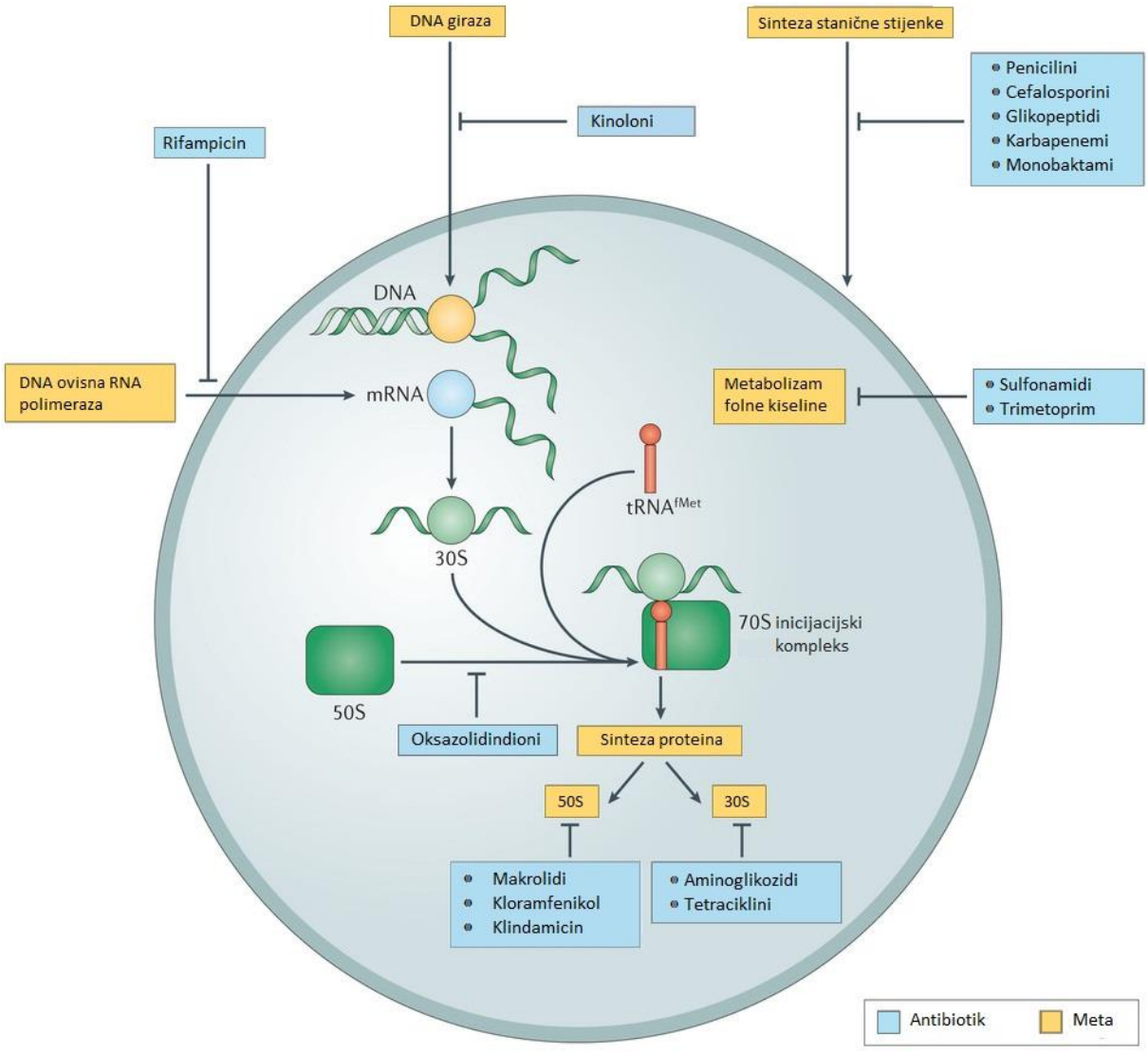
Kako bi se našlo rješenje rastućeg problema rezistencije sve je više istraživanja usredotočeno na mogućnosti smanjenja rezistencije. Smatra se da bi smanjenom upotrebom antibiotika došlo do prevalencije nerezistentnih sojeva u odnosu na rezistentne. Jedan od razloga za to bi mogla biti činjenica da rezistencija često sa sobom nosi određeni biološki učinak na bakterijsku stanicu (*engl.* fitness cost) koji može značiti smanjenu sposobnost preživljenja stanice (Andersson i Hughes, 2010). Sposobnost preživljenja uvelike ovisi i o okolišnim čimbenicima te je bitno ispitati je u raznim uvjetima. Tako bi se mogle utvrditi određene fiziološke slabosti rezistentnih sojeva koje bi se mogle iskoristiti u razvoju novih antibiotika ili bi se nametanjem određenih uvjeta mogla povećati selekcija protiv rezistentnih sojeva patogena (Andersson i Hughes, 2011).

1.1. Antibiotici

Antibiotici su molekule prirodnog, polusintetičkog ili sintetičkog podrijetla koje zaustavljaju rast ili ubijaju mikroorganizme, točnije bakterije. Po tome zaustavljaju li samo bakterijski rast ili dovode do smrti bakterijske stanice dijelimo ih na bakteriostatske i baktericidne antibiotike. Većina antibiotika koja je uvedena u kliničku upotrebu je prirodnog podrijetla, pri čemu aktinomiceti predstavljaju najveću skupinu prirodnih proizvođača antibiotika (Walsh, 2003).

Antibiotici ciljano djeluju na osnovne metaboličke procese bakterije i tako je onesposobljavaju. Mete djelovanja antibiotika (Slika 1.1.1.) mogu biti (Coates i sur., 2002):

a) sinteza stanične stijenke (β-laktami)
b) sinteza nukleinskih kiselina, pri čemu meta može biti DNA-giraza (kinoloni) ili DNA-ovisna RNA-polimeraza (rifampicin)
c) sinteza proteina (tetraciklini, aminoglikozidi, makrolidi, oksazolidindioni, klindamicin, kloramfenikol)
d) enzimi uključeni u metabolizam bakterije (sulfonamidi, trimetoprim).



Slika 1.1.1. Mete djelovanja antibiotika. Prikazano je 5 najčešćih meta djelovanja antibiotika: sinteza stanične stijenke, DNA-giraza, DNA-ovisna RNA-polimeraza, metabolički enzimi i sinteza proteina. Također, označeni su antibiotici koji djeluju na svaku od tih meta (preuzeto i prilagođeno iz Lewis, 2003).

1.1.1. Sinteza proteina

Kod svih živih organizama funkciju sinteze proteina ima ribosom, ribonukleoproteinski kompleks veličine 23 MDa. Očuvanost funkcije ribosoma dovela je i do očuvanja strukture, što se pogotovo odnosi na dijelove ribosoma s važnom ulogom kao što je dekodiranje mRNA i prijenos peptidne jedinice. Sveprisutnost tih specifičnih mjesta unutar bakterijskih vrsta čine ribosom i rRNA odličnom metom djelovanja antibiotika (Conn i sur., 2009).

1.1.1.1. Struktura ribosoma

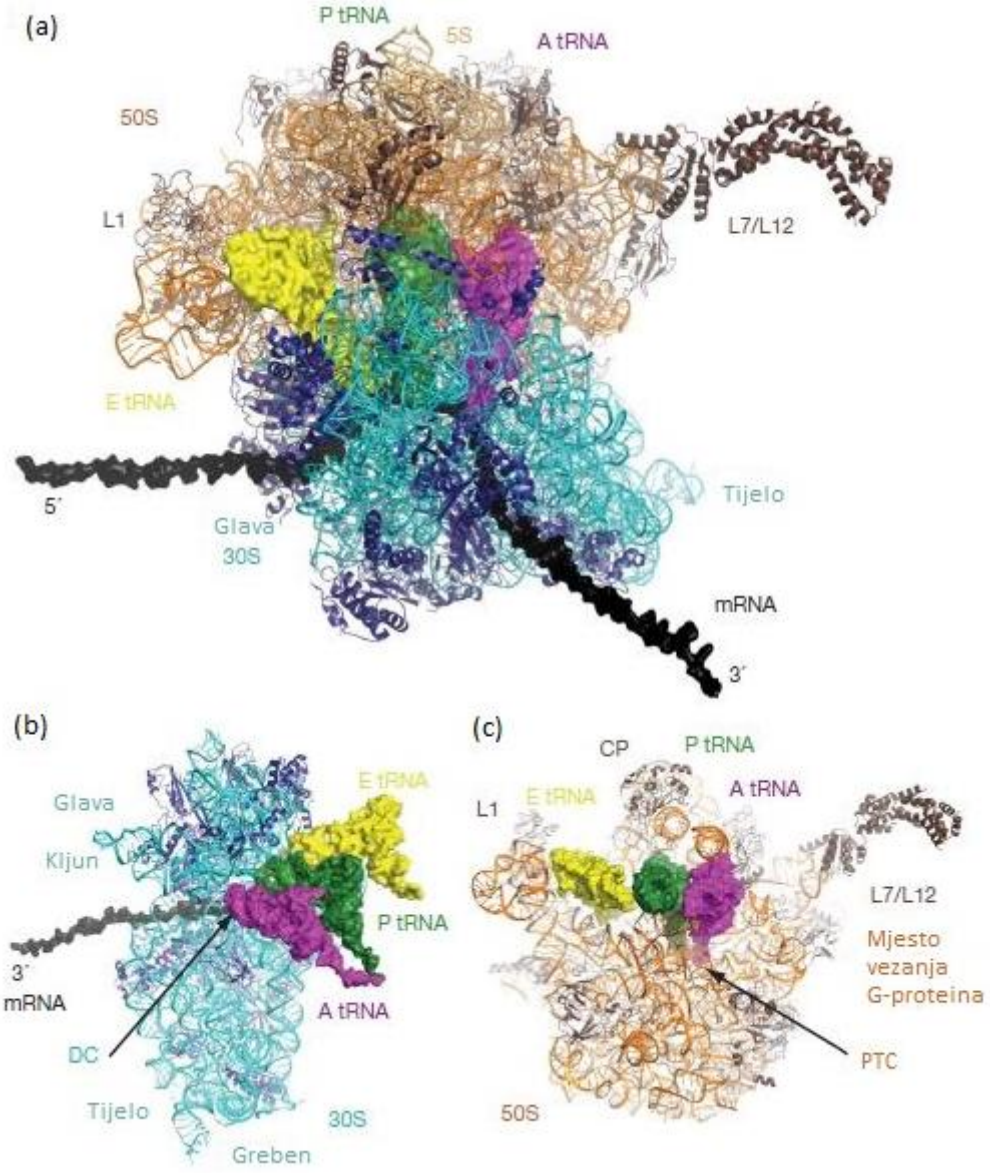
Ribosom prokariota (70S) sastoji se od podjedinice 30S, građene od 16S rRNA i oko 20 proteina, i podjedinice 50S, izgrađene od 23S i 5S rRNA te preko 30 proteina. Dvije podjedinice zajedno formiraju funkcionalni enzim, pri čemu velika podjedinica sadrži aktivno mjesto enzima, a mala podjedinica osigurava točnost translacije (Yonath, 2005). Aktivno mjesto enzima sadrži peptidil-transferazni centar u kojem dolazi do stvaranja peptidne veze te mjesto vezanja G-proteina, tj. faktora koji sudjeluju u sintezi proteina (Ban i sur., 2000). Točnost translacije se osigurava u dekodirajućem mjestu koje se sastoji od uzvojnice 44, petlje 530 i uzvojnice 34 16S rRNA (Ogle i sur., 2001).

Oblik podjedinice 30S je uvelike određen RNA sastavnicom. Na tercijarnoj strukturi 16S rRNA vidljive su prepoznatljive morfološke značajke: glava, kljun, tijelo, rame, greben te platforma (Slika 1.1.1.2b). Navedene morfološke značajke određene su sekundarnom strukturom 16S rRNA koja se sastoji od 4 domene – 5'-domene, središnje domene, velike 3'-domene i male 3'-domene. Tako 5'-domena uz malu 3'-domenu čini tijelo, središnja domena glavni dio platforme, a velika 3'-domena većinu glave podjedinice (Wimberly i sur., 2000).

Za razliku od male podjedinice, veliku podjedinicu čini jedinstvena divovska domena koja nastaje spajanjem šest domena 23S rRNA te 5S rRNA (Ban i sur., 2000). Glavne značajke podjedinice 50S, prikazane na Slici 1.1.1.2c, su L1 ruka, središnje izbočenje (CP), te regija blizu proteina L7/L12 (Schuwirth i sur., 2005).

Molekula mRNA se veže u pukotinu između glave i tijela podjedinice 30S te tamo dolazi do interakcije kodona s antikodonom tRNA. Na ribosomu prepoznajemo tri mjesta vezanja tRNA: A (*engl*. aminoacyl)-mjesto u kojem se veže nadolazeća aminoacil-tRNA, P-(*engl*. peptidyl) mjesto gdje se veže peptidil-tRNA vezana na novonastajući polipeptidni lanac, te E (*engl*. exit)-mjesto u koje se smješta deacil-tRNA prije izbacivanja s ribosoma

(Schmeing i Ramakrishnan, 2009). Cjelokupna struktura ribosoma kao i interakcije ribosoma s mRNA i molekulama tRNA su vidljive na Slici 1.1.1.1.1a.



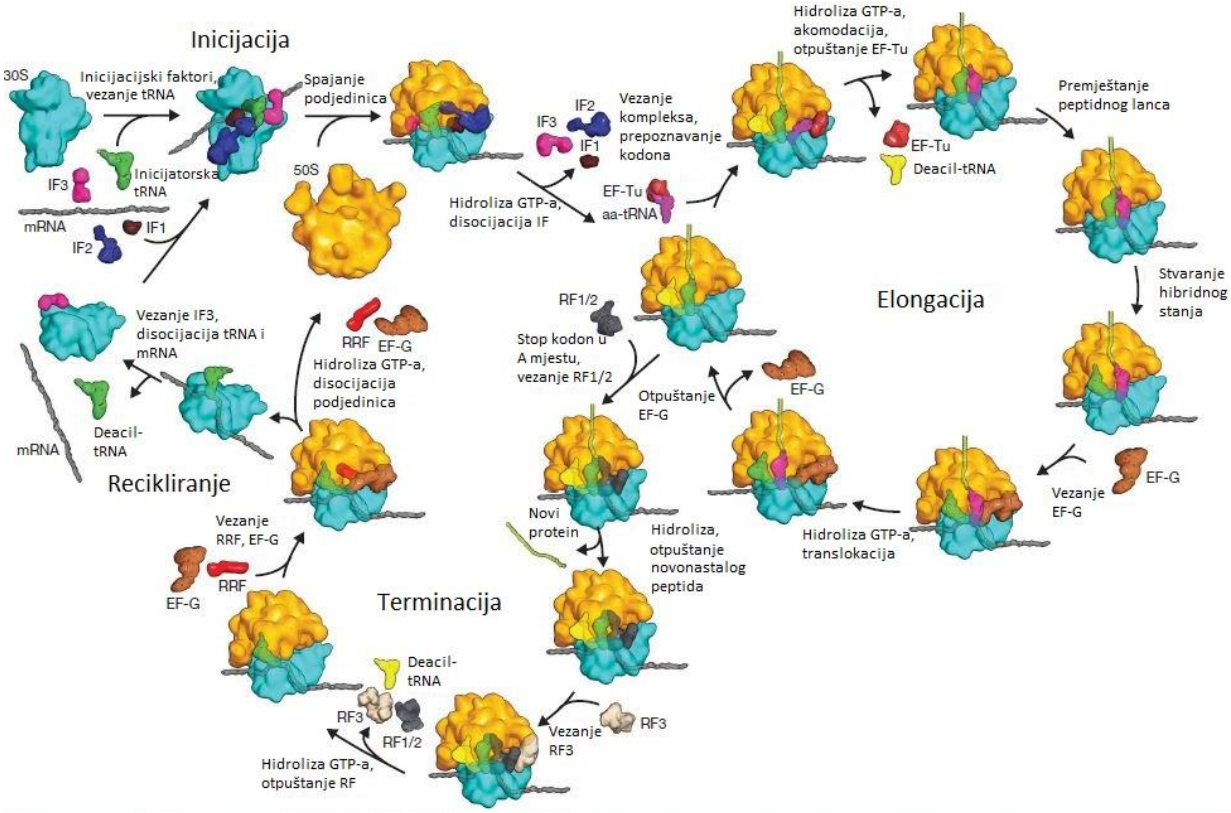
Slika 1.1.1.1.1. Struktura ribosoma. (a) Prikaz ribosoma 70S s mRNA i tRNA u mjestima A, P i E. (b) podjedinice 30S, (c) i podjedinice 50S. Podjedinica 30S prikazana je plavom, a podjedinica 50S narančastom bojom, pri čemu su proteinski dijelovi prikazani tamnije, a rRNA svjetlije. mRNA je prikazana sivom bojom, dok su tRNA s obzirom na mjesto koje zauzimaju prikazane ljubičastom (A-mjesto), zelenom (P-mjesto) i žutom (E-mjesto) bojom (preuzeto i prilagođeno iz Schmeing i Ramakrishnan, 2009).

1.1.1.2. Translacija

Sinteza proteina se odvija vezanjem tRNA s pripadajućim aminokiselinama na ribosom u redoslijedu određenom slijedom nukleotida mRNA koji nazivamo kodon. Tijekom tog procesa, koji nazivamo translacijom, molekule tRNA se premještaju redom kroz tri mjesta

vezanja na ribosomu, A, P i E (Voorhees i Ramakrishnan, 2013). Dva funkcionalna mjesta tRNA su antikodonska petlja i 3'-kraj. Antikodonska petlja ulazi u interakcije s mRNA na maloj ribosomskoj podjedinici, dok akceptorska osnova tRNA, zajedno s aminoacil- ili peptidil-tRNA, ulazi u interakcije s velikom podjedinicom. Stoga možemo zaključiti da su za spajanje dviju podjedinica u aktivan ribosom zaslužne molekule tRNA te fleksibilne komponente dvaju podjedinica (Yonath, 2005).

Translaciju možemo podijeliti na tri faze: inicijaciju, elongaciju i terminaciju (Slika 1.1.1.2.1).



Slika 1.1.1.2.1. Pregled bakterijske translacije (preuzeto i prilagođeno iz Schmeing i Ramakrishnan, 2009).

a) Inicijacija

Za početak inicijacije potrebno je smještanje inicijatorske fMet-tRNA^{fMet} iznad start kodona mRNA u P-mjestu. Kod bakterija, ribosom se smješta u blizinu start kodona sparivanjem baza 3'-kraja 16S rRNA s komplementarnim slijedom uzvodno od kodona mRNA, nazvanim Shine-Dalgarnov slijed. Kako bi se osigurao točan položaj start kodona u P-mjestu osim vezanja fMet-tRNA^{fMet} potrebna su i tri inicijacijska faktora, IF1-3.

Prvi korak inicijacije uključuje vezanje IF3 za podjedinicu 30S. Vezanje potiče oslobađanje mRNA i deacil-tRNA zaostale od prošlog ciklusa translacije s podjedinice 30S što sprječava ponovno povezivanje s podjedinicom 50S. Nakon toga se kompleks 30S-IF3 veže na novu mRNA, IF1, IF2 i inicijatorsku tRNA čime dolazi do stvaranja inicijacijskog kompleksa 30S. IF2 je GTPaza koja potiče povezivanje podjedinica te formiranje inicijacijskog kompleksa 70S koje je popraćeno oslobađanjem IF3. Zatim slijedi hidroliza GTP-a i oslobađanje fosfata s IF2, fMet-tRNA^{fMet} se pomiče u peptidil-transferazni centar (PTC), tako pripremajući ribosom za elongaciju (Schmeing i Ramakrishnan, 2009).

b) Elongacija

Tijekom elongacije dolazi do povezivanja aminokiselina u protein. Nakon inicijacije, fMet-tRNA^{fMet} se nalazi u P-mjestu, dok je A-mjesto prazno. Aminoacil-tRNA se premješta u A-mjesto ribosoma djelovanjem elongacijskog faktora Tu (EF-Tu). Taj korak nazivamo dekodiranje, pri čemu dolazi do odabira tRNA čiji antikodon odgovara kodonu mRNA. Vezanje kompleksa s prikladnom tRNA na ribosom dovodi do hidrolize GTP-a pomoću EF-Tu te do disocijacije faktora. Zatim slijedi akomodacija gdje u odsutnosti EF-Tu, dolazi do prebacivanja aminoacil kraja tRNA u PTC. Akomodacija vodi do brzog stvaranja peptidne veze što uzrokuje prijelaz proteinskog lanca iz P-mjesta u A-mjesto te dodavanje nove aminokiseline na rastući peptidni lanac. Nakon prijenosa peptidne jedinice, molekule tRNA se moraju prebaciti iz A- i P-mjesta u P- i E-mjesto, a mRNA se mora pomaknuti za jedan kodon. Proces u kojem se odvijaju te promjene katalizira EF-G, a nazivamo ga translokacija. Translokacijom se prenosi novi kodon mRNA u A-mjesto te tako priprema ribosom za još jedan krug elongacijskog ciklusa (Voorhees i Ramakrishnan, 2013).

c) Terminacija

Ciklus elongacije se nastavlja sve dok se stop kodon mRNA ne nađe u A-mjestu, što signalizira kraj kodirajućeg slijeda. Faktor za otpuštanje klase I prepoznaje stop kodon te kida nastali polipeptidni lanac s tRNA koja se nalazi u P-mjestu uzrokujući oslobađanje novosintetiziranog proteina s ribosoma. Kod bakterija, postoje dva faktora za otpuštanje klase I, RF1 i RF2. Oba faktora prepoznaju UAA stop kodon zahvaljujući očuvanom tripeptidnom motivu GGQ. Svaki od faktora također posjeduje i specifični tripeptidni motiv. Tako je PXT u RF1 odgovoran za vezanje UAG, a SPF u RF2 za vezanje UGA stop kodona.

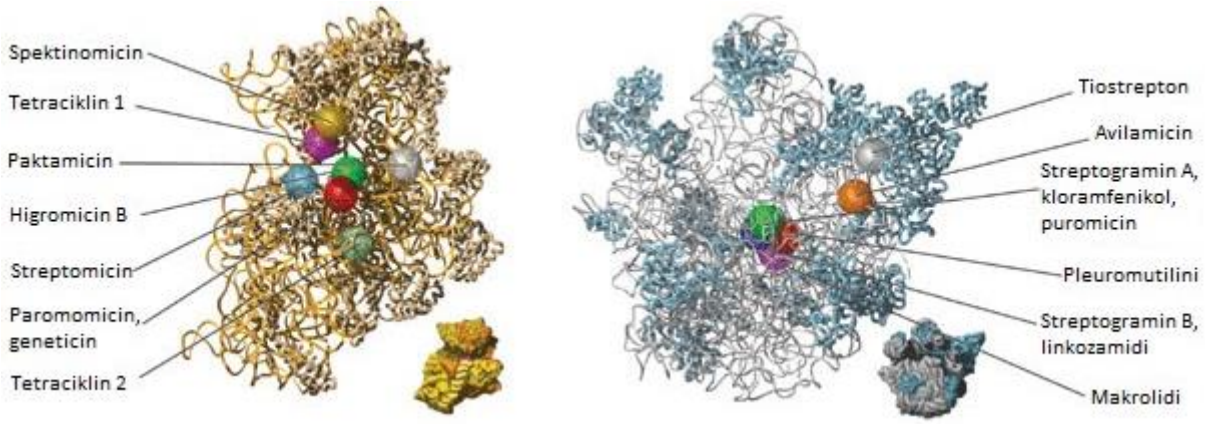
Faktor za otpuštanje klase II, RF3, ubrzava disocijaciju faktora klase I s ribosoma nakon oslobađanja peptida. Smatra se da vezanje RF3 na kompleks ribosom-RF1/2 uzrokuje zamjenu GDP s RF3 za GTP. To uzrokuje konformacijske promjene koje vjerojatno destabiliziraju vezanje faktora za otpuštanje klase I, što u konačnici dovodi do njihove disocijacije s ribosoma.

Nakon hidrolize GTP-a, dolazi do disocijacije RF3 s ribosoma i mRNA i deacilirana tRNA ostaju u P-mjestu. Kako bi ponovno započela sinteza proteina ribosom se mora reciklirati na podjedinice. Proces recikliranja omogućuje protein RRF (*engl*. ribosome recycling factor) te EF-G (Schmeing i Ramakrishnan, 2009).

1.1.2. Antibiotici koji inhibiraju sintezu proteina

Sinteza proteina predstavlja jednu od glavnih meta djelovanja antibiotika. Oni mogu inhibirati gotovo svaki korak translacije ometajući način rada ribosoma te time i sintezu novih proteina (Wilson, 2009).

Uzimajući u obzir važnost rRNA, nije iznenađujuće da većina antibiotika koji inhibiraju translaciju imaju vezno mjesto na dijelovima ribosoma bogatim rRNA. Antibiotici koji se vežu na podjedinicu 50S ometaju njene glavne funkcije, a to su kontrola hidrolize GTP-a, stvaranje peptidne veze i usmjeravanje peptida niz tunel među podjedinicama. Na procese koji uključuju GTP djeluju tiopeptidni antibiotici poput tiostreptona te oligosaharidni antibiotici avilamicin i evernimicin. Na regiji podjedinice 50S koja obuhvaća gornji dio tunela među podjedinicama kao i peptidil-transferazni centar se nalaze vezna mjesta za širok spektar antibiotika u koje spadaju makrolidi, linkozamidi, streptogramin B, kloramfenikol, puromicin, pleuromutilini i oksazolidindioni. Podjedinica 30S je mjesto vezanja antibiotika kao što su tetraciklini, paktamicin te aminoglikozidi, koji sprječavaju podjedinicu u obavljanju funkcije dekodiranja genetičke informacije sadržane u mRNA (Poehlsgaard i Douthwaite, 2005). Antibiotici koji djeluju na sintezu proteina te njihova vezna mjesta prikazani su na Slici 1.1.2.1.



Slika 1.1.2.1. Mjesta vezanja antibiotika za ribosom. Podjedinica 30S je prikazana na lijevoj strani, a podjedinica 50S na desnoj. Modeli podjedinica su zasnovani na strukturi ribosoma 70S iz *Thermus thermophilus*. rRNA je prikazana žuto i sivo, a r-proteini narančasto i plavo (preuzeto i prilagođeno iz Poehlsgaard i Douthwaite, 2005).

1.2. Aminoglikozidni antibiotici

Aminoglikozidni antibiotici, kao što su streptomicin i disupstituirani 2-deoksistreptamini, djeluju baktericidno na stanicu. Smatra se da je letalnost posljedica stvaranja krivo translatiranih proteina i njihovih učinaka na stanicu. Povećana permeabilnost stanične membrane zbog uklapanja netočno smotanih proteina u membranu dovodi do povećanog unosa aminoglikozida u stanicu, što za posljedicu ima povećanu koncentraciju antibiotika te saturaciju ribosoma koja je povezana s nemogućnošću sinteze i sklapanja novih ribosoma (Magnet i Blanchard, 2005).

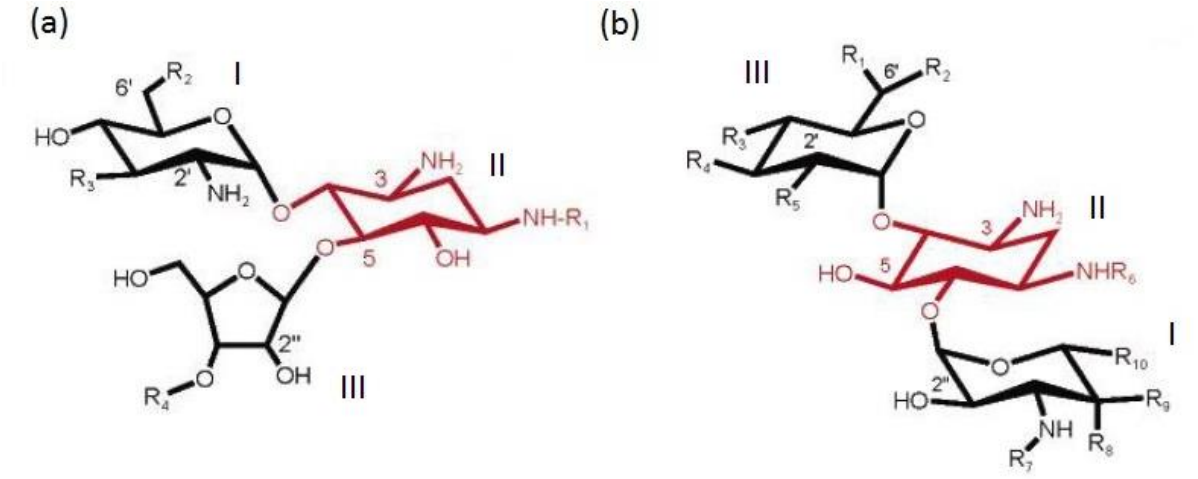
Aminoglikozidni antibiotici su korisni u liječenju ozbiljnih infekcija zbog svojeg širokog spektra djelovanja, brzog baktericidnog učinka te sposobnosti da djeluju sinergistički u kombinaciji s nekim drugim antibioticima (Shakil i sur., 2007). Osobito su korisni u ozbiljnim infekcijama gram-negativnim bakterijama pa se gentamicin koristi kod bolničkih infekcija uzrokovanim enterobakterijama i bakterijama vrste *Pseudomonas aeruginosa*, dok se arbekacin koristi u infekcijama s bakterijama rezistentnim na gentamicin kao što je meticilin-rezistentni *Staphylococcus aureus* (MRSA) (Magnet i Blanchard, 2005).

Jedan od glavnih problema primjene aminoglikozidnih antibiotika je toksičnost koja se javlja zbog nespecifičnog vezanja za RNA. Dvije vrste toksičnosti koje se povezuju s aminoglikozidima su ototoksičnost i nefrotoksičnost koje mogu dovesti do ozbiljnih nuspojava (Houghton i sur., 2010).

1.2.1. Struktura

Aminoglikozidi su hidrofilni šećeri koji u strukturi imaju nekoliko amino i hidroksilnih funkcionalnih skupina. Smatraju se polikationima jer su amino skupine većinom protonirane u biološkom mediju. Zbog pozitivnog naboja amino skupina imaju afinitet za vezanje nukleofilnih molekula kao što su primjerice nukleinske kiseline. Pokazuju visoki afinitet vezanja na određene dijelove RNA, posebno prokariotsku rRNA (Kotra i sur., 2000).

U svojoj strukturi, aminoglikozidi sadrže središnji aminociklitolni prsten, najčešće 2-deoksistreptamin ili streptamin, povezan glikozidnim vezama na amino šećere. Po položaju veza možemo ih podijeliti na tri skupine: 4,5-disupstituirane 2-deoksistreptamine (4,5-DOS), 4,6-disupstituirane 2-deoksistreptamine (4,6-DOS) te zadnju skupinu u koju su svrstani svi aminoglikozidi koji ne pripadaju u prethodne dvije skupine (Shakil i sur., 2007). Struktura aminoglikozida i njihova podjela su prikazane na Slici 1.2.1.1.



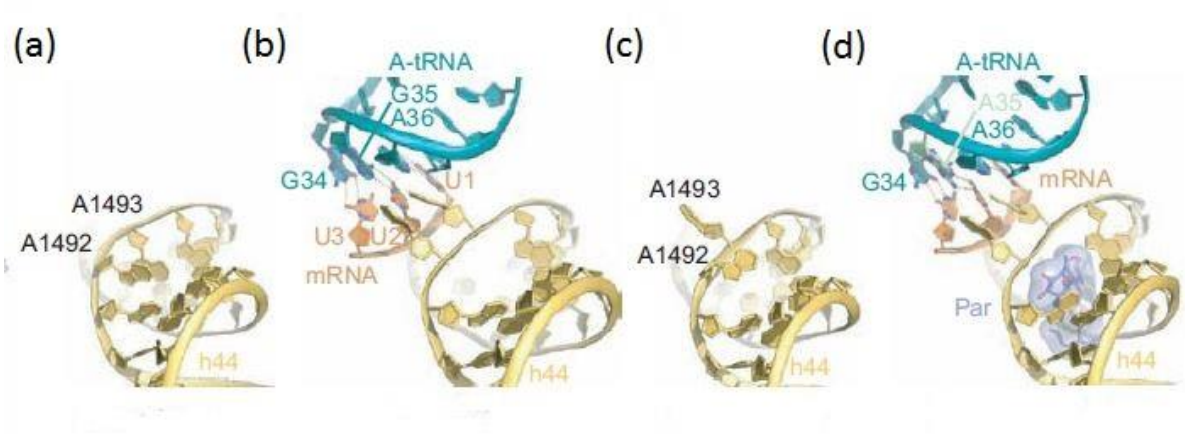
Slika 1.2.1.1. Struktura aminoglikozidnih antibiotika. Prsten deoksistreptamina je označen crvenom bojom. Rimski brojevi predstavljaju prstene: II – aminociklitolski prsten (2-deoksistreptamin); I , III – amino šećeri. (a) 4,5-disupstituirani 2-deoksistreptamini kojima pripradaju paromomicin, neomicin te ribostamicin. (b) 4,6-disupstituirani 2-deoksistreptamini kojima pripada gentamicinska i kanamicinska skupina te amikacin, sisomicin, netilmicin, tobramicin i arbekacin (preuzeto i prilagođeno iz Magnet i Blanchard, 2005).

1.2.2. Mehanizam djelovanja

Aminoglikozidni antibiotici utječu na sintezu proteina u ribosomu tako što smanjuju točnost translacije djelovanjem na početni korak u selekciji aminoacil-tRNA. Točno mjesto njihovog djelovanja, utvrđeno ribosomskom kristalografijom, je dekodirajući dio A-mjesta koji je smješten na kraju 16S rRNA uzvojnice 44 na maloj ribosomskoj podjedinici (Ogle i sur., 2001).

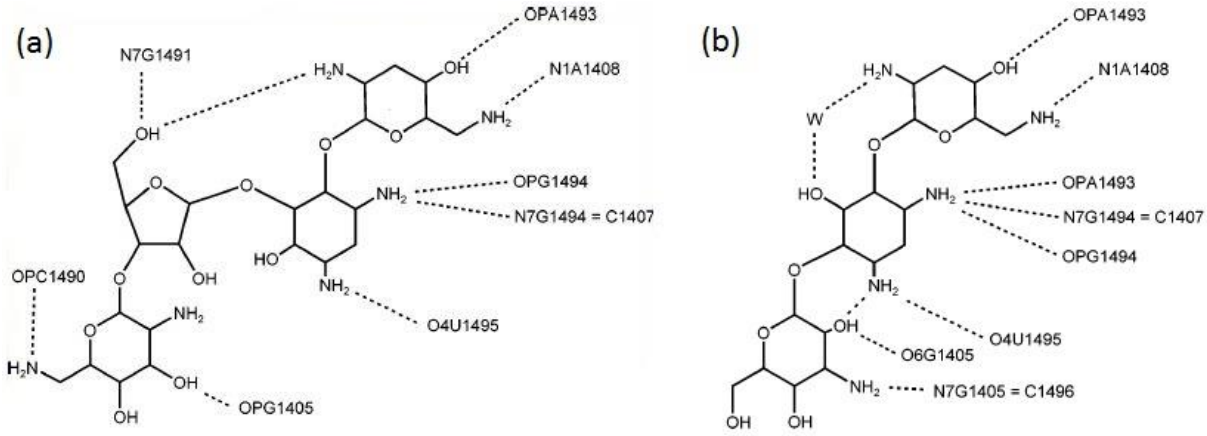
Uloga dekodirajućeg dijela je kontroliranje spajanja kodona i antikodona nakon što je aminoacil-tRNA dovedena u A-mjesto djelovanjem faktora EF-Tu u kompleksu s GTP-om. Kada dođe do točnog spajanja između kodona mRNA i antikodona tRNA, kostur riboza-fosfata mijenja konformaciju molekule i dolazi do stvaranja vodikove veze između baza A1492 i A1493 čime dolazi do izbacivanja tih nukleotida iz uzvojnice 44 (Slika 1.2.2.1.a i b). Promjena konformacije predstavlja signal koji se prenosi sve do velike ribosomske podjedinice i elongacijskog faktora Tu nakon čega dolazi do hidrolize GTP-a. U konačnici to dovodi do pomaka aminokiseline u peptidil-transferazni centar gdje će nakon toga doći do stvaranja peptidne veze. No, ukoliko dođe do netočnog spajanja antikodona i kodona, interakcije neće biti dovoljne da dovedu do konformacijske promjene u uzvojnici 44 (Slika 1.2.2.1.c) i neće doći do pojave signala za stvaranje peptidne veze (Poehlsgaard i Douthwaite, 2005). Točnije, indukcija hidrolize GTP-a bit će sporija nego kod točnog spajanja kodona i antikodona, što značajno utječe na točnost translacije (Ogle i Ramakrishnan, 2005).

Aminoglikozidi ometaju pravilno sparivanje kodona i antikodona uzrokujući promjenu konformacije čak i u slučaju spajanja nepripadne aminoacil-tRNA te tako remete komunikaciju između dekodirajućeg mjesta i ribosomskog središta koje regulira GTPaza, što dovodi do ugradnje pogrešnih aminokiselina u rastući peptidni lanac. Aminoglikozidi neaminskog tipa, kao što je paromomicin, povećavaju brzinu hidrolize GTP-a u slučaju približno točnog spajanja te je tako izjednačavaju s brzinom hidrolize kod točnog spajanja antikodona i kodona (Pape i sur., 2000).



Slika 1.2.2.1. Konformacija nukleotida A1492 i A1493 u uzvojnici 44 (a) u nativnoj podjedinici 30S; (b) u prisutnosti mRNA (kodon 5'-UUU u A-mjestu) i pripadne aa-tRNA (antikodon 5'-G**G**A); (c) u prisutnosti mRNA (kodon 5'-UUU u A-mjestu) i nepripadne aa-tRNA (antikodon 5'-G**A**A); (d) u prisutnosti paromomicina (Par, označeno plavom bojom), mRNA (kodon 5'-UUU u A-mjestu) i nepripadne aa-tRNA (antikodon 5'-G**A**A) (preuzeto i prilagođeno iz Wilson, 2009).

Proučavanjem vezanja paromomicina kao primjera 4,5-DOS, otkriveno je da se antibiotik veže u veliki utor RNA pri čemu zauzima konformaciju oblika slova L. Prsten I aminoglikozida je umetnut u uzvojnicu 44 vezanjem za nukleotid G1491 te stvaranjem dvaju vodikovih veza sa skupinom N1 A1408. Ta interakcija omogućava nukleotidima A1492 i A1493 da ostvare izbočenu konformaciju nalik na konformaciju koja nastaje točnim sparivanjem kodona i antikodona u A-mjestu (Slika 1.2.2.1.d). Dvije amino skupine prstena II ulaze u izravnu interakciju s skupinama N7 G1494 i O4 U1495, dok ribozni prsten (prsten III), osim jedne intramolekulske interakcije, ostvaruje i interakciju sa skupinom N7 G1491. Posljednje interakcije su između glukoznog prstena i kostura fosfata s obje strane uzvojnice 44, koje uključuju C1490 i G1405. U usporedbi s 4,5-DOS, tobramicin kao predstavnik 4,6-DOS ostvaruje još i specifične interakcije s skupinama O6 i N7 G1405 preko hidroksilne i amino skupine prstena III (Magnet i Blanchard, 2005; Tenson i Mankin, 2006). Interakcije molekula aminoglikozida s podjedinicom 30S prikazane su na Slici 1.2.2.2.



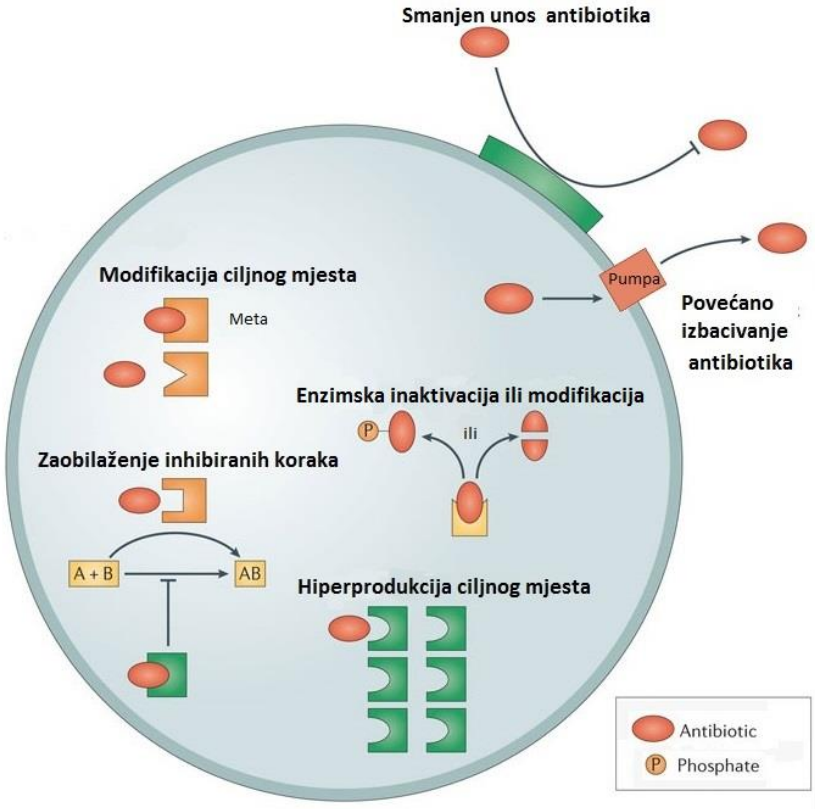
Slika 1.2.2.2. Interakcije tipičnih aminoglikozida s podjedinicom 30S. (a) Interakcije paromomicina kao predstavnika aminoglikozida skupine 4,5-DOS. (b) interakcije tobramicina kao predstavnika aminoglikozida skupine 4,6-DOS (preuzeto i prilagođeno iz Magnet i Blanchard, 2005).

1.3. Rezistencija na antibiotike

Pojava rezistencije je prirodan odgovor patogenih mikroorganizama na primjenu antibiotika. Pri svakom uvođenju novog antibiotika u kliničku primjenu dolazi do pojave rezistencije (Walsh, 2003). Rezistencija može biti posljedica urođenog svojstva bakterije ili može nastati mutacijama i prijenosom gena (Coates i sur., 2002). Brzina pojave rezistencije varira od nekoliko mjeseci do godina, a ovisi o brzini pojave *de novo* mutacija te brzini horizontalnog prijenosa gena koji prenose rezistenciju. Rezistencija postaje klinički problem kada učestalost rezistentnog tipa bakterije ugrozi učinkovitost terapije antibiotikom (Andersson i Hughes, 2010).

Postoji pet glavnih mehanizama koji bakterijama omogućavaju rezistenciju na antibiotike (Coates i sur., 2002):

a) modifikacija veznog mjesta antibiotika (enzima, ribosoma ili prekusora u sintezi stanične stijenke)
b) zaobilaženje metaboličkog koraka koji je inhibiran antibiotikom
c) smanjenje unutarstanične koncentracije antibiotika smanjenjem permeabilnosti membrane ili aktivnim izbacivanjem iz stanice
d) inaktivacija ili modifikacija molekule lijeka
e) hiperprodukcija ciljnog mjesta djelovanja antibiotika



Slika 1.3.1. Mehanizmi rezistencije na antibiotike. Prikazani su najčešći mehanizmi: modifikacija ciljnog mjesta (mete) antibiotika, zaobilaženje koraka u metabolizmu koji su inhibirani antibiotikom, smanjena unutarstanična koncentracija antibiotika (smanjeni unos ili aktivno izbacivanje antibiotika), inaktivacija ili modifikacija molekule antibiotika te hiperprodukcija ciljnog mjesta djelovanja antibiotika (npr. enzima) (preuzeto i prilagođeno iz Lewis, 2003).

1.4. Rezistencija na aminoglikozidne antibiotike

Povećanom upotrebom aminoglikozdinih antibiotika došlo je do pojave bakterijske rezistencije koja je sve učestalija diljem svijeta te zbog toga postaje prijetnja uspješnom liječenju (Houghton i sur., 2010).

Glavni mehanizmi rezistencije aminoglikozida koji se javljaju kod patogenih bakterija su (Galimand i sur., 2005):

a) smanjena unutarstanična koncentracija antibiotika promjenom permeabilnosti vanjske membrane, smanjenim transportom antibiotika preko unutrašnje membrane ili aktivnim izbacivanjem antibiotika iz stanice
b) modifikacijom mjesta djelovanja antibiotika mutacijama u ribosomskim proteinima ili u 16S rRNA
c) enzimske promjene djelatne molekule koje uključuju tri skupine enzima:
   - aminoglikozidne acetiltransferaze (AAT)
   - aminoglikozidne nukleotidiltransferaze (ANT)
   - aminoglikozidne fosfotransferaze (APT)
d) zaustavljanje molekule lijeka vezanjem na 3'-aminoglikozidnu fosfotransferazu (APH(3') (Menard i sur., 1993).

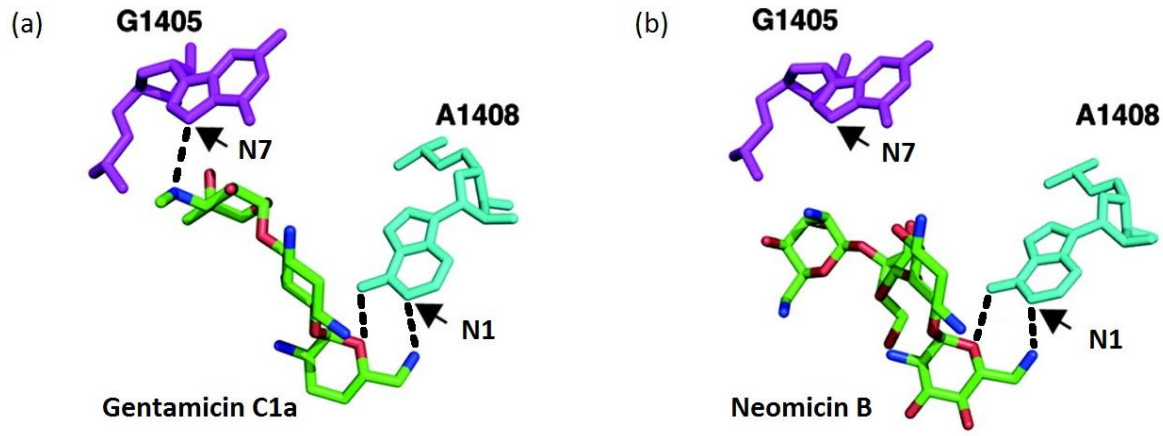
Mikroorganizmi koji proizvode aminoglikozidne antibiotike imaju razvijen još jedan dodatni sustav obrane od vlastitih metabolita, a to je posttranslacijska metilacija rRNA uz S-adenozil-metionin kao kofaktor (Galimand i sur., 2003). Posljedica te posttranslacijske metilacije je sprječavanje vezanja aminoglikozida na ciljno mjesto u molekuli rRNA i očuvanja vjerne sinteze proteina (Zarubica i sur., 2011). Donedavno taj tip rezistencije na aminoglikozide bio je prisutan samo kod bakterijskih vrsta koje proizvode aminoglikozide, no posljednjih je godina sve češće prisutan i u kliničkim sojevima (Lioy i sur., 2014).

Iako se smatra da je enzimska modifikacija najbitniji i najčešći mehanizam rezistencije na aminoglikozidne antibiotike (Shakil i sur., 2007), rezistencija koja se javlja djelovanjem 16S rRNA metil-transferaza je veća i šireg spektra te joj se zbog pridaje sve veća važnost (Wachino i Arakawa, 2012).

1.4.1. 16S rRNA metil-transferaze

Metil-transferaze su enzimi uključeni u razne važne biokemijske reakcije. Unatoč različitostima u njihovim primarnim sljedovima, metil-transferaze koje kao donor metilne skupine koriste S-adenozil-metionin (AdoMet) sadrže devet očuvanih aminokiselinskih motiva, kao i katalitičku domenu koju čini β-ploča okružena α-uzvojnicama srodna Rossmanovom naboru (Galimand i sur., 2003). 16S rRNA metil-transferaze koje pružaju rezistenciju metilacijom ribosomske podjedinice 30S su također ovisne o AdoMet (Savić i sur., 2009).

Metilacijom specifičnih nukleotida koji se nalaze u mjestu vezanja aminoglikozidnih antibiotika na ribosomu, dolazi do ometanja vezanja antibiotika te do pojave rezistencije (Vojnović i sur., 2010). Tako metil-transferaze možemo podijeliti prema ciljnom nukleotidu koji metiliraju na one koje metiliraju G1405, te druge koje metiliraju A1408. Metilacijom skupine N7 G1405 (m7G1405) dolazi do induciranja steričkih interakcija modificirane baze i prstena III te mogućih elektrostatskih odbijanja zbog pozitivnog naboja modificirane baze. Na Slici 1.4.1.1. možemo vidjeti da samo 4,6-DOS aminoglikozidi dolaze u kontakt s bazom G1405, dok su 4,5-DOS aminoglikozidi smješteni pod kutem koji udaljuje molekulu od navedene baze. Modifikacija m7G1405 će tako omogućiti samo rezistenciju na 4,6-DOS aminoglikozide kao što su primjerice gentamicin C1a i tobramicin. S druge strane obje skupine aminoglikozida preko prstena I ostvaruju interakciju s A1408 (Slika 1.4.1.1.). Zbog toga će metilacijom skupine N1 A1408 (m1A1408) doći do onemogućavanja vezanja obje skupine aminoglikozida zbog steričkih ometanja i elektrostatskog odbijanja (Wachino i Arakawa, 2012).



Slika 1.4.1.1. Prostorni prikaz kristalne strukture kompleksa aminoglikozida (a – gentamicin C1a, b – neomicin B) s nukleotidima G1405 I A1408 u ribosomskom A-mjestu. Isprekidane linije označavaju vodikove veze (preuzeto i prilagođeno iz Wachino i sur., 2007).

1.4.1.1. 16S rRNA metil-transferaze iz bakterija koje proizvode aminoglikozide

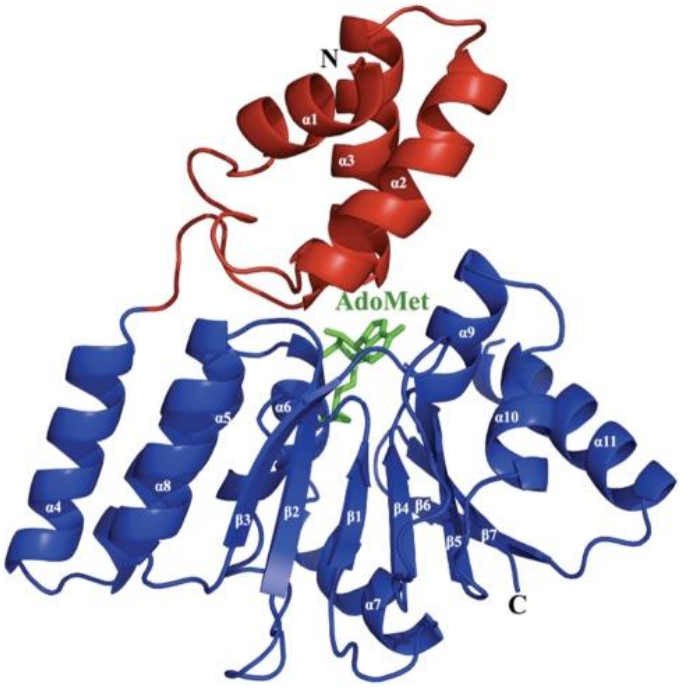
16S rRNA metil-transferaze iz prirodnih proizvođača aminoglikozida, koje se još nazivaju i intrinzičnim metil-transferazama, se mogu podijeliti s obzirom na nukleotid koji metiliraju na N7 G1405 i N1 A1408 metil-transferaze (Wachino i Arakawa, 2012). Drugi način podjele je također zasnovan na istom principu, ali se metil-transferaze pritom svrstavaju u dvije porodice. Porodica Kgm (*engl*. kanamycin-gentamicin methyltransferase) obuhvaća enzime koji metiliraju G1405, a porodica Kam (*engl*. kanamycin-apramycin methyltransferase) enzime koji metiliraju A1408. U pripadnike porodice Kgm ubrajamo KgmB, Sgm, GrmA, Krm, FmrO, Grm, Srm1 te NbrB, dok porodicu Kam čine samo tri metil-transferaze, KamA, KamB i KamC (Vojnović i sur., 2010).

Metil-transferaza Sgm

Sgm (Sisomicin-gentamicin metilaza) je metil-transferaza koju proizvodi *Micromonospora zionensis*, inače prirodni izvor antibiotika G-52 (6-*N*-metilsisomicin). Pripada skupini ^{7}G 16S metil-transferaza koja omogućava rezistenciju na 4,6-disupstituirane deoksistreptaminske aminoglikozide koji obuhvaćaju gentamicin i kanamicin (Kojić i sur., 1992).

Struktura

Struktura enzima se dijeli na dvije domene, N-terminalnu (NTD) i C-terminalnu (CTD). CTD se sastoji od 7 središnjih β-ploča koje sa svake strane okružuju tri α-uzvojnice što je konformacija tipičnog Rossmanovog nabora klase I. Na N-kraju CTD je produžena dodatkom dvije α-uzvojnice koje nisu očuvane u superporodici RFM (*engl.* Rossman-fold methyltransferase). Druga domena, NTD, se sastoji od snopa tri α-uzvojnice s okretom lijeve ruke, nalik na CTD nabor enzima RuvA. Aktivno mjesto enzima se nalazi unutar CTD, gdje dolazi do interakcije s kofaktorom S-adenozil-metioninom (AdoMet) i inhibitorom S-adenozil-histidinom (AdoHcy), dok je NTD uključena u vezanje RNA. Struktura kompleksa metil-transferaze Sgm i kofaktora AdoMet prikazana je na slici (Slika 1.4.1.1.1.).



Slika 1.4.1.1.1. Kompleks Sgm i kofaktora AdoMet. Domene NTD i CTD su obojane crveno i plavo te su označene i sekundarne strukture unutar proteina. Kofaktor AdoMet obojan je zelenom bojom *(*preuzeto i prilagođeno iz Husain i sur., 2010*)*.

CTD sadrži devet očuvanih motiva karakterističnih za superporodicu RFM, pri čemu ostatci iz motiva X, I i IV stupaju u interakciju s kofaktorom AdoMet, dok ostatci iz motiva VI i VIII, te ponekad X, sudjeluju u vezanju supstrata. Ključne aminokiseline za interakciju enzima s kofaktorom su R108 i G135 u motivu I, D156 u motivu II te D182 u motivu III. Potrebno je spomenuti da su upravo R108, D156 i D182 zaslužni za 5 od ukupno 11 vodikovih veza koje metil-transferaza ostvaruje s AdoMet ili AdoHcy (Husain i sur., 2010). Pretpostavlja se da D156 i D182 ostvaruju vezu s hidroksilnim skupinama riboze i adenina čime se omogućuje pozicioniranje adenina kofaktora AdoMet, dok G135 ima ulogu u pozicioniranju metilne skupine (Maravić Vlahoviček i sur., 2008; Savić i sur., 2008).

Kompleks Sgm i podjedinice 30S

Za katalitičku aktivnost metil-transferaze bitne su aminokiseline K199, E205, R236 te E267. Njihovom mutacijom onemogućen je prijenos metilne skupine na supstrat, ali enzim zadržava sposobnost vezanja kofaktora (Maravić Vlahoviček i sur., 2008). Moguće je da metilna skupina K199 iz motiva IV ulazi u interakciju s O^6 atomom baze te uz pomoć hidroksilne skupine S104 pozicionira gvanozin i tako omogućava kontakt s donorom metilne skupine (AdoMet). F64 iz NTD i P229 iz motiva VI oblikuju zidove džepa u kojem dolazi do

vezanja gvanozina te tako vjerojatno sudjeluju u stabilizaciji vezanja ciljne baze u aktivnom mjestu (Husain i sur., 2010).

Analizirane su i interakcije između metil-transferaze Sgm i RNA. Ciljni nukleotid G1405, koji se nalazi unutar uzvojnice 44, skriven je unutar strukture i njegov N^7 atom nije dostupan za metilaciju. Kako bi metilacija bila moguća potrebna je promjena konformacije podjedinice 30S koja najvjerojatnije uključuje preraspodjelu uzvojnice 44 te izbacivanje baze G1405 (Husain i sur., 2010).

1.4.1.2. 16S rRNA metil-transferaze iz patogenih sojeva bakterija

16S rRNA metil-transferaze iz patogenih sojeva, još nazvane i stečenim metil-transferazama, možemo podijeliti, kao i 16S rRNA metil-transferaze iz prirodnih proizvođača antibiotika, prema nukleotidu koji metiliraju. Ponovo ih dijelimo u dvije skupine, N7 G1405 i N1 A1408 metil-transferaze (Wachino i Arakawa, 2012). Osim te podjele, metil-transferaze se mogu svrstati i u dvije porodice. Metil-transferaze koje metiliraju G1405 svrstavamo u porodicu Arm (*engl*. aminoglycoside resistance methyltransferase) čiji su pripadnici ArmA, RmtA, RmtB, RmtC, RmtD, RmtD2, RmtE, RmtF, RmtG i RmtH, dok je u porodici Pam (*engl*. pan-aminoglycoside methyltransferase) zaslužnoj za metilaciju A1408 zasad poznata jedino metil-transferaza NpmA (Wachino i Arakawa, 2012; Lioy i sur., 2014).

Metil-transferaza ArmA

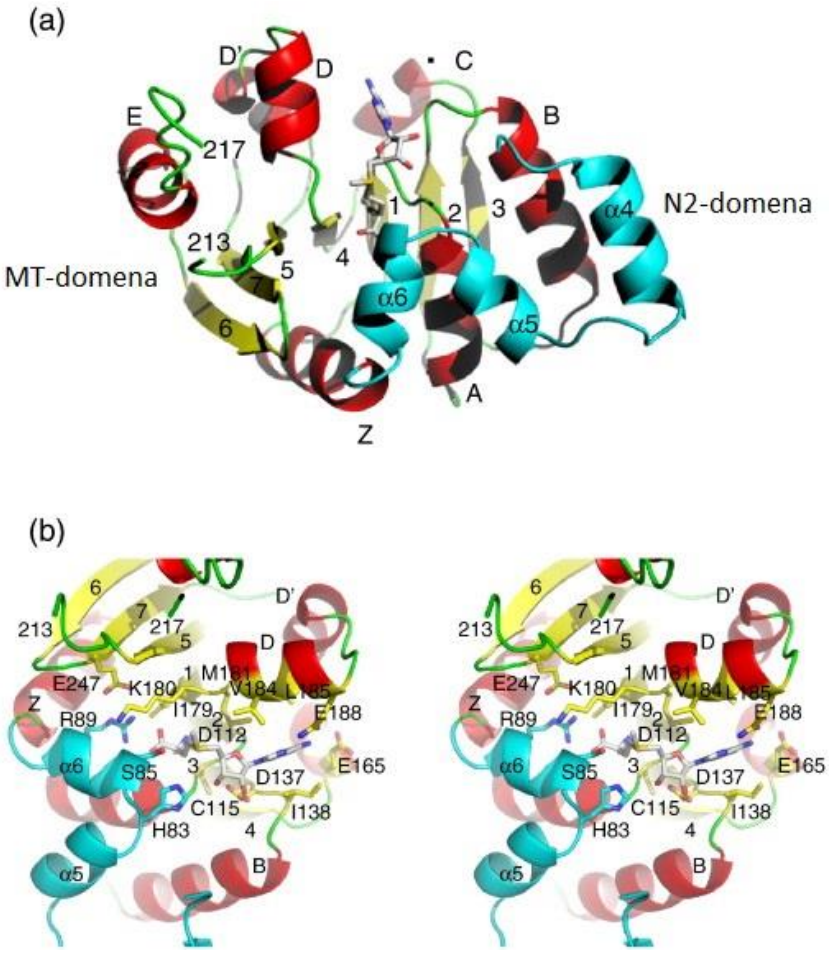
ArmA je prva m^7G 16S rRNA metil-transferaza izolirana iz patogenog soja. Gen *armA* pronađen je unutar plazmida pIP1204 izoliranog iz soja *Klebsiella pneumoniae* BM4536. ArmA pokazuje homologiju sa srodnom skupinom 16S rRNA metil-transferaza iz prirodnih proizvođača antibiotika Kgm, pri čemu stupanj identiteta aminokiselinskog slijeda varira od 21 do 30%, a sličnost aminokiselinskog slijeda od 37 do 47%. Ekspresija metil-transferaze ArmA u bakterijskoj stanici omogućava rezistenciju na 4,6-disupstituirane deoksistreptamine i fortimicin (Galimand i sur., 2003).

Struktura enzima određena je na krnjem obliku proteina ArmA koji počinje od aminokiselinskog ostatka 58 (ArmAt58). Određena je kristalografska struktura u prisutnosti kofaktora AdoMet. Zbog delecije N-terminalnog dijela ArmAt58 došlo je do gubitka domene N1 što je vidljivo na slici (Slika 1.4.2.2.1.) (Schmitt i sur., 2009).

AdoMet je vezan na ArmA u identičnoj orijentaciji kao i AdoHcy na RmtB (Slike 1.4.2.2.3.a i 1.4.2.2.1.b). Većina ostataka koji sudjeluju u vezanju AdoHcy za RmtB očuvani

su i kod vezanja AdoMet za ArmAt58 iz čega možemo zaključiti da domena N1 nije neophodna za vezanje kofaktora. Unatoč tome što enzim ArmAt58 zadržava sposobnost vezanja kofaktora, *in vivo* ne pokazuje katalitičku aktivnost. Nedostatak aktivnosti se javlja ili zbog nemogućnosti vezanja polinukleotidnog supstrata ili stabiliziranja prijelaznog stanja reakcije metilacije (Schmitt i sur., 2009).

Najveće razlike između ArmA i RmtB su položaj α4 uzvojnice u domeni N2 te konformacija petlje koja povezuje β3 i β4 u MT-domeni (Slike 1.4.2.2.2. i 1.4.2.2.1.a). Petlja koja povezuje ploče 3 i 4 sudjeluje u vezanju adeninskog dijela supstrata. Kod RmtB, ta regija (ostatci 157-169) sadržava D157 i V158 koji se direktno vežu na prsten adenina, dok je kod ArmA regija (ostatci 164-174) skraćena za dva aminokiselinska ostatka i zauzima konformaciju uzvojnice (Slika 1.4.2.2.1.a). Takva uzvojnica odgovara uzvojnici C pronađenoj u mnogim drugim metil-transferazama. Zbog razlike u konformaciji, D165 iz ArmA (odgovara D157 u RmtB) je udaljeniji od supstrata i stvara interakciju s N6 adenina posredovanu molekulom vode. Dodatna interakcija također posredovana molekulom vode je ona skupine OH ostatka Y136 i N1 adenina. Razlog ove razlike u načinu vezanja kofaktora između RmtB i ArmAt58 je vjerojatno neobična sekvenca ArmA u ovoj regiji, no ne može se isključiti i mogućnost da je ova konformacija posljedica nedostatka domene N1 (Schmitt i sur., 2009).



Slika 1.4.2.2.1. Struktura ArmAt58. N2 domena prikazana je tirkiznom bojom, a unutar metil-transferazne domene α-uzvojnice su obojane crveno, β-ploče žuto, a petlje zeleno. (a) Cjelokupna struktura ArmAt58 u kompleksu s kofaktorom AdoMet. (b) Stereo prikaz džepa u kojem se veže AdoMet unutar ArmAt58. Aminokiseline bitne za vezanje kofaktora AdoMet prikazane su kao štapići (preuzeto i prilagođeno iz Schmitt i sur., 2009).

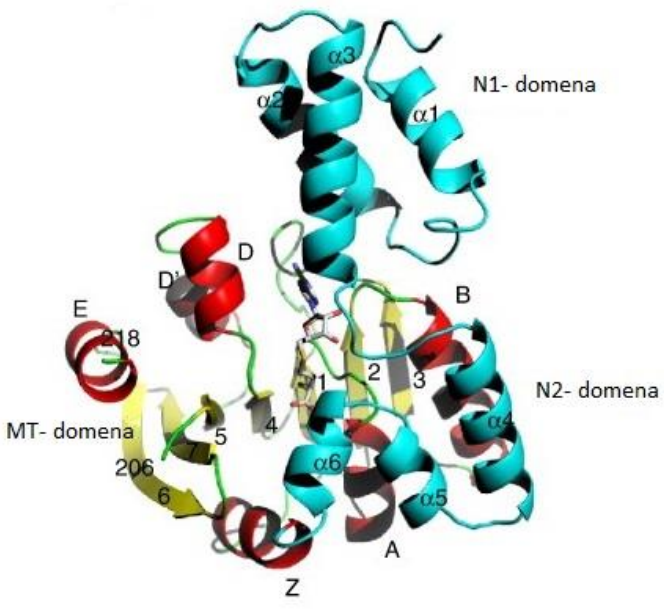
Metil-transferaza RmtA

RmtA je prvi puta je izolirana iz kliničkog soja *Pseudomonas aeruginosa* AR-2 u Japanu. Predviđeni aminokiselinski slijed proteina RmtA pokazao je znatnu sličnost s 16S rRNA metil-transferazama iz aktinomiceta koje proizvode aminoglikozide, posebno s GrmB i Sgm. RmtA uzrokuje visoku razinu rezistencije prema velikom broju aminoglikozidnih antibiotika uključujući amikacin, tobramicin, arbekacin, kanamicin, isepamicin i gentamicin (Yokoyama i sur., 2003).

Metil-transferaza RmtB

RmtB je metil-transferaza izolirana 2002. u Japanu iz kliničkog soja *Serratia marcescens* S-95, koji je pokazivao visoku razinu rezistencije prema nizu aminoglikozidnih antibiotika. Aminokiselinski slijed gena zaslužan za rezistenciju dijeli 82% identiteta s metil-transferazom RmtA, te 29 i 32% s metil-transferazama ArmA i Sgm. Spektar rezistencije obuhvaća 4,6-disupstituirane deoksistreptamine kao što su kanamicin, tobramicin, amikacin, arbekacin, gentamicin, sisomicin i isepamicin (Doi i sur., 2003).

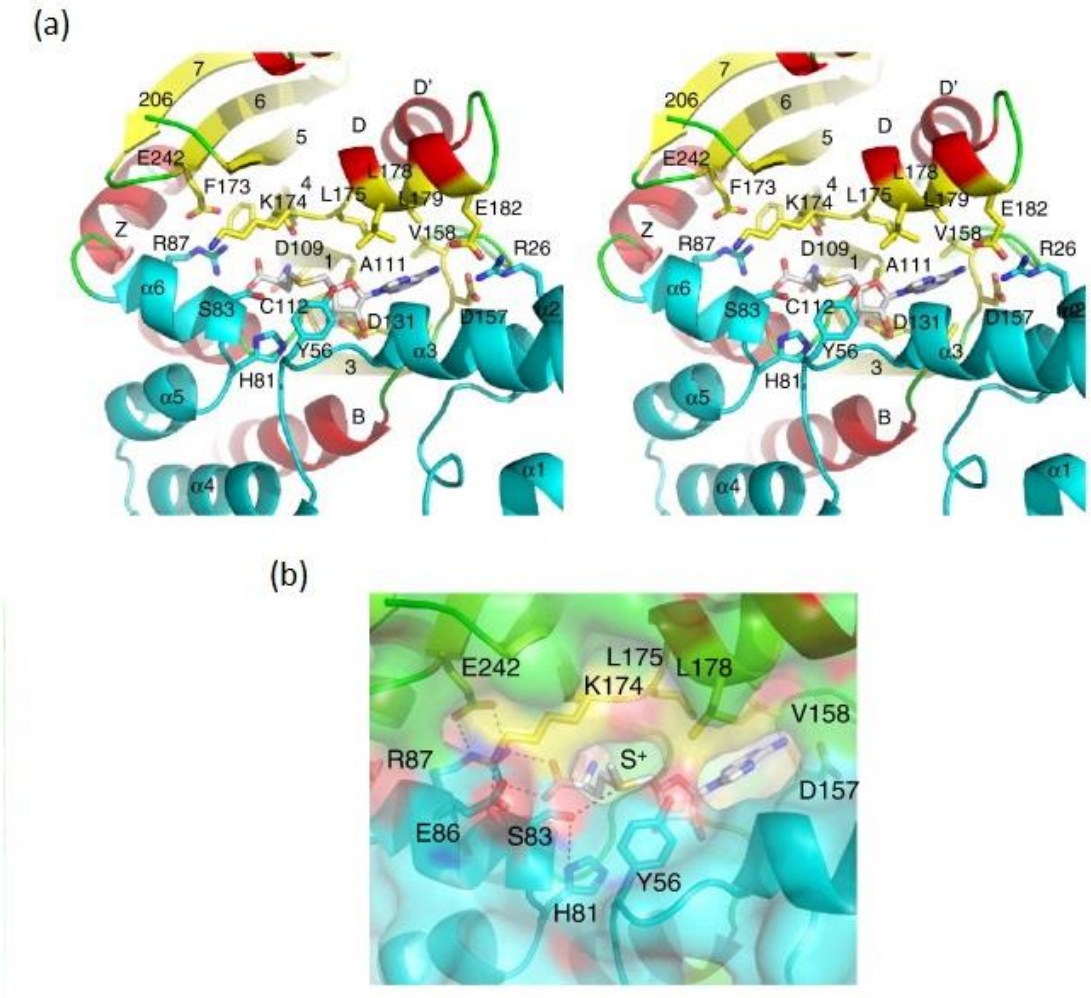
Struktura enzima se sastoji od dva dijela, C-terminalnog i N-terminalnog dijela. Na C-terminalnom dijelu proteina (aminokiseline 89-251), nazvanom metil-transferaznom domenom (MT-domena), nalazi se klasični nabor metil-transferaza klase I koji sadrži 7 β-ploča s uzvojnicama na svakoj strani (Z, A, B i D, D', E). N-terminalni dio sastoji se od domena N1 i N2, koje čine dvije skupine od tri antiparalelne α-uzvojnice (α1 – α6). Domene su smještene sa strane β-ploča 1, 2 i 3 metil-transferazne domene, a uzvojnice α4 i α5 nalaze se na uzvojnicama A i B. Potvrđena je velika sličnost s ostalim metil-transferazama klase I, ali nije nađen homolog N-terminalnog dijela (aminokiseline 2-88), što upućuje na to da je taj dio metil-transferaze specifičan za RmtB (Schmitt i sur., 2009). Struktura RmtB s vezanim inhibitorom AdoHcy prikazana je na slici (Slika 1.4.2.2.2).



Slika 1.4.2.2.2. Cjelokupna struktura RmtB s vezanim inhibitorom AdoHcy. N-terminalna domena obojana je tirkizno te su označene domene N1 i N2. Unutar metil-transferazne domene α-uzvojnice su obojane crveno, β-ploče žuto, a petlje zeleno (preuzeto i prilagođeno iz Schmitt i sur., 2009).

Kofaktor AdoMet ili inhibitor AdoHcy se čvrsto vežu na C-terminalnom dijelu ploča β1 i β2, a u vezanje je još uključena petlja koja se nalazi između ploče 1 i uzvojnice A u kojoj je sadržan motiv I (aminokiseline 109-116) te kisela petlja između ploče 2 i uzvojnice B koja sadrži motiv II (aminokiseline 127-133). Baza kofaktora se smješta između ostataka I132 i L178, a u formiranju adeninskog džepa sudjeluju i L175 i L179 (Slika 1.4.2.2.3.a). Opažene su vodikove veze N6 atoma adenina i O^{δ} D157 te N1 atoma adenina i NH skupine V158. Jedna molekula vode stupa u interakcije s bočnim lancima R26 i E182 te N6 i N7 skupinama adenina. Šupljina u koju se veže AdoHcy ostaje otvorena sa strana N7 i C8 skupina adenina (Slika 1.4.2.2.3.b) (Schmitt i sur., 2009).

Atomi O2' i O3' riboze koordinirani su vodikovom vezom na karboksilnu skupinu D131 iz motiva II. Amino skupina histidina vezana je na karbonilne kisikove atome ostataka A111 i F173. O^{δ} ostatka D109 iz motiva I ostvaruje kontakt posredovan molekulom vode sa amino skupinom histidina, a C112 je pozicioniran na C^{α} histidina. Karboksilna skupina histidina zadržana je bidentatnom vodikovom vezom za bočni lanac ostatka R87 domene N2. U stabiliziranju položaja bočnog lanca ostaka R87 sudjeluje bočni lanac ostatka E242 iz motiva VIII (Slika 1.4.2.2.3.a). Osim navedenih, u strukturi se nalazi i bočni lanac K174 koji visi iznad histidinskog dijela kofaktora. Njegov položaj stabiliziraju interakcije N^{ε} atoma ostatka K174 s O^{δ} ostatka E86 te karbonilnim kisikom ostatka S83. Naposljetku, na atomu sumpora te na riboznoj skupini se nalazi ostatak Y56 koji je smješten između domena N1 i N2. Prikaz molekulske površine jasno pokazuje da jedino atom sumpora na bočnoj strani histidina ostaje dostupan otapalu (Slika 1.4.2.2.3.b) (Schmitt i sur., 2009).



Slika 1.4.2.2.3. Strukture metil-transferaze RmtB. N-terminalna domena obojana je tirkizno te su označene domene N1 i N2. Unutar metil-transferazne domene α-uzvojnice su obojane crveno, β-ploče žuto, a petlje zeleno. (a) Stereo prikaz džepa u kojem se veže AdoHcy unutar RmtB. Aminokiseline uključene u vezanje inhibitora AdoHcy (opis u tekstu) prikazane su štapićastim strukturama. (b) Transparentni prikaz molekulske površine RmtB iz P21 kristala vezanih na AdoMet. Ovaj prikaz ostvaren je superimpozicijom RmtB s vezanim AdoHcy na ArmA u kompleksu s AdoMet. Označene su aminokiseline bitne za vezanje kofaktora. Ugljikovi atomi unutar MT-domene su prikazani žutom bojom, a oni u N-domeni plavom, dok su kisikovi atomi crveni. Bitne vodikove veze prikazane su isprekidanim linijama (preuzeto i prilagođeno iz Schmitt i sur., 2009).

Metil-transferaza RmtC

Metil-transferaza RmtC izolirana je iz kliničkog soja *Proteus mirabilis* ARS68 2003. godine u Japanu. RmtC pokazuje relativno niski stupanj identiteta u aminokiselinskom slijedu s ostalim metil-transferazama izoliranim iz patogenih sojeva bakterija (<29%) te metil-transferazama iz prirodnih proizvođača (<28%) (Wachino i sur., 2006).

1.5. Biološki učinak rezistencije na bakterijsku stanicu

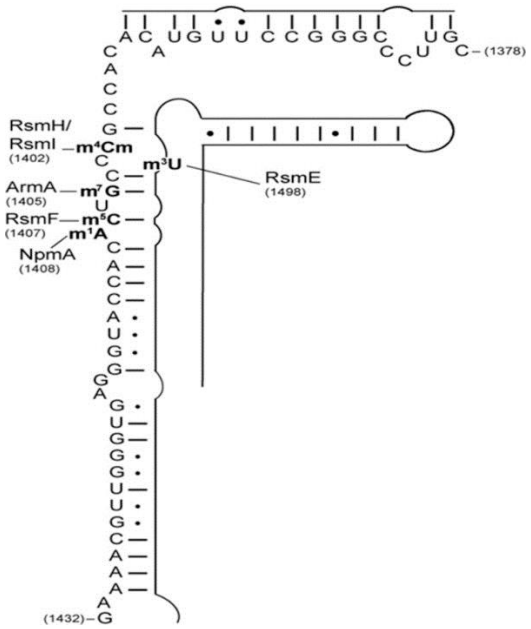
Pretpostavlja se da je većina mehanizama rezistencije povezana s određenim biološkim učinkom (*engl*. fitness cost) na stanicu, koji utječe na pojavnost i raširenost rezistencije te njenu perzistentnost u odsutnosti selektivnog pritiska, odnosno antibiotika (Andersson i Hughes, 2010). Smanjena sposobnost rasta bakterije, koja se javlja zbog navedenog biološkog učinka mutacija koje prenose rezistenciju, može dovesti i do smanjenja virulencije, prijenosa rezistencije ili brzine rasta (Andersson i Levin, 1999). Razumijevanje bioloških učinaka povezanih s rezistencijom na antibiotike bi moglo omogućiti predviđanje pojave rezistencije te pomoći u razvijanju strategija za smanjenje porasta rezistencije (Paulander i sur., 2009).

1.5.1. Biološki učinak 16S rRNA metil-transferaza na bakterijsku stanicu

Jedina funkcija 16S rRNA metil-transferaza je zaštititi bakteriju od djelovanja aminoglikozidnih antibiotika. S druge strane postoje brojne endogene metil-transferaze koje su važne za osiguravanje strukture i funkcije zrele rRNA. Modifikacije su potrebne kako bi došlo do pravilnog sazrijevanja podjedinice 30S, podešavanja lokalne rRNA strukture i interakcija među molekulama RNA. Obje vrste metil-transferaza djeluju na filogenetički očuvanim i funkcionalno važnim regijama rRNA (Gutierrez i sur., 2012; Lioy i sur., 2014).

Kod bakterija vrste *Escherichia coli*, 16S rRNA je modificirana s 10 endogenih metil-transferaza i jednom pseudouridinskom sintazom. U dekodirajućem mjestu gdje se vežu aminoglikozidi dolazi do metilacije nekoliko nukleotida, uključujući C1402, C1407, U1498, A1518 i A1519 (Gutierrez i sur., 2012). Endogene metil-transferaze koje metiliraju C1402 su RsmI i RsmH, dok RsmE metilira U1498, a RsmF C1407 (Lioy i sur., 2014).

Ribosomske metil-transferaze koje uzrokuju rezistenciju na aminoglikozide metiliraju nukleotide A1408 i G1405 te mogu uzrokovati smanjenje endogene metilacije ili njen potpuni izostanak. Opažena je smanjena metilacija endogenom metil-transferazom RsmF kod *E. coli* koja ima eksprimiranu metil-transferazu Sgm (Čubrilo i sur., 2009). Utvrđeno je i da metil-transferaze ArmA, RmtB, RmtC te NpmA također blokiraju aktivnost RsmF na mjestu C1407 (Gutierrez i sur., 2012; Lioy i sur., 2014), dok ArmA još ometa i metilaciju C1402 kataliziranu s RsmI. Mjesta endogene i egzogene metilacije prikazana su Slici 1.5.1.1.



Slika 1.5.1.1. Shematski prikaz sekundarne strukture uzvojnice 44 iz 16S rRNA. Naznačena su mjesta endogene (RsmH, RsmI, RsmF i RsmF) i egzogene (ArmA i NpmA) metilacije (preuzeto i prilagođeno iz Lioy i sur., 2014).

Nedostatak endogene metilacije može imati različiti biološki učinak na bakterijsku stanicu. Istraživanja su pokazala da stjecanje gena *rmtC* i *npmA* nema ili ima vrlo mali biološki učinak na stanicu (Gutierrez i sur., 2012; Lioy i sur., 2014), dok gen *armA* predstavlja veliki nedostatak bakterijskoj stanici (Lioy i sur., 2014). Zbog toga što je biološki učinak vrlo relativan te ovisi i o okolišnim uvjetima, potrebno ga je ispitati u raznim uvjetima (Andersson i Hughes, 2010).

1.6. Preživljenje *E. coli* u stresnim uvjetima

Prilagodba bakterijske stanice na stresne uvjete zahtijeva aktivaciju ekspresije gena koji će omogućiti život u promijenjenim fiziološkim uvjetima. Adaptivne promjene koje omogućavaju prilagodbu na razne stresne uvjete su povezane sa sigma (σ) faktorima, točnije može doći do induciranja novih σ faktora ili do regulacije njihovih aktivnosti. Tako se odgovor bakterije na stres najčešće odnosi na ekspresiju specifične skupine gena kao rezultat izloženosti pojedinom stresu. Fiziološka prilagodba bakterija na takav okoliš je reverzibilna i ekspresija gena nestaje prestankom ili neutralizacijom stresnih uvjeta (Storz i Hengge, 2011).

Do induciranja sigma faktora (RpoS ili σ^S) u *E. coli* kao odgovora na stres dolazi u raznim uvjetima kao što su gladovanje, hiperosmolarnost, pad pH ili promjena vrijednosti temperature u veće ili manje od optimalne (Weber i sur., 2005).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Rezistencija na antibiotike postaje rastući problem diljem svijeta te se sve više napora ulaže u smanjenje njene pojave i širenja. Kako bismo mogli djelovati na smanjenje rezistencije na aminoglikozide potrebno je utvrditi uzrokuju li metil-transferaze fiziološke slabosti bakterijskoj stanici koja ih stvara.

Svrha rada je utvrditi postoji li biološki učinak 16S rRNA metil-transferaza koje uzrokuju rezistenciju na aminoglikozidne antibiotike na preživljenje stanica bakterije *E. coli* te tako pridonijeti istraživanju mehanizama rezistencije na aminoglikozide.

Cilj rada je usporediti preživljenje bakterije *E. coli* soja DH5α koji sadrži plazmid s genom za jednu od 16S rRNA metil-transferaza, u odnosu na bakterije istog soja koje sadrže prazan plazmid, u uvjetima povećane osmolarnosti ili niskog pH. Metil-transferaze koje su ispitane su Sgm, ArmA, RmtA, RmtB i RmtC.

Pojedinačni ciljevi rada su sljedeći:

- priprema kompetentnih stanica *E. coli* DH5α
- transformacija bakterijskih stanica *E. coli* DH5α praznim vektorom pBBR1MCS-4 te vektorima pBBR1MCS-4 koji sadrže gene za ispitivane metil-transferaze
- uzgoj noćnih kultura transformiranih stanica
- primjena uvjeta povećane osmolarnosti ili niskog pH na bakterijske stanice
- uzorkovanje, razrjeđivanje uzoraka i uzgoj bakterijskih stanica na krutom mediju
- utvrđivanje preživljenja bakterija u stresnim uvjetima pomoću broja poraslih kolonija na krutom mediju prije i poslije primjene stresa
- analiza i usporedba dobivenih rezultata

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Standardne kemikalije

- ampicilin (Sigma)
- dimetilsulfoksid, DMSO (Sigma)
- etanol (Sigma)
- kloridna kiselina, HCl (Kemika)
- magnezijev klorid, $MgCl_2$ (Sigma)
- natrijev klorid, NaCl (Sigma)
- polietilenglikol, PEG 8000 (Sigma)

3.1.2. Hranjivi mediji

3.1.2.1. Kruti medij

Difco™ LB Agar, Lennox (Difco)

tripton ..... 10 g/L

ekstrakt kvasca ..... 5 g/L

natrijev klorid, NaCl..... 10 g/L

agar ..... 15 g/L

pH 7,0 ± 0,2 pri 25°C

3.1.2.2. Tekući medij

Difco™ LB Broth, Lennox (Difco)

tripton ..... 10 g/L

ekstrakt kvasca ..... 5 g/L

natrijev klorid, NaCl..... 5 g/L

pH 7,0 ± 0,2 pri 25°C

3.1.2.3. Dodatak medijima

- ampicilin u konačnoj koncentraciji 100 mg/L

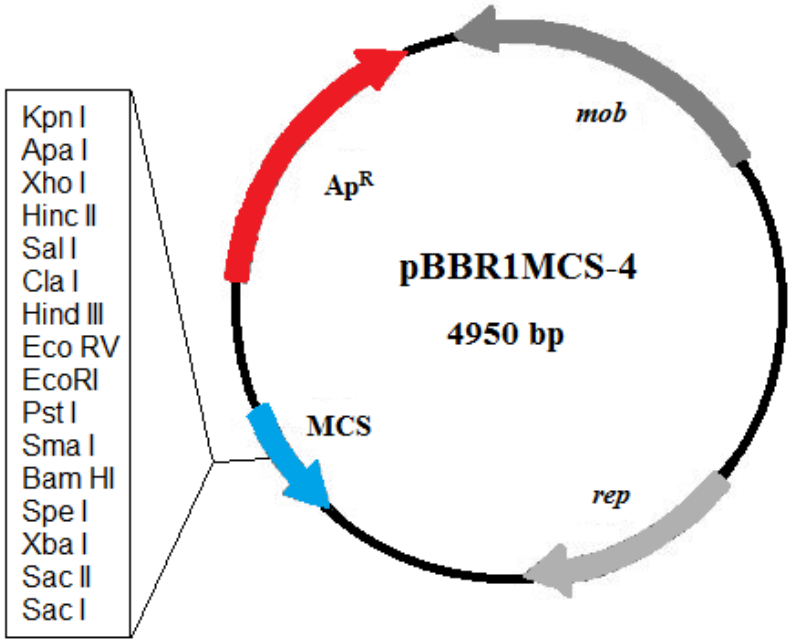
3.2. Bakterijski soj i plazmidi

Bakterijski soj korišten za ispitivanje preživljenja *E. coli* u stresnim uvjetima je **DH5α** (*fhuA2 lac(del)U169 phoA glnV44 Φ80' lacZ(del)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17).*

Kako bi se usporedilo preživljenje bakterija bez gena za metil-transferazu i onih koje sadrže takav gen, soj je transformiran plazmidom **pBBR1MCS-4**, pri čemu je jedan klonirani soj transformiran praznim plazmidom, a ostali plazmidima koji su imali kloniran gen koji kodira jednu od ispitivanih 16S rRNA metil-transferaza (Sgm, ArmA, RmtA, RmtB, RmtC).

DH5α je soj koji ima visoku učinkovitost transformacije te kao i mnogi drugi sojevi korišteni za kloniranje sadrži niz značajki koje ga čine korisnim u rekombinantnoj DNA tehnologiji. Mutacijom gena *endA1* dolazi do inaktivacije endonukleaze koja je zaslužna za razgradnju plazmidne DNA, dok se mutacijom *hsdR17* eliminira restrikcijska endonukleaza restrikcijsko-modifikacijskog sustava *E. coli* te se time sprječava razgradnja DNA koja je metilirana DNA metil-transferazom istog sustava. Inaktivacija gena *recA* uklanja mogućnost homologne rekombinacije što djelomično oslabljuje soj, ali istovremeno smanjuje pojavu delecija te multimerizaciju plazmida (Carnes i sur., 2006).

Plazmid **pBBR1MCS-4**, korišten za transformaciju bakterija, je izveden iz plazmida pBBR1MCS (Kovach i sur., 1995). Navedeni plazmid pBBR1MCS konstruiran je iz plazmida pBBR1 izoliranog iz *Bordetella bronchiseptica.* U svojoj strukturi pBBR1 sadrži dva otvorena okvira čitanja (ORF), od koji je jedan uključen u replikaciju plazmida *rep,* a drugi u mobilizaciju *mob* (Antoine i Locht, 1992). Modifikacijom plazmida dobiveno je višestruko mjesto za kloniranje (MCS) unutar gena *lacZα* te gen za rezistenciju na ampicilin Ap^R koji služi kao selekcijski biljeg. Prednosti plazmida su njegova relativno mala veličina (4,95 kpb), širok spektar mogućih domaćina te kompatibilnost s plazmidima skupina IncP, IncQ i IncW (Kovach i sur., 1995). Mapa plazmida prikazana je na Slici 3.2.1.1.



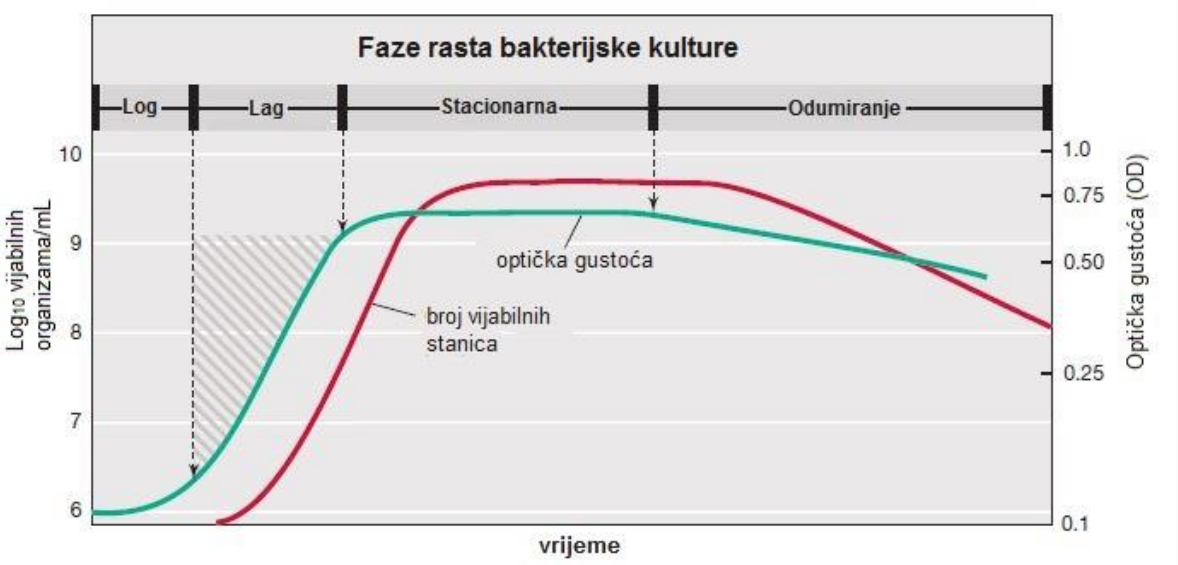
Slika 3.2.1.1. Mapa plazmida pBBR1MCS-4 (preuzeto i prilagođeno iz Kovach i sur., 1995).

3.3. Hranjive podloge i uzgoj bakterija

3.3.1. Faze rasta bakterijske kulture

Krivulja bakterijskog rasta, prikazana na slici 3.3.1.1., opisuje ciklus rasta bakterija u kulturi te je podijeljena na četiri karakteristične faze:

1) *lag faza* – bakterije se prilagođavaju okolišu, nisu sposobne za diobu pa ne dolazi do rasta bakterijske populacije, ali dolazi do sinteze molekula RNA, enzima i sl.;
2) *eksponencijalna* ili *log faza* – eksponencijalni rast bakterijske kulture pri čemu se stanična masa udvostručava svakom diobom;
3) *stacionarna faza* – broj stanica je konstantan, biosintetski i metabolički procesi se nastavljaju, ali se rast drastično usporava zbog smanjene količine hranjivih tvari i akumulacije toksičnih produkata u mediju;
4) *faza odumiranja* – javlja se kao posljedica potpunog iscrpljivanja hranjivih tvari, znatno je sporija od brzine eksponencijalnog rasta te se stanice mogu održati u takvoj kulturi mjesecima pa i godinama (Madigan i sur., 2015).



Slika 3.3.1.1. Tipična krivulja rasta bakterijske kulture. Broj vijabilnih stanica označava broj stanica u kulturi sposobnih za reprodukciju. Optička gustoća je kvantitativna mjera raspršenja svjetlosti u tekućoj kulturi, a povećava se s porastom broja stanica (preuzeto i prilagođeno iz Madigan i sur., 2015).

Inkubacijom preko noći (15-24 sata) dobivamo zasićenu kulturu u stacionarnoj fazi, čija je optička gustoća na 600 nm (OD_{600}) veća od 1.

Cilj uzgoja takve noćne kulture je dobiti bakterije u stacionarnoj fazi, kada je njihov broj relativno stalan, a presađivanjem na svježu hranjivu podlogu, stanice su sposobne za daljnji rast i dijeljenje. Noćna kultura je služila kao pretkultura za ispitivanje preživljenja stanica *E. coli* u stresnim uvjetima (Ambriović Ristov i sur., 2007).

3.3.2. Rast na tekućoj hranjivoj podlozi

Bakterije se mogu uzgajati na minimalnoj tekućoj podlozi određenog sastava (tzv. minimalni definirani medij), koja sadrži izvor ugljika u obliku šećera ili glicerola te mineralne soli, a po potrebi može sadržavati i aminokiseline (40-100 μg/mL).

Za uzgoj bakterija se mogu koristiti i bogate hranjive podloge neodređenog sastava koje u sastavu imaju kvaščeve, mesne ili mliječne ekstrakte. Takva podloga je i LB (Luria-Bertanijev) medij, koji se izrađuje iz triptona, ekstrakta kvasca i otopine natrijeva klorida u ultračistoj vodi, dok se pH podešava dodatkom natrijeva hidroksida. U upotrebi su i gotove smjese sastojaka, npr. LB – Lennox, koje se koriste kako bi se što bolje optimizirali uvjeti za uzgoj i rast bakterija.

Ukoliko uzgajamo bakterije koje u sebi sadrže plazmid s genom za otpornost na neki antibiotik, u medij je potrebno dodati i odgovarajući antibiotik kako bi se omogućila selekcija bakterija s plazmidom i spriječio gubitak plazmida (Ambriović Ristov i sur., 2007).

Hranjivi medij, plastični pribor i stakleno posuđe steriliziraju se autoklaviranjem. Materijal je steriliziran brzim zagrijavanjem do kojeg dolazi zbog oslobađanja kondenzacijske topline na hladnoj površini materijala. Uvjeti temperature, tlaka i vremena, koji moraju biti postignuti za sve hranjive podloge, otopine i pufere, su: 121°C, 1.1 bar (ili 100 kPa), 20 min. Termolabilne otopine, poput otopina antibiotika, ne smiju se sterilizirati autoklaviranjem pa se steriliziraju filtracijom kroz filter veličine pora 0,22 μm i dodaju hranjivom mediju nakon hlađenja.

3.3.3. Rast na krutoj hranjivoj podlozi

Kruta hranjiva podloga se sastoji od hranjive podloge Luria-Bertani i agara koji su prethodno sterilizirani autoklaviranjem. Smjesa se ulijeva u Petrijeve zdjelice do polovice volumena nakon čega se ostavi na sobnoj temperaturi da se skrutne i ohladi. Tako priređene ploče pohranjuju se na 4°C, a ako sadržavaju antibiotik kao selektivni biljeg treba ih iskoristiti unutar 14 dana.

3.4. Transformacija bakterija

U normalnim uvjetima, DNA zbog svoje hidrofilnosti ne može proći staničnu membranu. Stvaranjem kompetentnih stanica omogućava se prolaz strane DNA u stanicu kroz nastale pore u membrani (Das i Dash, 2015). Za transformaciju bakterija u laboratoriju koristili smo metodu toplinskog šoka koja uključuje korištenje TSS (*engl.* transformation storage solution) pufera koji sadrži polietilenglikol (PEG 8000), dimetilsulfoksid (DMSO) te dvovalentne katione u obliku magnezijevih iona (Chung i sur., 1989). Prisutnost Mg^{2+} i DMSO povećava permeabilnost bakterijske membrane, dok PEG štiti negativni naboj prisutan na molekuli DNA i staničnoj membrani bakterije te tako smanjuje njihovo odbijanje. Toplinski šok koji slijedi nakon inkubacije kompetentnih stanica i strane DNA uzrokuje unos DNA u stanicu (Das i Dash, 2015).

3.4.1. Priprema kemijski kompetentnih stanica

Noćna kultura soja *E. coli* DH5α je razrijeđena LB-medijem u omjeru 1:100 te su stanice inkubirane u zračnoj tresilici (termostatirana zračna tresilica MAXQ 4000,

Thermoscientific) na 37°C dok se nije postigla optička gustoća na 600 nm (OD_{600}) u rasponu 0,2 - 0,5. Optička gustoća je mjerena na čitaču mikrotitarskih pločica Victor$^{2™}$ 1420 Multilabel Counter, *Perkin Elmer/ Wallac*. Kako bi se zaustavio rast, kultura je podijeljena u dvije plastične epruvete Falcon (50 mL) te je stavljena u led na 15 min. Nakon centrifugiranja 10 min na 6500 g (centrifuga Jouan MR23i, *Thermoelectron corporation*) pri 4°C, pažljivo se ukloni supernatant, a stanice se resuspendiraju u unaprijed ohlađenom TSS puferu (LB medij koji sadrži 10% PEG 8000, 5% DMSO i 50 mM Mg^{2+} pri pH 6.5). Volumen dodanog pufera mora biti 10% volumena odstranjene kulture. Stanice su zatim podijeljene u uzorke od 100 µL u prethodno ohlađenim plastičnim epruvetama volumena 1,5 mL te su do uporabe pohranjene na -80°C.

3.4.2. Transformacija

Zamrznute kompetentne stanice (100 µL) su odmrznute na sobnoj temperaturi, dodano im je 1 µL plazmida, dobro su promiješane na mješaču (Vortex Genius 3, IKA®) i ostavljene stajati u ledu 20 min. Stanice su zatim izložene toplinskom šoku 2 min na 42°C u termo-bloku (Eppendorf Thermomixer comfort 1,5 mL), nakon čega su vraćene u led na 2 min. Dodano im je 1 mL LB-medija pa su transformirane stanice inkubirane u tresilici 1 h na 37°C (termostatirana zračna tresilica MAXQ 4000, *Thermoscientific*). Zadnji korak je nasađivanje stanica na kruti medij s dodatkom ampicilina na kojemu će rasti samo transformirane bakterije s plazmidom.

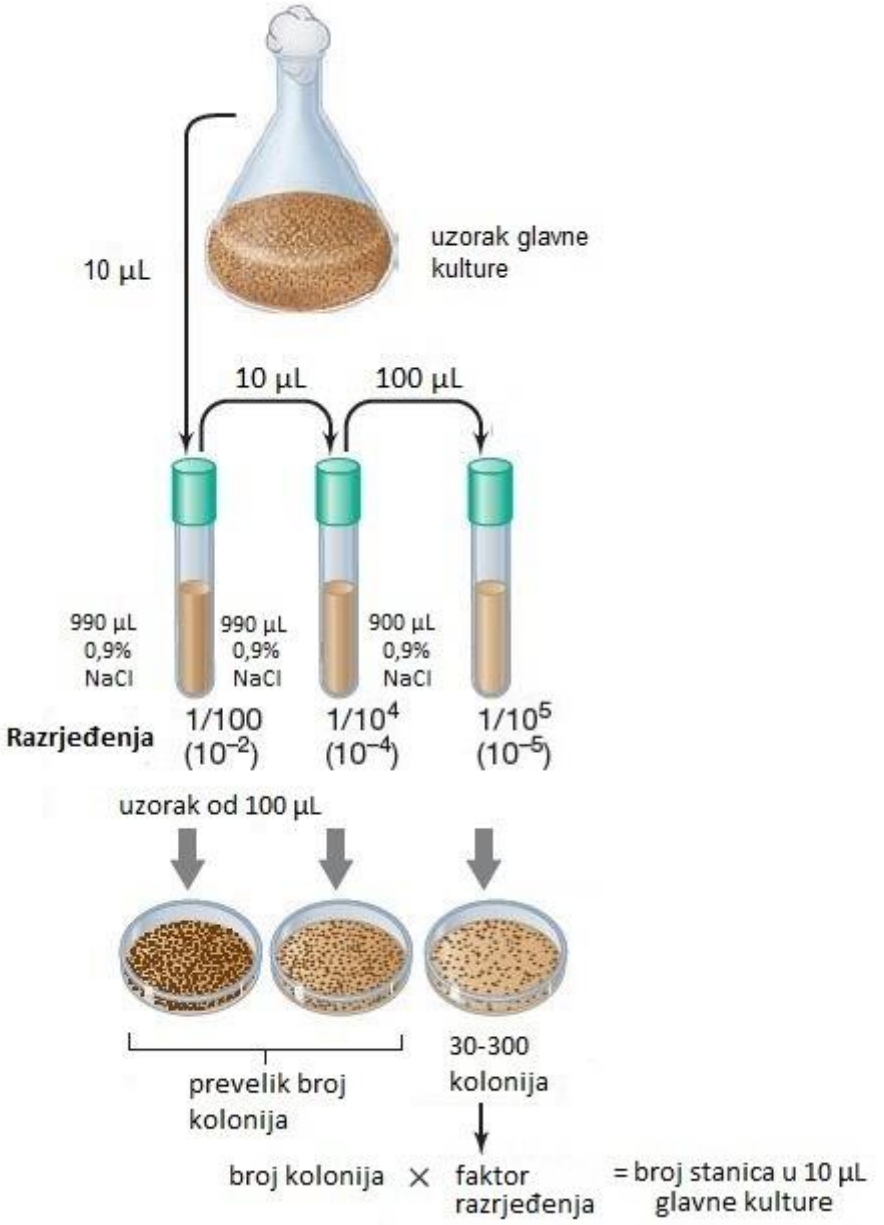
3.5. Određivanje preživljenja u stresnim uvjetima *E. coli* divljeg tipa i *E. coli* koja sadrži gen za 16S rRNA metil-transferazu koja uzrokuje rezistenciju na aminoglikozide

Preživljenje stanica određeno je uzgojem bakterijskih stanica u LB-mediju uz dodatak ampicilina nakon čega su primijenjeni stresni uvjeti. Bakterijske stanice su bile izlagane dvama različitim oblicima stresa, osmotskom i kiselinskom stresu. Ispitivanje je provedeno u barem tri neovisna pokusa u duplikatu.

Noćna kultura je pripremljena inokulacijom male količine LB-medija s ampicilinom (konačna koncentracija 100 µg/mL) transformiranim bakterijama *E. coli* DH5α/pBBR1MCS-4 te je inkubirana preko noći u zračnoj tresilici na 37°C. U plastične epruvete volumena 50 mL dodano je 10 mL LB-medija s dodatkom ampicilina (100 µg/mL) koji je zatim inokuliran noćnom kulturom u omjeru 1:100. Tako pripravljena glavna kultura je nakon toga inkubirana

uz protresanje na 37°C (termostatirana zračna tresilica MAXQ 4000, *Thermoscientific*) dok optička gustoća na 600 nm (OD_{600}) nije postignula vrijednost ~ 0,3. Optičku gustoću mjerimo na optičkom čitaču (Victor$^{2™}$ 1420 Multilabel Counter, *Perkin Elmer/ Wallac*).

Kako bi se utvrdio početni broj stanica uzeto je 10 µL glavne kulture prije primjene stresa (t=0), napravljen je niz razrjeđenja korištenjem 0,9% otopine natrijeva klorida, a uzorak razrijeđene kulture nanesen je i razmazan na kruti medij s dodatkom ampicilina koncentracije 100 µL/mL kao što je prikazano na Slici 3.5.1.



Slika 3.5.1. Postupak utvrđivanja broja preživjelih (vijabilnih) stanica korištenjem niza razrjeđenja uzorka i nasađivanjem na kruti medij. Faktor razrjeđenja je recipročna vrijednost razrjeđenja otopine (preuzeto i prilagođeno iz Madigan i sur., 2015).

3.5.1. Osmotski stres

Osmotski stres je primijenjen dodatkom 6 M otopine natrijeva klorida čime je postignuta konačna koncentracija od 300 mM u glavnoj kulturi. Bakterije su zatim inkubirane 3 sata u termostatiranoj zračnoj tresilici (termostatirana zračna tresilica MAXQ 4000, *Thermoscientific*) pri 37°C.

Uzet je uzorak iz kulture (t=3 h), a broj preživjelih stanica određen je pomoću niza razrjeđenja kao što je prikazano na slici 3.5.1. i uzgojem stanica na krutom mediju s dodatkom ampicilina (100 μg/mL) u inkubatoru (Stuart® orbital incubator I SI 500 I).

3.5.2. Kiselinski stres

Prije primjene kiselinskog stresa potrebno je centrifugirati 10 mL glavne kulture 10 min na 6500 g (centrifuga Jouan MR23i, *Thermoelectron corporation*). Supernatant je dekantiran, a talog stanica je resuspendiran u 10 mL LB-medija pH 3. Nakon toga slijedi inkubacija na 37°C (termostatirana zračna tresilica MAXQ 4000, *Thermoscientific*) u trajanju od jednog sata.

Uzorak iz kulture (t=1 h) je razrijeđen te se zatim nanosi na kruti medij s dodatkom ampicilina kao što je prikazano na slici 3.5.1., a ploče su inkubirane preko noći u inkubatoru (Stuart® orbital incubator I SI 500 I).

4. REZULTATI

Kako bi se utvrdilo utječe li prisutnost ribosomskih metil-transferaza koje uzrokuju rezistenciju na aminoglikozidne antibiotike na preživljenje stanica *E. coli* u stresnim uvjetima, provedena je usporedba preživljenja bakterija soja *E. coli* DH5α koje sadrže prazni plazmid pBBR1MCS-4 (predstavlja divlji tip bakterije) s bakterijama transformiranim istim plazmidom koji u sebi nosi gen koji kodira jednu od 16S rRNA metil-transferaza (RmtA, RmtB, RmtC, ArmA, Sgm). Svako je ispitivanje provedeno u barem tri neovisna pokusa u duplikatu.

4.1. Osmotski stres

Vrijednosti broja preživjelih stanica za svaki od transformiranih sojeva, u uvjetima povećane osmolarnosti, dane su u tablicama (Tablica 4.1.1.-4.1.6.). Broj stanica izražen je relativnom vrijednošću (%) u odnosu na početni broj stanica (t=0). Također, u tablicama je navedena i prosječna vrijednost dobivenih rezultata te njena standardna devijacija.

Tablica 4.1.1. Relativno preživljenje za soj *E. coli* DH5α/pBBR1MCS-4

t/h	**DH5α/pBBR1 MCS-4**	**DH5α/pBBR1 MCS-4**	**DH5α/pBBR1 MCS-4**		
0	100	100	100	$\bar{x}$	$\boldsymbol{\sigma}$
3	1890	1290	2030	1736,7	393,11

Tablica 4.1.2. Relativno preživljenje za soj *E. coli* DH5α/pBBR1MCS-4-*rmtA*

t/h	**DH5α/pBBR1 MCS-4-*rmtA***	**DH5α/pBBR1 MCS-4-*rmtA***	**DH5α/pBBR1 MCS-4-*rmtA***	**DH5α/pBBR1 MCS-4-*rmtA***		
0	100	100	100	100	$\bar{x}$	$\boldsymbol{\sigma}$
3	739,5	904	625	824,5	773,25	119,50

Tablica 4.1.3. Relativno preživljenje za soj *E. coli* DH5α/pBBR1MCS-4-*rmtB*

t/h	**DH5α/pBBR1 MCS-4-*rmtB***	**DH5α/pBBR1 MCS-4-*rmtB***	**DH5α/pBBR1 MCS-4-*rmtB***	**DH5α/pBBR1 MCS-4-*rmtB***	**DH5α/pBBR1 MCS-4 -*rmtB***		
0	100	100	100	100	100	$\bar{x}$	$\boldsymbol{\sigma}$
3	459,2	1022	667,5	1324	707,5	836,04	338,98

Tablica 4.1.4. Relativno preživljenje za soj *E. coli* DH5α/pBBR1MCS-4-*rmtC*

t/h	**DH5α/pBBR1 MCS-4-*rmtC***	**DH5α/pBBR1 MCS-4-*rmtC***	**DH5α/pBBR1 MCS-4-*rmtC***		
0	100	100	100	$\bar{x}$	σ
3	1314	1127	1295	1245,3	102,92

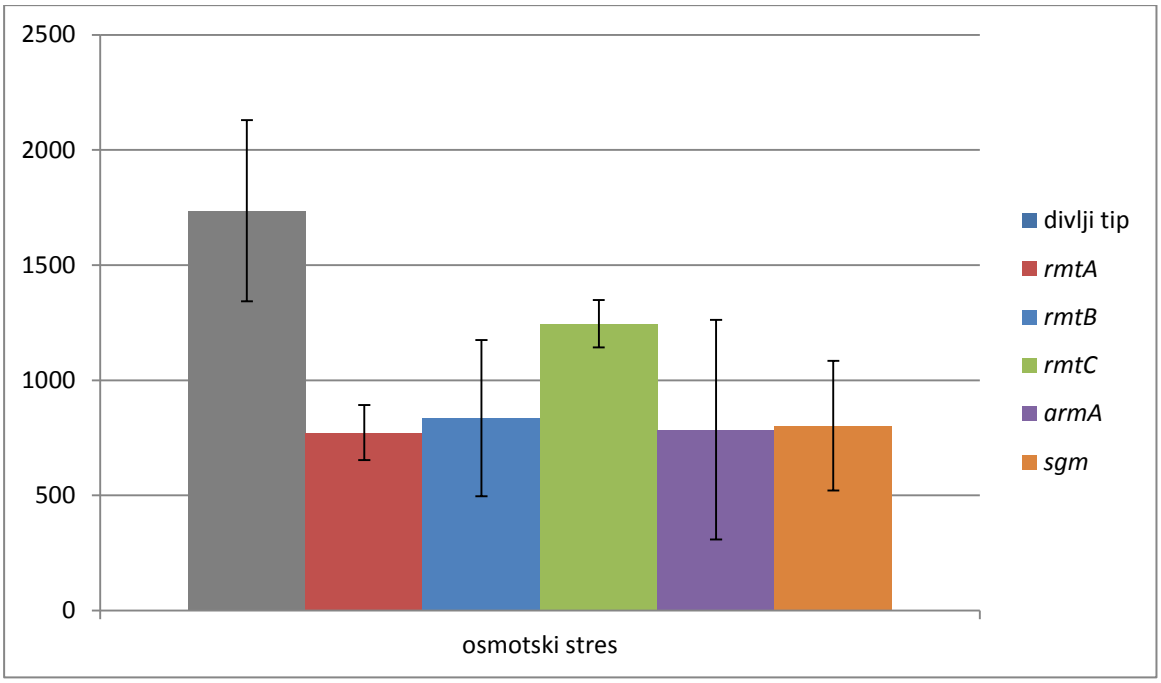
Tablica 4.1.5. Relativno preživljenje za soj *E. coli* DH5α/pBBR1MCS-4-*armA*

t/h	**DH5α/pBBR1 MCS-4-*armA***	**DH5α/pBBR1 MCS-4-*armA***	**DH5α/pBBR1 MCS-4-*armA***	**DH5α/pBBR1 MCS-4-*armA***	**DH5α/pBBR1 MCS-4-*armA***		
0	100	100	100	100	100	$\bar{x}$	σ
3	285,7	411,9	1103	699,1	1428	785,54	477,09

Tablica 4.1.6. Relativno preživljenje za soj *E. coli* DH5α/pBBR1MCS-4-*sgm*

t/h	**DH5α/pBBR1 MCS-4-*sgm***	**DH5α/pBBR1 MCS-4-*sgm***	**DH5α/pBBR1 MCS-4-*sgm***	**DHα/pBBR1 MCS-4-*sgm***		
0	100	100	100	100	$\bar{x}$	σ
3	1199	673,4	549,3	789,8	802,9	281,75

Za bolju usporedbu bakterijskih stanica koje sadrže prazan plazmid (divlji tip) i ostalih bakterijskih stanica koje eksprimiraju jednu od ispitivanih 16S rRNA metil-transferaza (RmtA, RmtB, RmtC, ArmA, Sgm), vrijednosti preživljenja su prikazane grafičkim prikazom (Slika 4.1.1.). Iz navedenog grafičkog prikaza možemo primijetiti da su vrijednosti preživljenja sojeva koji eksprimiraju ribosomske metil-transferaze niže od vrijednosti preživljenja soja *E. coli* s praznim plazmidom koji predstavlja divlji tip.



Slika 4.1.1. Usporedba preživljenja u uvjetima osmotskog stresa bakerijskih stanica *E. coli* divljeg tipa s onima koji sadrže gen za 16S rRNA metil-transferazu koja uzrokuje rezistenciju na aminoglikozidne antibiotike.

4.2. Kiselinski stres

Rezultati ispitivanja preživljenja bakterijskih stanica u kiselim uvjetima dani su u tablicama (Tablica 4.2.1.-4.2.6.). Izraženi su u postotcima te predstavljaju relativnu vrijednost koja prikazuje odnos broja stanica nakon završetka eksperimenta (t=1 h) i početnog broja stanica (t=0). Za svaki od ispitivanih sojeva navedena je i prosječna vrijednost dobivenih rezultata s pripadajućom standardnom devijacijom.

Tablica 4.2.1. Relativno preživljenje za soj *E. coli* DH5α/pBBR1MCS-4

t/h	**DH5α/pBBR1 MCS-4**	**DH5α/pBBR1 MCS-4**	**DH5α/pBBR1 MCS-4**		
0	100	100	100	$\bar{x}$	$\boldsymbol{\sigma}$
1	30,9	30,27	17,7	26,29	7,45

Tablica 4.2.2. Relativno preživljenje za soj *E. coli* DH5α/pBBR1MCS-4-*rmtA*

t/h	**DH5α/pBBR1 MCS-4-*rmtA***	**DH5α/pBBR1 MCS-4-*rmtA***	**DH5α/pBBR1 MCS-4-*rmtA***		
0	100	100	100	$\bar{x}$	$\boldsymbol{\sigma}$
1	43,7	43,2	39,2	42,03	2,47

Tablica 4.2.3. Relativno preživljenje za soj *E. coli* DH5α/pBBR1MCS-4-*rmtB*

t/h	**DH5α/pBBR1 MCS-4-*rmtB***	**DH5α/pBBR1 MCS-4-*rmtB***	**DH5α/pBBR1 MCS-4-*rmtB***		
0	100	100	100	$\bar{x}$	$\boldsymbol{\sigma}$
1	52,1	44,2	56,25	50,85	6,12

Tablica 4.2.4 Relativno preživljenje za soj *E. coli* DH5α/pBBR1MCS-4-*rmtC*

t/h	**DH5α/pBBR1 MCS-4-*rmtC***	**DH5α/pBBR1 MCS-4-*rmtC***	**DH5α/pBBR1 MCS-4-*rmtC***		
0	100	100	100	$\bar{x}$	$\boldsymbol{\sigma}$
1	40,3	5,8	11,09	19,06	18,58

Tablica 4.2.5. Relativno preživljenje za soj *E. coli* DH5α/pBBR1MCS-4-*armA*

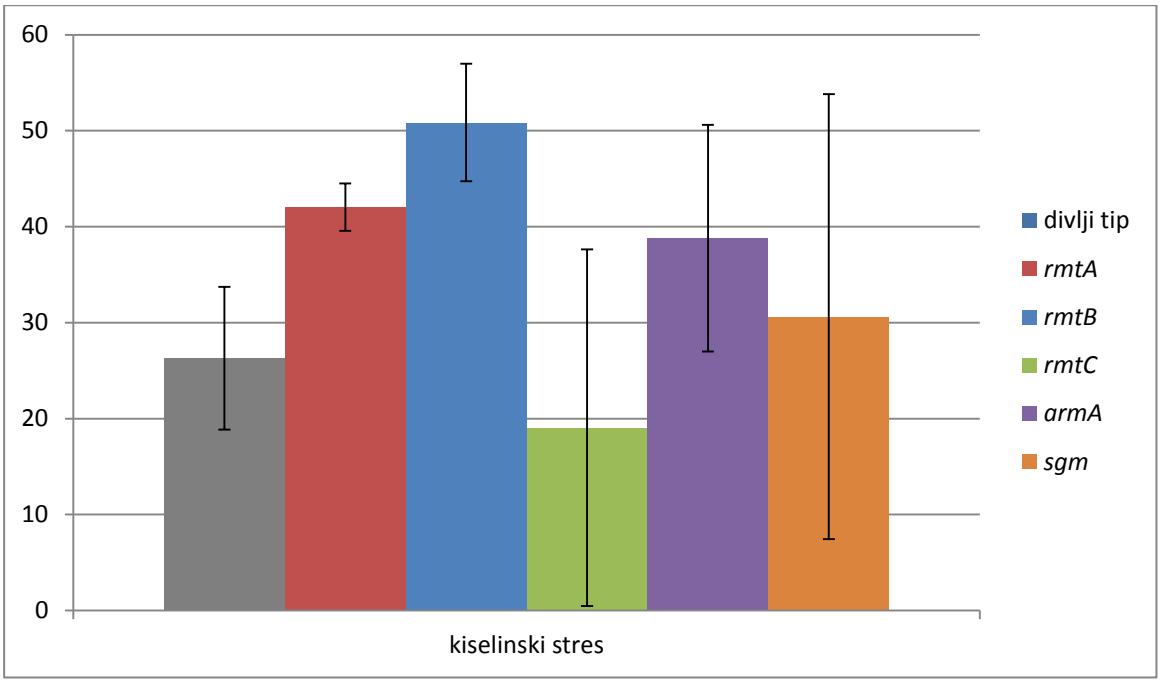
t/h	**DH5α/pBBR1 MCS-4-*armA***	**DH5α/pBBR1 MCS-4-*armA***	**DH5α/pBBR1 MCS-4-*armA***	**DH5α/pBBR1 MCS-4-*armA***		
0	100	100	100	100	$\bar{x}$	$\boldsymbol{\sigma}$
1	39,7	53,7	36,9	24,95	38,81	11,81

Tablica 4.2.6. Relativno preživljenje za soj *E. coli* DH5α/pBBR1MCS-4-*sgm*

t/h	**DH5α/pBBR1 MCS-4-*sgm***	**DH5α/pBBR1 MCS-4- *sgm***	**DH5α/pBBR1 MCS-4- *sgm***	**DH5α/pBBR1 MCS-4- *sgm***		
0	100	100	100	100	$\bar{x}$	$\boldsymbol{\sigma}$
1	39,8	14	57,1	20,8	30,63	23,17

Kako bi se omogućila bolja usporedba bakterijskog soja *E. coli* divljeg tipa sojeva i sojeva koji eksprimiraju gen za 16S rRNA metil-transferaze koje uzrokuju rezistenciju na aminoglikozide (*rmtA*, *rmtB*, *rmtC*, *armA* i *sgm*) i ovdje su rezultati prikazani grafičkim

prikazom (Slika 4.2.1.). Većina ispitanih sojeva koji eksprimiraju ribosomske metil-transferaze pokazuju veće vrijednosti preživljenja nakon izlaganja uvjetima niskog pH u odnosu na divlji tip bakterije. Soj *E. coli* DH5α koji eksprimira metil-transferazu RmtC jedini pokazuje niže vrijednosti preživljenja pri ovakvim uvjetima u usporedbi sa sojem divljeg tipa.



Slika 4.2.1. Usporedba preživljenja u uvjetima kiselinskog stresa bakterijskih stanica *E. coli* divljeg tipa s onima koji sadrže 16S rRNA metil-transferazu koja uzrokuje rezistenciju na aminoglikozidne antibiotike.

5. RASPRAVA

Pojava rezistencije na antibiotike postaje jedna od najvećih prijetnji ljudskom zdravlju zbog toga što smanjuje uspješnost liječenja infekcija te time povećava rizik komplikacija i smrtnog ishoda. Prilikom uvođenja novog antibiotika u kliničku upotrebu, pojava rezistencije je samo pitanje vremena. Rezistencija na antibiotik može biti rezultat urođenog svojstva, spontane mutacije ili horizontalnog prijenosa gena. Antibiotici su od uvođenja u široku upotrebu postali jedni od najbitnijih lijekova te su glavni razlog produženja ljudskog životnog vijeka. Rezistencija na velik broj antibiotika te prisutnost višestruko rezistentnih patogenih bakterijskih sojeva, u kliničku upotrebu vraća antibiotike koji su nekada bili manje korišteni kao što su primjerice aminoglikozidi.

Aminoglikozidi pripadaju skupini antibiotika koja djeluje na sintezu proteina, pri čemu djeluju baktericidno na bakterijsku stanicu. Smanjuju točnost procesa translacije vezujući se na A-mjesto dekodirajućeg dijela ribosomske podjedinice 30S pri čemu dovode do ugradnje pogrešnih aminokiselina u rastući polipeptidni lanac. Ometaju pravilno sparivanje kodona i antikodona uzrokujući promjenu konformacije uzvojnice 44 čak i u slučaju spajanja nepripadne aminoacil-tRNA te tako remete komunikaciju između dekodirajućeg i peptidil-transferaznog centra. Pogrešno translatirani proteini se zatim ugrađuju u staničnu membranu čime dolazi do porasta njene permeabilnosti i povećanog unosa aminoglikozida u stanicu te u konačnici baktericidnog učinka. Unatoč svojim nedostatcima, što se poglavito odnosi na pojavu ototoksičnosti i nefrotoksičnosti, aminoglikozidi su danas korisni u liječenju infekcija uzrokovanih gram-negativnim bakterijama.

Zbog povećane upotrebe, dolazi do sve veće raširenosti rezistencije na aminoglikozide, od kojih je najčešća enzimska modifikacija molekule lijeka. Zabrinjavajuća je i pojava novih mehanizama rezistencije na aminoglikozide koji su donedavno bili vezani isključivo uz bakterije koje su prirodni proizvođači antibiotika. Tako je u posljednjih desetak godina nakon prve izolacije 16S rRNA metil-transferaza iz patogenog soja došlo do širenja tog tipa rezistencije diljem svijeta. 16S rRNA metil-transferaze posttranslacijski metiliraju ribosomsku podjedinicu 30S uz kofakor AdoMet te tako omogućuju visoki stupanj rezistencije na sve klinički dostupne aminoglikozide osim streptomicina (Galimand i sur., 2003). Mjesta metilacije su nukleotidi G1405 i A1408 koji se nalaze u A-mjestu ribosomne

podjedinice 30S. Kod patogenih sojeva, izolirano je čak deset metil-transferaza koje metiliraju G1405, dok je metil-transferaza NpmA jedini izolirani predstavnik 16S rRNA metil-transferaza koje metiliraju A1408. Razlika u raširenosti navedenih metil-transferaza možda leži u biološkom učinka koji svaka od njih ima na bakterijsku stanicu.

Biološki učinak je cijena koju bakterija plaća zbog nekog stečenog svojstva koji divlji tip bakterije ne sadrži. Smatra se da većina mehanizama rezistencije na antibiotike sa sobom donosi i određeni biološki učinak na bakteriju koji može uzrokovati smanjenu virulenciju, brzinu rasta ili smanjen prijenos rezistencije. Smanjena sposobnost bakterije se javlja zbog djelovanja mehanizama rezistencije na važne funkcije bakterijske stanice. Također, i plazmidi koji prenose rezistentne gene mogu pridonijeti negativnom biološkom učinku na bakterijsku stanicu (Andersson i Hughes, 2010). Prednost koju bakterija stječe stvaranjem rezistencije tako može postati nedostatak ukoliko u okolišu ne postoji selektivni pritisak u obliku antibiotika.

Saznanja o biološkom učinku rezistencije mogu biti korisna u razvijanju novih antibiotika ili u pokušajima da se smanji postojeća rezistencija. Pronalaskom fiziološke slabosti rezistentnih bakterija moglo bi se djelovati na smanjenje njihove populacije. Kako je biološki učinak rezistencije na bakteriju vrlo varijabilan, potrebno ga je ispitati u različitim uvjetima. Tako primjerice stjecanje rezistencije ne mora imati biološki učinak na stanicu u normalnim uvjetima, ali u uvjetima koji su nepovoljni za rast bakterije, tzv. stresnim uvjetima, biološki učinak može biti značajan. Neki od primjera stresnih uvjeta su rast u mediju siromašnom hranjivim tvarima, zatim rast u anaerobnim uvjetima, uvjetima povećane osmolarnosti, smanjenog pH ili povećane koncentracije peroksida.

Ispitivanje biološkog učinka rezistencije na stanicu se može provesti na različite načine. Tako se primjerice mogu utvrđivati razlike između divljeg i rezistentnog tipa bakterije usporedbom pripadajućih krivulja rasta ili broja poraslih kolonija nakon nasađivanja na kruti medij. Jedna meta-analiza ističe da je najbolji način istraživanja biološkog učinka rezistencije na bakterijsku stanicu kompetitivni rast dvaju bakterijskih sojeva, divljeg soja bakterije i rezistentnog soja. Ispitivanje kompetitivnog rasta dvaju bakterijskih sojeva provodi se na hranjivom mediju koji ne sadržava antibiotik kao selektivni pritisak. Na taj način se sprječava da prisutnost antibiotika potakne prevalenciju rezistentnog soja bakterije nad divljim sojem (Melnyk i sur., 2014). Kako bi se osiguralo da u eksperimentu ne dođe do toga, divlji tip

bakterije je predstavljao soj *E. coli* DH5α transformiran praznim plazmidom pBBR1MCS-4 koji prenosi rezistenciju na ampicilin. Ostali transformirani sojevi su također sadržavali plazmid pBBR1MCS-4, no s jednim od gena za ispitivane 16S rRNA metil-transferaze, *rmtA*, *rmtB*, *rmtC*, *armA*, ili *sgm*. Svi sojevi su stoga bili rezistentni na ampicilin, dok je jedina razlika između divljeg soja i ostalih sojeva bila prisutnost 16S rRNA metil-transferaza što je omogućilo utvrđivanje biološkog učinka tog tipa rezistencije na aminoglikozide.

Provedeno je ispitivanje relativnog preživljenja transformiranih bakterijskih sojeva u stresnim uvjetima kako bi se utvrdio biološki učinak 16S rRNA metil-transferaza na bakterijsku stanicu. Ispitivani stresni uvjeti su bili povećana osmolarnost te nizak pH. Iz rezultata je vidljivo da osmotski stres predstavlja znatno manji stres za bakteriju od kiselinskog, zbog toga što su bakterije unatoč izlaganju uvjetima povećane osmolarnosti nastavile rasti, dok se pri niskom pH njihov broj znatno smanjio.

U uvjetima povećane osmolarnosti, sojevi koji eksprimiraju ispitivane 16S rRNA metil-transferaze pokazali su manje vrijednosti relativnog preživljenja u usporedbi s divljim tipom *E. coli*. Iz toga proizlazi da 16S rRNA metil-transferaze zaista mogu imati određeni biološki učinak na bakterijsku stanicu ukoliko se ona nalazi u sličnim uvjetima. Kada se međusobno usporede vrijednosti relativnog preživljenja bakterijskih sojeva koji eksprimiraju različite 16S rRNA metil-transferaze, zamjećuje se da RmtC ima veću relativnu vrijednost preživljenja od ostalih. To može značiti da RmtC ima manji biološki učinak na bakterijsku stanicu što može biti prednost navedenoj metil-transferazi u odnosu na ostale. U još nekoliko istraživanja se također pokazalo da RmtC nema ili ima vrlo mali biološki učinak na stanicu (Gutierrez i sur., 2012; Lioy i sur., 2014).

Uspoređujući vrijednosti relativnog preživljenja u uvjetima niskog pH divljeg tipa *E. coli* sa sojevima koji eksprimiraju ispitivane 16S rRNA metil-transferaze, primjećuju se veće razlike među sojevima nego kod prethodnog primjera. Vrijednost relativnog preživljenja koja najviše odstupa od ostalih ponovo pripada soju koji ekprimira RmtC. No, kako je vrijednost standardne devijacije tog soja prevelika, teško je izvesti pretpostavke iz dobivenih rezultata za tu metil-transferazu. Ako se izuzmu rezultati dobiveni za RmtC, primjećuje se da sojevi koji eksprimiraju 16S rRNA metil-transferaze pokazuju veće vrijednosti relativnog preživljenja u odnosu na soj divljeg tipa. Pri tome najveće vrijednosti relativnog preživljenja pokazuju metil-transferaze RmtB te RmtA, dok su vrijednosti za ArmA i Sgm nešto manje. Moguće je

stoga da metilacija 16S rRNA predstavlja prednost u uvjetima niskog pH. Pretpostavlja se da je razlog tome zaštita veznih mjesta za mRNA i tRNA, koja moraju biti izložena citosolu, metilacijom molekule rRNA (Baldridge i Contreras, 2014).

Iz navedenih rezultata može se pretpostaviti da 16S rRNA metil-transferaze mogu predstavljati teret stanici kod osmotskog šoka, ali i prednost u prisutnosti kiselinskog šoka. Također, može se zaključiti da je biološki učinak vrlo varijabilan te da uvelike ovisi o okolišnim uvjetima. Upravo zbog toga, bitno je ispitati biološki učinak u što većem broju različitih uvjeta kako bi se utvrdilo koji uvjeti najnepovoljnije djeluju na rezistentnu bakterijsku stanicu. Pronalaskom fiziološke slabosti rezistentne bakterije moglo bi se djelovati na smanjenje porasta rezistencije.

Jedan od mogućih razloga biološkog učinka stečenih 16S rRNA metil-transferaza koje uzrokuju rezistenciju na aminoglikozide je njihova interakcija s endogenim metil-transferazama koje imaju bitnu ulogu u osiguravanju strukture i funkcije zrele rRNA. Do interakcije dolazi zbog toga što obje vrste metil-transferaza, i egzogene i endogene, djeluju na filogenetički očuvane i funkcionalno važne regije u rRNA. Metilacijom 16S rRNA od strane stečenih metil-transferaza tako dolazi do promjena u metilaciji posredovanoj endogenim 16S rRNA metil-transferazama. Dokazano je da 16S rRNA metil-transferaze Sgm, RmtB, RmtC, ArmA i NpmA smanjuju metilaciju endogenim metil-transferazama RsmI te RsmF (Čubrilo i sur., 2009; Gutierrez i sur., 2012; Lioy i sur., 2014). Iako je za neke od navedenih metil-transferaza utvrđen značajan biološki učinak, na primjeru ArmA je dokazano da biološki učinak nije povezan s nedostatkom endogene metilacije putem RsmF (Lioy i sur., 2014). Kako bi se moglo zaključiti nešto više o povezanosti biološkog učinka s interakcijom između endogenih i stečenih 16S rRNA metil-transferaza, potrebno je provesti još istaživanja koja bi uključivala usporedbu učinka stečene metil-transferaze i nedostatka endogene metil-transferaze na bakterijsku stanicu.

Iako se na prvi pogled možda doima da smanjeno preživljenje pokazuje negativan biološki učinak na stanicu, a povećano preživljenje pozitivan, to nužno ne mora biti tako. Naime, povećan rast u stresnim uvjetima se može javiti zbog nesposobnosti rezistentnih sojeva da induciraju sigma faktor RNA polimeraze (RpoS ili σ^S) koji je glavni regulator prilagodbe bakterije na stresne uvjete. Zbog toga iako rezistentni sojevi kratkotrajno u stresnim uvjetima pokazuju povećan rast, nedostatak indukcije RpoS može dovesti do

smanjenog dugoročnog preživljenja bakterija. Upravo do tog zaključka se došlo istraživanjem biološkog učinka mutacija koje uzrokuju rezistenciju na streptomicin, gdje su bakterije divljeg tipa vrste *Salmonella enterica* var. Typhimurium dovele do indukcije RpoS te smanjenog rasta u mediju siromašnom izvorom ugljika, dok su bakterije iste vrste koje su sadržavale navedene mutacije dovele do povećanog rasta zbog nedostatka indukcije RpoS (Paulander i sur., 2009).

Kao što je spomenuto prije, biološki učinak rezistencije na bakterijsku stanicu se može iskoristiti u strategijama smanjenja rezistencije. Kako bi se smanjila rezistencija na antibiotike prvo je potrebno ukloniti selektivni pritisak u obliku antibiotika, jer rezistencija u prisutnosti antibiotika predstavlja prednost za rezistentni soj bakterije. Kada bi se to dogodilo, ukoliko postoji negativan biološki učinak rezistencije na bakterijsku stanicu, došlo bi do smanjenja populacije rezistentnog soja bakterije u odnosu na divlji tip. Međutim, čak i kada bi preostala vrlo mala populacija rezistentnih bakterija, ponovno uvođenje antibiotika u upotrebu dovelo bi do ponovnog povećanja njihovog broja (Andersson i Hughes, 2010).

No, raširenost rezistencije ne ovisi samo o njenom biološkom učinku na stanicu nego i o ostalim faktorima. Najbolji primjer za to je metil-transferaza ArmA koja, unatoč tome što uzrokuje vrlo znajačan nedostatak bakterijskoj stanici koja je eksprimira, pokazuje veliku raširenost diljem svijeta. Razlog takve pojave bi mogla biti činjenica da je gen *armA* dio funkcionalnog transpozona Tn*1548*, prenošenog plazmidom pIP1204, te je na taj način povezan s ostalim genima za rezistenciju, točnije onima koji prenose rezistenciju na β-laktame te fluorokinolone (Galimand i sur., 2005). Zbog toga bi, iako bi negativan biološki učinak ArmA na bakteriju doveo do smanjenja populacije rezistentne na aminoglikozide, u konačnici došlo do proširenja rezistencije radi selektivnog pritiska prisutnosti ostalih antibiotika. S druge strane, metil-transferaza NpmA nije povezana s rezistencijama na druge skupine antibiotika što ograničava njenu raširenost. Međutim, kako njena ekpresija ne nosi nikakav značajan biološki učinak na bakterijsku stanicu, gen *npmA* se održava u okolišu (Lioy i sur., 2014).

Ispitivanja biološkog učinka rezistencije se, unatoč tome što je njihova izvedba poprilično jednostavna, mogu pokazati vrlo kompleksna kada dolazimo do interpretacije dobivenih rezultata. Ipak možemo pretpostaviti da će se, ukoliko je biološki učinak

rezistencije na bakterijske stanice primijećen u laboratorijskim uvjetima, određeni učinak javiti i u kliničkom okruženju.

Dobiveni rezultati upućuju na to da 16S rRNA metil-transferaze imaju biološki učinak na bakterijsku stanicu *E. coli* te da on ovisi o uvjetima u kojima se bakterijska stanica nalazi. Kako bi se što bolje odredio biološki učinak tog tipa rezistencije na aminoglikozide potrebno je ispitati preživljenje stanica u raznim drugim stresnim uvjetima. Osim toga, trebalo bi ispitati dolazi li do indukcije faktora RpoS, kako bi se ustanovilo djeluje li povećano preživljenje u stresnim uvjetima dugoročno pozitivno ili negativno na bakterijsku stanicu. Daljnja istraživanja mogu pridonijeti boljem razumijevanju učinaka 16S rRNA metil-transferaza na bakterijsku stanicu te omogućiti razvoj strategija koji bi doveo do smanjenja pojave i raširenosti rezistencije.

6. ZAKLJUČAK

Kako bi se utvrdio biološki učinak ispitivanih 16S rRNA metil-transferaza (Sgm, RmtA, RmtB, RmtC te ArmA) na bakterijsku stanicu, provedena je usporedba preživljenja u stresnim uvjetima bakterijskih stanica *E. coli* koje eksprimiraju 16S rRNA metil-transferaze s divljim tipom *E. coli*. Na temelju provedenih ispitivanja, dobivenih rezultata i rasprave može se zaključiti sljedeće:

→ sojevi koji eksprimiraju metil-transferaze Sgm, RmtA, RmtB, RmtC te ArmA imaju manje vrijednosti relativnog preživljenja u uvjetima povećane osmolarnosti u odnosu na divlji tip *E. coli* zbog čega se pretpostavlja se da bi ispitivane 16S rRNA metil-transferaze mogle imati negativan biološki učinak na bakterijsku stanicu u prisutnosti uvjeta povećane osmolarnosti

→ sojevi koji eksprimiraju metil-transferaze Sgm, RmtA, RmtB te ArmA imaju veće vrijednosti relativnog preživljenja pri niskom pH u odnosu na divlji tip *E. coli*, dok soj koji eksprimira RmtC ima manju vrijednost preživljenja pri niskom pH u usporedbi s divljim tipom *E. coli* iz čega proizlazi da u uvjetima niskog pH ispitivane 16S rRNA metil-transferaze, izuzev RmtC, pokazuju pozitivan biološki učinak na bakterijsku stanicu

→ biološki učinak 16S rRNA metil-transferaza na bakterijsku stanicu je varijabilan te ovisi o uvjetima kojima je stanica izložena

→ kako bi se što bolje utvrdio biološki učinak 16S rRNA metil-transferaza na stanicu potrebno ga je ispitati u većem broju različitih stresnih uvjeta

→ rad pridonosi utvrđivanju biološkog učinka 16S rRNA metil-transferaza koji se može iskoristiti u razvoju strategija koje bi smanjile raširenost tog tipa rezistencije na aminoglikozidne antibiotike

7. LITERATURA

1. Ambrović Ristov A, Brozović A, Bruvo Mađarić B, Ćetković H, Hranilović D, Herak Bosnar M, Katušić Hećimović S, Meštrović Radan N, Slade N, Vujaklija D. Metode u molekularnoj biologiji. 1.izdanje. Zagreb: Institut Ruđer Bošković, 2007.

2. Andersson DI, Hughes D. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nat Rev Microbiol,* 2010, 8, 260-71.

3. Andersson DI, Hughes D. Persistence of antibiotic resistance in bacterial populations. *FEMS Microbiol Rev,* 2011, 35, 901-11.

4. Andersson DI, Levin BR. The biological cost of antibiotic resistance. *Curr Opin Microbiol,* 1999, 2, 489-93.

5. Antoine R, Locht C. Isolation and molecular characterization of a novel broad-host-range plasmid from *Bordetella bronchiseptica* with sequence similarities to plasmids from gram-positive organisms. *Mol Microbiol*, 1992, 6, 1785-99.

6. Baldridge KC, Contreras LM. Functional implications of ribosomal RNA methylation in response to environmental stress. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2014, 49, 69-89.

7. Ban N, Nissen P, Hansen J, Moore PB, Steitz TA. The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science*, 2000, 289, 905-920.

8. Becker B, Cooper MA. Aminoglycoside antibiotics in the 21st century. *ACS Chem Biol,* 2013, 8, 105-115.

9. Carnes AE, Hodgson CP, Williams JA. Inducible *Escherichia coli* fermentation for increased plasmid DNA production. *Biotechnol Appl Biochem,* 2006, 45, 155-66.

10. Chung CT, Niemela SL, Miller RH. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86, 2172-5.

11. Coates A, Hu Y, Bax R, Page C. The future challenges facing the development of new antimicrobial drugs. *Nat Rev Drug Discov*, 2002, 1, 895-910.

12. Conn GL, Savić M, Macmaster R. Antibiotic Resistance in Bacteria through Modification of Nucleosides in 16S Ribosomal RNA. U: DNA and RNA Modification Enzymes: Structure, Mechanism, Function and Evolution. Grosjean H, urednik, Landes Bioscience, 2009, str. 524-536.

13. Čubrilo S, Babić F, Douthwaite S, Maravić Vlahoviček G. The aminoglycoside resistance methyltransferase Sgm impedes RsmF methylation at an adjacent rRNA nucleotide in the ribosomal A site. *RNA*, 2009, 15, 1492–1497.

14. Das S, Dash HR. Cloning and Transformation. U: Microbial Biotechnology – A Laboratory Manual for Bacterial Systems. 2015, str. 35-72.

15. Doi Y, Yokoyama K, Yamane K, Wachino J, Shibata N, Yagi T, Shibayama K, Kato H, Arakawa Y. Plasmid-mediated 16S rRNA methylase in *Serratia marcescens* conferring high-level resistance to aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, 48, 491–496.

16. Galimand M, Courvalin P, Lambert T. Plasmid-mediated high-level resistance to aminoglycosides in Enterobacteriaceae due to 16S rRNA methylation. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003, 47, 2565–2571.

17. Galimand M, Sabtcheva S, Courvalin P, Lambert T. Worldwide disseminated *armA* aminoglycoside resistance methylase gene is borne by composite transposon Tn*1548*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, 49, 2949–2953.

18. Gutierrez B, Escudero JA, San Millan A, Hidalgo L, Carrilero L, Ovejero CM, Santos-Lopez A, Thomas-Lopez D, Gonzalez-Zorn B. Fitness cost and interference of Arm/Rmt aminoglycoside resistance with the RsmF housekeeping methyltransferases. *Antimicrob Agents Chemother*, 2012, 56, 2335-41.

19. Hengge R. The general stress response in gram-negative bacteria. U: Bacterial Stress Responses. Storz G, Hengge R, urednici. ASM press, 2011, str. 251–289

20. Houghton JL, Green KD, Chen W, Garneau-Tsodikova S. The Future of aminoglycosides: The end or renaissance. *ChemBioChem*, 2010, 11, 880-902.

21. Husain N, Tkaczuk K, Tulsidas S, Kaminska K, Čubrilo S, Maravić Vlahoviček G, Bujnicki J, Sivaraman J. Structural basis for the methylation of G1405 in 16S rRNA by aminoglycoside resistance methyltransferase Sgm from an antibiotic producer: a diversity of active sites in m7G methyltransferases. *Nucleic Acids Res*, 2010, 39, 1903–1918.

22. Lewis K. Platforms for antibiotic discovery. *Nat Rev Drug Discov*, 2013, 12, 371-87.

23. Kojić M, Topisirović L, Vasiljević B. Cloning and characterization of an aminoglycoside resistance determinant from *Micromonospora zionensis*. *J Bacteriol*, 1992, 174, 7868-72.

24. Kotra LP, Haddad J, Mobashery S. Aminoglycosides: perspectives on mechanisms of action and resistance and strategies to counterresistance. *Antimicrob Agents chemother*, 2000, 44, 3249–3256.

25. Kovach ME, Elzer PH, Hill DS, Robertson GT, Farris MA, Roop RM, Peterson KM. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene*, 1995, 166, 175-176.

26. Lioy VS, Goussard S, Guerineau V, Yoon EJ, Courvalin P, Galimand M, Grillot-Courvalin C. Aminoglycoside resistance 16S rRNA methyltransferases block endogenous methylation, affect translation efficiency and fitness of the host. *RNA*, 2014, 20, 382-391.

27. Madigan M, Martinko J, Bender K, Buckley, Stahl. Brock Biology of Microorganisms. Pearson, 14. izdanje, 2015, str. 149-158.

28. Magnet S, Blanchard JS. Molecular insights into aminoglycoside action and resistance. *Chem Rev*, 2005, 105, 477-98.

29. Maravić Vlahoviček G, Čubrilo S, Tkaczuk KL, Bujnicki JM. Modeling and experimental analyses reveal a two-domain structure and amino acids important for the activity of aminoglycoside resistance methyltransferase Sgm. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1784, 582-90.

30. Melnyk AH, Wong A, Kassen R. The fitness costs of antibiotic resistance mutations. *Evol Appl*, 2015, 8, 273-83.

31. Menard R, Molinas C, Arthur M, Duval J, Courvalin P, Leclercq R. Overproduction of 3'-aminoglycoside phosphotransferase type I confers resistance to tobramycin in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1993, 37, 78-83.

32. Ogle JM, Brodersen DE, Clemons WM Jr, Tarry MJ, Carter AP, Ramakrishnan V. Recognition of cognate transfer RNA by the 30S ribosomal subunit. *Science*, 2001, 292, 897-902.

33. Ogle JM, Ramakrishnan V. Structural insights into translational fidelity. *Annu Rev Biochem*, 2005, 74, 129-177.

34. Pape T, Wintermeyer W, and Rodnina MV. Conformational switch in the decoding region of 16S rRNA during aminoacyl-tRNA selection on the ribosome. *Nature Struct Biol*, 2000, 7, 104–107.

35. Paulander W, Maisnier-Patin S, Andersson DI. The fitness cost of streptomycin resistance depends on rpsl mutation, carbon source and RpoS (σS). *Genetics*, 2009, 183, 539–546.

36. Poehlsgaard J, Douthwaite S. The bacterial ribosome as a target for antibiotics. *Nat Rev Microbiol*, 2005, 3, 870-881.

37. Savić M, Ilić-Tomić T, Macmaster R, Vasiljević B, Conn GL. Critical residues for cofactor binding and catalytic activity in the aminoglycoside resistance methyltransferase Sgm. *Journal of Bacteriology*, 2008, 109, 5855-5861.

38. Savić M, Lovrić J, Ilić-Tomić T, Vasiljević B, Conn GL. Determination of the target nucleosides for members of two families of 16S rRNA methyltransferases that confer resistance to partially overlapping groups of aminoglycoside antibiotics. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37, 5420-5431.

39. Schmeing MT, Ramakrishnan V. What recent ribosome structures have revealed about the mechanism of translation. *Nature*, 2009, 46, 1234-1242.

40. Schmitt E, Galimand M, Panvert M, Courvalin P, Mechulam Y. Structural bases for 16 S rRNA methylation catalyzed by ArmA and RmtB methyltransferases. *J Mol Biol*, 2009, 388, 570-582.

41. Schuwirth BS, Borovinskaya MA, Hau CW, Zhang W, Vila-Sanjurjo A, Holton JM, Doudna Cate JH. Structure of the bacterial ribosome at 3.5 Å resolution. *Science*, 2005, 310, 827-834.

42. Shakil S, Khan R, Zarrilli R, Khan AU. Aminoglycosides versus bacteria - a description of the action, resistance mechanism, and nosocomial battleground. *J Biomed Sci*, 2008, 15, 5-14.

43. Tenson T, Mankin A. Antibiotics and the ribosome. *Mol Microbiol*, 2006, 59, 1664-77.

44. Vojnović S, Ilić-Tomić T, Savić M, Bajkić S, Morić I, Vasiljević B. Comparative analysis of 16S rRNA methyltransferase conferring resistance to aminoglycoside antibiotics in producing strains. U: Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology. Mendez-Vilas A, urednik, Badajoz, Formatex, 2010, str. 501-508.

45. Voorhees RM, Ramakrishnan V. Structural basis of the translational elongation cycle. *Annu Rev Biochem*, 2013, 82, 203-236.

46. Wachino J, Arakawa Y. Exogenously acquired 16S rRNA methyltransferases found in aminoglycoside-resistant pathogenic Gram-negative bacteria: An update. *Drug Resist Updat*, 2012, 15, 133-148.

47. Wachino J, Shibayama K, Kurokawa H, Kimura K, Yamane K, Suzuki S, Shibata N, Ike Y, Arakawa Y. Plasmid-mediated novel m1A1408 methyltransferase, NpmA, for 16S rRNA found in clinically isolated *Escherichia coli* resistant to structurally diverse aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007, 51, 4401-4409.

48. Wachino J, Yamane K, Shibayama K, Kurokawa H, Shibata N, Suzuki S, Doi Y, Kimura K, Ike Y, Arakawa Y. Novel plasmid-mediated 16S rRNA methylase, RmtC, found in a *Proteus mirabilis* isolate demonstrating extraordinary high-level resistance against various aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006, 50, 178-84.

49. Walsh C. Antibiotics: actons, origins, resistance. Washington D.C., ASM Press, 2003.

50. Weber H, Polen T, Heuveling J, Wendisch VF, Hengge R. Genome-wide analysis of the general stress response network in *Escherichia coli*: sigmaS-dependent genes, promoters, and sigma factor selectivity. *J Bacteriol*, 2005, 187, 1591-603.

51. Wilson DN. The A-Z of bacterial translation inhibitors. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2009, 393-433.

52. Wimberly BT, Brodersen DE, Clemons WM Jr, Morgan-Warren RJ, Carter AP, Vonrhein C, Hartsch T, Ramakrishnan V. Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature*, 2000, 407, 327-39.

53. Yokoyama K, Doi Y, Yamane K, Kurokawa H, Shibata N, Shibayama K, Yagi T, Kato H, Arakawa Y. Acquisition of 16S rRNA methylase gene in Pseudomonas aeruginosa. *Lancet*, 2003, 362, 1888-93.

54. Yonath A. Antibiotics targeting ribosomes: resistance, selectivity, synergism and cellular regulation. *Annu Rev Biochem*, 2005, 74, 649-79.

55. Zarubica T, Baker MR, Wright HT, Rife JP. The aminoglycoside resistance methyltransferases from the ArmA/Rmt family operate late in the 30S ribosomal biogenesis pathway. *RNA*, 2011, 17, 346–55.

8. SAŽETAK

Otkriće antibiotika predstavlja jedno od najvažnijih medicinskih dostignuća koje je omogućilo smanjenje morbiditeta i mortaliteta. Zbog upotrebe antibiotika, dolazi do porasta rezistencije među patogenima.

Aminoglikozidi su baktericidni antibiotici širokog spektra. Vežu se na A-mjesto dekodirajućeg dijela ribosomne podjedinice 30S te uzrokuju ugradnju pogrešnih aminokiselina u rastući protein. Novi mehanizam rezistencije kod patogena je metilacija 16S rRNA, tj. nukleotida G1405 i A1408 koji se nalaze u blizini ciljnog mjesta vezanja aminoglikozidnih antibiotika.

16S rRNA metil-transferaze (MT) djeluju na funkcionalno važan dio rRNA te mogu imati negativan biološki učinak na bakterijsku stanicu. Biološki učinak se može očitovati kao povećana osjetljivost bakterije pri stresnim uvjetima što može predstavljati fiziološku slabost koja bi se mogla iskoristiti u smanjenju rezistencije.

Svrha rada je bila utvrditi imaju li 16S rRNA metil-transferaze biološki učinak na bakteriju. Ispitano je relativno preživljenje stanica, *E. coli* DH5α divljeg tipa te stanica *E. coli* DH5α koje eksprimiraju ispitivane metil-transferaze, u stresnim uvjetima. Stresni uvjeti su bili osmotski i kiselinski stres, dok su ispitivane metil-transferaze uključivale Sgm, RmtA, RmtB, RmtC te ArmA.

Rezultati pokazuju da je biološki učinak 16S rRNA metil-transferaza relativan te ovisi o okolišu. U prisutnosti kiselinskog stresa, ekspresija ispitivanih metil-transferaza u bakteriji predstavlja prednost u usporedbi s divljim tipom bakterije, dok kod osmotskog stresa predstavlja teret.

Ovaj rad pridonosi određivanju biološkog učinka 16S rRNA metil-transferaza na bakterijsku stanicu koji se može iskoristiti u pokušajima smanjenja rezistencije.

9. SUMMARY

The discovery of antibiotics is one of the most important medical events that helped reduce human morbidity and mortality. Due to the use of antibiotics, the frequency of resistance among pathogens has increased.

Aminoglycosides are broad-spectrum bactericidal antibiotics. They bind to the A site in the decoding center of the 30S ribosomal subunit and induce misincorporation of amino acids into the growing protein. A new mechanism of resistance in pathogens is methylation of 16S rRNA, precisely nucleotides G1405 and A1408 located in close proximity of the aminoglycoside binding site.

16S rRNA methyltransferases (MTs) methylate a functionally important part of the rRNA and can be associated with a loss of fitness. This can result in hypersensitivity to stress conditions, and can pose a potential physiological weakness that may be exploitable in the reduction of resistance.

The intention of this work was to determine whether acquisition of the 16S rRNA methyltransferases has a fitness cost. The survival rate of the wild type and the methyltransferase-producing *E. coli* strain DH5α was tested at stress conditions. The stress conditions were osmotic and acidic stress, while the tested methyltransferases included Sgm, RmtA, RmtB, RmtC and ArmA.

The results show that the fitness cost of 16S rRNA methyltransferases is relative and varies in different conditions. In the presence of acidic stress, the acquisition of the tested methyltransferases by bacteria results in an advantage in comparison to the wild type *E. coli*, whilst it poses a burden to cells exposed to osmotic stress.

This work contributes to the assessment of the fitness cost related to the acquisition of 16S rRNA methyltransferases, which can be used in the attempts to fight resistance.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Zavod za biokemiju i molekularnu biologiju
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

Preživljenje stanica bakterije *Escherichia coli* DH5α osjetljivih i otpornih na aminoglikozide u uvjetima osmotskog i kiselinskog stresa

Vedrana Maglica

SAŽETAK

Otkriće antibiotika predstavlja jedno od najvažnijih medicinskih dostignuća koje je omogućilo smanjenje morbiditeta i mortaliteta. Zbog upotrebe antibiotika, dolazi do porasta rezistencije među patogenima. Aminoglikozidi su baktericidni antibiotici širokog spektra. Vežu se na A-mjesto dekodirajućeg dijela ribosomne podjedinice 30S te uzrokuju ugradnju pogrešnih aminokiselina u rastući protein. Novi mehanizam rezistencije kod patogena je metilacija 16S rRNA, tj. nukleotida G1405 i A1408 koji se nalaze u blizini ciljnog mjesta vezanja aminoglikozidnih antibiotika. 16S rRNA metil-transferaze (MT) djeluju na funkcionalno važan dio rRNA te mogu imati negativan biološki učinak na bakterijsku stanicu. Biološki učinak se može očitovati kao povećana osjetljivost bakterije pri stresnim uvjetima što može predstavljati fiziološku slabost koja bi se mogla iskoristiti u smanjenju rezistencije. Svrha rada je bila utvrditi imaju li 16S rRNA metil-transferaze biološki učinak na bakteriju. Ispitano je relativno preživljenje stanica, *E. coli* DH5α divljeg tipa te stanica *E. coli* DH5α koje eksprimiraju ispitivane metil-transferaze, u stresnim uvjetima. Stresni uvjeti su bili osmotski i kiselinski stres, dok su ispitivane metil-transferaze uključivale Sgm, RmtA, RmtB, RmtC te ArmA. Rezultati pokazuju da je biološki učinak 16S rRNA metil-transferaza relativan te ovisi o okolišu. U prisutnosti kiselinskog stresa, ekspresija ispitivanih metil-transferaza u bakteriji predstavlja prednost u usporedbi s divljim tipom bakterije, dok kod osmotskog stresa predstavlja teret. Ovaj rad pridonosi određivanju biološkog učinka 16S rRNA metil-transferaza na bakterijsku stanicu koji se može iskoristiti u pokušajima smanjenja rezistencije.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži:	54 stranica, 19 grafičkih prikaza, 12 tablica i 55 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.
Ključne riječi:	preživljenje, biološki učinak, aminoglikozidi, 16S rRNA metil-transferaze, stresni uvjeti, osmotski stres, kiselinski stres
Mentor:	**Dr. sc. Gordana Maravić Vlahoviček**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Ocjenjivači:	**Dr. sc. Gordana Maravić Vlahoviček**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.* **Dr. sc. Darija Vidučić**, *znanstvena suradnica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.* **Dr. sc. Ana Mornar Turk**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: srpanj 2015.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Department of biochemistry and molecular biology
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

Survival of *Escherichia coli* DH5α sensitive and aminoglycoside resistant cells in conditions of osmotic and acidic stress

Vedrana Maglica

SUMMARY

The discovery of antibiotics is one of the most important medical events that helped reduce human morbidity and mortality. Due to the use of antibiotics, the frequency of resistance among pathogens has increased. Aminoglycosides are broad-spectrum bactericidal antibiotics. They bind to the A site in the decoding center of the 30S ribosomal subunit and induce misincorporation of amino acids into the growing protein. A new mechanism of resistance in pathogens is methylation of 16S rRNA, precisely nucleotides G1405 and A1408 located in close proximity of the aminoglycoside binding site. 16S rRNA methyltransferases (MTs) methylate a functionally important part of the rRNA and can be associated with a loss of fitness. This can result in hypersensitivity to stress conditions, and can pose a potential physiological weakness that may be exploitable in the reduction of resistance. The intention of this work was to determine whether acquisition of the 16S rRNA methyltransferases has a fitness cost. The survival rate of the wild type and the methyltransferase-producing *E. coli* strain DH5α was tested at stress conditions. The stress conditions were osmotic and acidic stress, while the tested methyltransferases included Sgm, RmtA, RmtB, RmtC and ArmA. The results show that the fitness cost of 16S rRNA methyltransferases is relative and varies in different conditions. In the presence of acidic stress, the acquisition of the tested methyltransferases by bacteria results in an advantage in comparison to the wild type *E. coli*, whilst it poses a burden to cells exposed to osmotic stress. This work contributes to the assessment of the fitness cost related to the acquisition of 16S rRNA methyltransferases, which can be used in the attempts to fight resistance.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 54 pages, 19 figures, 12 tables and 55 references. Original is in Croatian language.

Keywords: survival, fitness cost, aminoglycosides, 16S rRNA methyltransferases, stress conditions, osmotic stress, acidic stress

Mentor: **Gordana Maravić Vlahoviček**, **Ph.D.** *Associate Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Gordana Maravić Vlahoviček**, **Ph.D.** *Associate Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Darija Vidučić, **Ph.D.** *Assistant research scientist,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Ana Mornar Turk, **Ph.D.** *Associate Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July 2015.