

VILNIAUS UNIVERSITETAS
Gamtos mokslų fakultetas
Augalų fiziologijos ir mikrobiologijos katedra

Mikrobiologijos studijų programos magistrantūros II kurso studentė

Sandra Švambarytė

Magistrinis darbas

**Atsparumą antibiotikams suteikiančių siurblių TetA ir
AcrAB veiklos *Escherichia coli* ląstelėse tyrimas**

Darbo vadovai:
doc. dr. Rimantas Daugelavičius
dakt. Andrius Buivydas

Vilnius 2007

**Atsparumą antibiotikams suteikiančių siurblių TetA ir
AcrAB veiklos *Escherichia coli* ląstelėse tyrimas**

Darbas atliktas
Gamtos mokslų fakulteto Biochemijos ir biofizikos katedroje, Membranų biochemijos
laboratorijoje

Sandra Švambarytė

Darbo vadovai:

doc. dr. R. DAUGELAVIČIUS

dokt. A. BUIVYDAS

TURINYS

SANTRUMPOS.....	4
ĮVADAS	5
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	6
1.1. Gramneigiamųjų bakterijų apvalkalėliai.....	6
1.2. Gramneigiamųjų bakterijų atsparumo antibiotikams veiksniai	7
1.2.1. Antibiotikus iš bakterijų išstumiančios pernašos sistemos	8
1.3. Atsparumą antibiotikams lemiančios pernašos sistemos E. coli bakterijose	11
1.3.1. ABC šeima.....	12
1.3.2. MATE šeima.....	13
1.3.3. SMR šeima.....	13
1.3.4. RND šeima.....	14
1.3.4.1. AcrB - dauginio atsparumo siurblys	14
1.3.5. MF šeima	16
1.3.5.1. MdfA siurblys	17
1.4. Tetraciklinai	17
1.4.1. Atsparumą tetraciklinui įtakojantys veiksniai.....	19
1.4.1.1. Genetiniai elementai, lemiantys bakterijų atsparumą tetraciklinams	19
1.5. Atsparumą sąlygojančių siurblių slopikliai.....	20
1.5.1. Rezerpinas.....	21
1.5.2. Chlorpromazinas	22
2. MEDŽIAGOS IR METODAI.....	23
2.1. Reagentai, mikroorganizmai.....	23
2.2. Mitybinės terpės, tirpalai ir jų paruošimas.....	23
2.3. Darbo metodai.....	24
2.3.1. Ląstelių auginimas	24
2.3.2. Ląstelių dorojimas EDTA.....	25
2.3.3. TetA siurblio indukcija tetraciklinui.....	25
2.3.4. Ląstelių suspensijos ruošimas	25
2.3.5. Potenciometriniai matavimai	25
2.3.6. Gyvybingumo įvertinimas	26
Literatūra.....	27

SANTRUMPOS

CM	-citoplazminė membrana
EDTA	-etilendiamintetraacto rūgštis
GD	-gramicidinas D
IM	-išorinė membrana
IMP	-išorinės membranos kanalo baltymas
LB	-Luria-Bertani terpė
LPS	-lipopolisacharidas
MSB	-membranos sujungimo baltymas
MVS	-membraną veriantis segmentas
PAβN	- Fenilalanin-arginin-β-naftilamidas
PMB	-polimiksinas B
TPP ⁺	-tetrafenilfosfonio jonas

ĮVADAS

Bakterijų atsparumas antibiotikams yra aktuali medicinos problema, su kuria dažnai susiduriama gydant bakterines infekcijas. Atliekama daug tyrimų siekiant išsiaiškinti bakterijų atsparumo vaistams mechanizmus bei surasti efektyvius jų įveikimo metodus. Bakterijų atsparumą antibiotikams gali lemti tokie veiksniai, kaip sumažėjęs ląstelės sienelės laidumas, antibiotikų modifikacijos ląstelės fermentais, antibiotikų taikinio pakitimai ir daugiavaisčio atsparumo (DVA) siurbliai (Nelson, 2006).

Vienas pagrindinių daugiavaistį atsparumą *Escherichia coli* ląstelėms suteikiančių siurblių yra nuolat sintetinamas tridalis AcrAB siurblys, kuris yra koduojamas ląstelių chromosomoje (Ahmed ir kt., 2005). Dauginį atsparumą sąlygojančių siurblių veikla ir efektyvumas yra tiriami naudojant radioaktyviais izotopais žymėtus antibiotikus arba fluorescuojančius dažus, tokius kaip etidžio bromidas. Vienas pagrindinių faktorių, sąlygojančių bakterijų atsparumą tetraciklinui, yra nuo protonvaros jėgos priklausomas TetA siurblys, koduojamas transpozono Tn10. Šį siurblių koduojantys genai yra naudojami laboratoriniuose bakterijų kamienuose kaip genai-žymekliai. TetA siurblio veikla dažniausiai tiriama naudojant tričiu žymėtą tetracikliną bei įvairius jo analogus.

Yra žinoma, kad lipofiliniai katjonai, tokie kaip tetrafenilfosfonis (TPP⁺), yra geri daugelio bakterinių DVA siurblių substratai (Gros P., 1992, Moreira, 2004). Biochemijos ir biofizikos katedros Membranų biochemijos laboratorijoje buvo nustatyta (Buivydas ir Daugelavičius, 2006), kad TPP⁺ sąveikauja ir su atrankiu laikytu siurbliu TetA, nors šio junginio struktūra nėra analogiška tetraciklinams.

Šiame darbe buvo vykdoma minėtų siurblių veiklos analizė, kuriai buvo pritaikyti potenciometriniai matavimai, panaudojant TPP⁺ selektyvius elektrodus. Mano darbo tikslas buvo įvertinti TetA ir AcrAB siurblių efektyvumą *E. coli* ląstelėse ir iširti šių siurblių veiklos reguliavimo ypatumus. Siekiant šio tikslo, buvo iškelti tokie uždaviniai:

1. Iširti indikatorinio substrato - TPP⁺ jonų - panaudojimo galimybes *E. coli* DVA siurblių tyrimams;
2. Nustatyti indukavimo tetraciklinu įtaką DVA siurblių aktyvumui;
3. Iširti slopiklių rezerpino, chlorpromazino ir fenilalanin-arginin-β-naftilamido poveikį TetA ir AcrAB siurblių veiklai.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

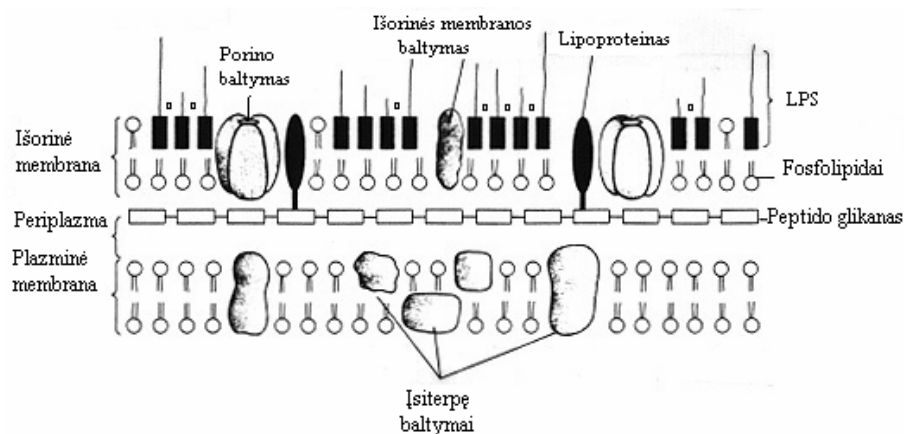
1.1. Gramneigiamųjų bakterijų apvalkalėliai

Gramneigiamųjų bakterijų ląstelės apvalkalėlį sudaro dvi membranos: vidinė-citoplazminė membrana ir išorinė membrana. Tarp šių membranų yra periplazminė erdmė, kuri sudaryta iš periplazminių ir kitų baltymų (1 pav.). Šioje erdmėje išsidėstęs peptidoglikano sluoksnis (Coyer ir kt., 1990).

Citoplazminė membrana sudaryta iš fosfolipidų bei periferinių ir integralinių membranų baltymų. Ji formuoja barjerą tarp citoplazmos ir periplazmos. Išorinės membranos dvisluoksniu išorinį paviršių formuoja jai būdingi lipopolisacharidai (LPS), o vidinį – fosfolipidai bei lipoproteinai, jungiantys išorinę membraną su peptidoglikano sluoksniu. Išorinės membranos barjerines savybes lemia joje esantys baltymai, LPS ir su LPS asocijuoti divalenčių metalų – Mg^{2+} ir Ca^{2+} - katijonai (Decad ir Nikaido, 1976). LPS sudaryti iš trijų pagrindinių dalių: lipido A, šerdies ir O-polisacharido. Lipidas A yra konservatyvi hidrofobinė LPS dalis. Jis yra katijoninių baltymų ir peptidų, tokių kaip polimiksinas B taikynys (Tsubery ir kt., 2002).

Membraniniai baltymai skirstomi į keletą grupių: porinus (OmpA, OmpC, OmpF, PhoE), stambiuosius baltymus (Ia, Ib, TolG ir lipoproteinai) ir smulkius (minorinius) baltymus (Beveridge ir Koval, 1981). Visų šių baltymų kiekis membranoje priklauso nuo bakterijų augimo sąlygų: temperatūros, terpės sudėties ir joninės jėgos.

Įvairios medžiagos per ląstelių membranas gali judėti keturiais pagrindiniais būdais: difuzijos, palengvintosios difuzijos, aktyviosios pernašos ir transporto pūslelių viduje. Visi membranų baltymai, kurie įtakoja membranų laidumą, skirstomi į tris klases. Pirmoji – siurbliai – tai fermentai, kurie jonų, antibiotikų ir kitų medžiagų pernašai gali panaudoti ATP hidrolizės metu išsiskiriančią energiją arba protonų jėgą. Jų pagalba medžiagos gali būti pernešamos prieš koncentracijos gradientą. Antrajai klasei priklauso nešikliai, kurie dalyvauja ištirpusių medžiagų pasyviame judėjime per membranas. Jų pagalba medžiagos juda pagal koncentracijos gradientą. Trečioji klasė – kanalai – jonams atrankios poros membranoje. Jonų kanalai apibūdinami trimis savybėmis: skvarba, selektyvumu ir vartų sistema (Doerrler, 2006).



1 Pav. Gramneigiamųjų bakterijų apvalkalėlio struktūra (<http://textbookofbacteriology.net/structure.html>).

1.2. Gramneigiamųjų bakterijų atsparumo antibiotikams veiksniai

Mikroorganizmų atsparumą antibiotikams lemia trys pagrindiniai mechanizmai: (1) antibiotiko taikinio pakeitimai; (2) antibiotiko modifikacijos ir/arba suardymas ląstelės viduje; (3) antibiotikų išstūmimas dėl pastovios arba indukuojamos aktyvaus išmetimo sistemų – siurblių – raiškos (Nelson, 2002).

Daugelis antibiotikų iš ląstelės yra išmetami dėl specifinių savo struktūrų, kurias efektyviai atpažįsta išmetimo sistemos. Šiuo atžvilgiu, antibiotikai yra atsitiktiniai transporto sistemų, saugančių ląsteles nuo egzogeninių, difuzinių molekulių, substratai. Išmetimo siurblius ląstelės gali formuoti ir tam, kad išstumtų mažai difuzines arba toksines endogenines molekules iš citozolio (Paulsen ir kt., 1996).

Genai, koduojantys išstūmimo siurblius, ir jų reguliatoriai yra chromosomose, plazmidėse arba transpozonuose, (pvz., *Tn10* transpozone esantys TetA siurblio genai *E. coli* bakterijose). Atsparumą vaistams užtikrinančių baltymų genai, esantys plazmidėse bei judriuosiuose genetiniuose elementuose, gali būti lengvai perduodami tarp bakterijų. Toks perdavimas gali vykti ir tarp filogenetiškai tolimų bakterijų rūšių (Bambeke ir kt., 2003).

1.2.1. Antibiotikus iš bakterijų išstumiančios pernašos sistemos

Antibiotikų išstūmimo iš bakterijų ląstelės fenomenas pirmą kartą buvo aptiktas 1980 m., tiriant atsparumo tetraciklinui mechanizmus enterobakterijose. Nuo tada buvo išaiškinta, kad antibiotikų išmetimas gali būti susijęs su daugiau nei vieno tipo išstūmimo siurbliais ląstelėje. Didžioji dalis tokių apsauginių bakterijų sistemų yra neatrankios substratui (1 lentelė), todėl iš ląstelės gali būti išstumiami beveik visų klasių antibiotikai (Lomovskaya ir kt., 2001). Pagal specifiškumą substratui, atsparumo siurbliai yra skiriami į dauginių ir specifinių antibiotikų pernašos sistemas (Nikaido, 1998).

Įvairių struktūrų cheminių junginių išmetimas gali būti pirminė fiziologinė dauginio atsparumo pernašos sistemų funkcija arba atsitiktinis neatpažintų fiziologinių substratų pašalinimas. Taip pat, dauginio atsparumo nešikliai gali dalyvauti apsaugant ląsteles nuo įvairių toksinų arba būti indukuojami kaip atsakas į ląstelės stresą (pvz., AcrAB siurblys *E. coli* bakterijose) (Putman ir kt., 2000).

Antibiotikų pernašos sistemos skiriasi savo mechanizmais. Kai kurios jų gramneigiamosiose bakterijose, kaip ir granteigiamosiose, antibiotikus išstumia tik pro citoplazminę membraną (2 pav. (a)). Tai neužtikrina pakankamos apsaugos, nes vyksta konkurencija tarp greito spontaniško lipofilinių junginių patekimo ir jų pašalinimo iš citoplazmos. Todėl žymiems atsparumo lygiams pasiekti reikalingas didelis apykaitos tempas (Nikaido, 1998). Vaistų nešikliai gramneigiamosiose bakterijose dažniausiai yra daugiakomponentės sistemos, sudarytos iš: su išorine membrana (IM) susijusių citoplazminės membranos jungiamųjų baltymų (MSB), IM transporto sistemos ir IM baltymų-kanalų. Tokios sistemos struktūriškai ir funkciškai užtikrina tiesioginį antibiotiko pernešimą į išorę per periplazmą (2 pav. (b)) (Veen ir kt., 1996). Sinergetinė abiejų aprašytų sistemų veikla sudaro sąlygas bakterijoms išgyventi, kai terpėje yra didelė ląstelei toksinų medžiagų koncentracija (Pumbwe ir kt., 2001).

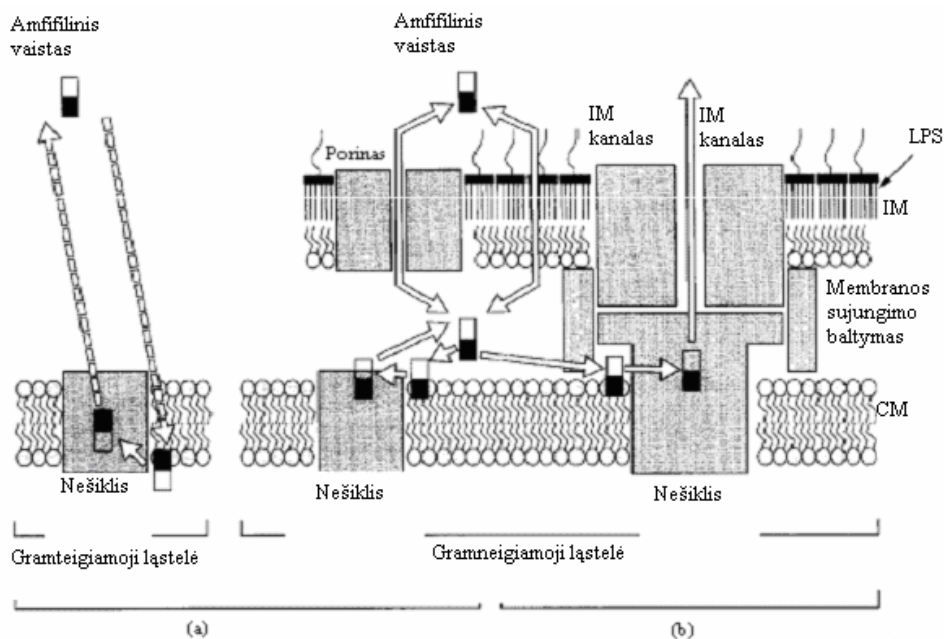
Pagal molekulinę struktūrą, veikimo mechanizmą, biocheminę sudėtį ir substratų išmetimui naudojamą energiją, antibiotikų siurbliai yra skirstomi į penkias šeimas (1 lentelė) (Nelson, 2002). ABC (ATF surišanti kasetė *angl.* ATP-Binding Cassette) ir MFS (didžioji nukreipiamoji, *angl.* „Major Facilitator“) yra didžiausios ir anksčiausiai atrastos antibiotikus iš ląstelės išmetančių baltymų didšeimės. Kitos trys yra mažesnės, tai – MATE (dauginio vaistų ir toksinų junginių išmetimo, *angl.* „Multidrug and Toxic Compound Extrusion“) ir SMR (mažoji dauginio atsparumo vaistams, *angl.* „Small Multidrug Resistance“) šeimos bei RND (atsparumo-pumpuravimosi-

ląstelės dalijimosi, *angl.* „Resistance Nodulation-CellDivision“) didšeimė (Pumbwe ir kt., 2001, Ian ir kt. 1996).

MFS ir SMR šeimų siurbliai randami ir gramneigiamosiose, ir gramteigiamosiose bakterijose, o RND ir MATE – būdingi gramneigiamosioms bakterijoms (Putman ir kt., 2000). Šių keturių šeimų siurbliai naudoja protonovaros jėgą ir, skirtingai nei ABC didšeimės siurbliai, turi svarbią neigiamai įkrautą aminorūgštis (pvz., Glu) liekaną, membranoje esančioje baltymo dalyje. Ši liekana gali veikti kaip magnetas, pritraukiantis teigiamą krūvį turinčius substratus iš vidinio membranos lapelio. Aplink esančios hidrofobinės amino rūgščių liekanos atpažįsta substratą pagal jo dydį ir formą. Dauginio atsparumo pernašos sistemos turi kelias substrato surišimo sritis.

1 Lentelė. Bakterijų siurblių klasifikacija (Lomonovskaya ir Watkins, 2001).

Šeima	Energijos šaltinis	Substarto specifiskumas	Amino rūgščių liekanų skaičius	Membraną veriančių domenu skaičius
ABC didšeimė	ATP hidrolizė	Specifinis ir nespecifinis (jonoforai, etidžio bromidas, alkaloidai, fosfolipidai)	skirtingas	6 ar 12
SMR šeima	Protonovaros jėga	Nespecifinis (antibiotikai, antiseptikai, TPP ⁺ , etidžio bromidas)	~110	4
MFS didšeimė	Protonovaros jėga	Specifinis ir nespecifinis (antibiotikai, katjoniniai dažai, TPP ⁺)	400-600	12-14
MATE šeima	Protonovaros jėga	Nespecifinis (dažai, aminoglikozidai)	>1000	12
RND šeima	Protonovaros jėga	Nespecifinis (detergentai, katjoniniai dažai, antibiotikai)	>1000	12



2 Pav. Dauginio antibiotikų išstūmimo sistemos bakterijose. (a) Gramteigiamosiose bakterijose: baltymas nešiklis veikia citoplazminėje membranoje vienas. Antibiotikai į ląstelę patenka laisvai ir yra išmetami į terpę. (b) Gramneigiamosiose bakterijose: antibiotikai į ląstelę gali patekti tiesiogiai per išorinę membraną arba porino kanalą. Kai antibiotikas pasiekia citoplazmą, siurblys jį gali išmesti į periplazmą. Dėl trikomponentės transporto sistemos komplekso veiklos, antibiotikai iš periplazmos ir išorinio citoplazminės membranos sluoksnio gali būti išmetami tiesiogiai į aplinką. Tokia sistema susideda iš trijų dalių: išorinės membranos kanalo, membranos sujungimo baltymo ir transporto sistemos (Nikaido, 1998).

1.3. Atsparumą antibiotikams lemiančios pernašos sistemos *E. coli* bakterijose

E. coli genome nustatyti daugiau nei 37 genai, koduojantys antibiotikų ir kitų vaistų išstūmimo siurblius, iš kurių 19 priklauso MFS, 3 – SMR, 7 - RND, 7 - ABC ir 1 - MATE šeimoms (Nishino ir Yamaguchi, 2001) (2 lentelė).

Chromosomose koduojami dauginio atsparumo genai yra reguliuojami MarA, transkripcijos aktyvatoriaus, koduojamo *marRAB* operone. Konstitutyvi šio operono ekspresija *E. coli* ląstelėse lemia dauginio atsparumo fenotipą. Be atsako į antibiotikus kontrolės, *mar* lokusas reguliuoja atsaką į kitus toksinius aplinkos substratus. MarR yra represorius, neigiamas reguliacinis baltymas. Operono *marRAB* produktai įtakoja ir nutolusius chromosominius genus, koduojančius įvairius baltymus: išorinės membranos porinus, vaistų išstūmimo, įskaitant AcrAB sistemą, ir superoksidams atsparumą suteikiančius baltymus (Moreira ir kt., 2004).

2 Lentelė. Antibiotikų išstūmimo siurbliai *E. coli* bakterijose.

Transporteris	Šeima	Substratas									
		AG	TET	OX	ML	CHL	RIF	NAL	FQ	SM	TMP
EmrE	SMR		+		+					+	
YdhE	MATE					+			+		+
TetA-E	MFS		+								
Bcr	MFS		+							+	
MdfA	MFS	+	+		+	+					
YceL	MFS								+		
YidY	MFS					+					
EmrB	MFS							+			
YebQ	MFS										+
SetA	MFS	+									
Fsr	MFS										+
AcrB	RND	+	+	+	+	+	+	+	+		+
AcrD	RND	+									
AcrF	RND		+		+		+				
YegN	RND								+		
YhiV	RND				+						
MacB	ABC				+						

AG – aminoglikozidai; TET – tetraciklinai; OX – oksazolidinonai; ML – makrolidai; CHM – chloramfenikolas; RIF – rifampicinas; FQ – fluorochinolonai; NAL – nalidikso rūgštis; SM – sulfamidai; TMP – trimetoprimas (Van Bambeke ir kt., 2003)

Antibiotikų specifinio nešiklio pavyzdys *E. coli* ląstelėse yra tetracikliną išstumiantis TetA siurblys. Tet baltymai, kurie priklauso MFS šeimai, gabena tetraciklino-divalenčių katijonų kompleksus ir tai yra principinis atsparumo mechanizmas šios klasės antimikrobinėms medžiagoms gramneigiamosiose bakterijose (Roberts, 1996).

1.3.1. ABC didšeimė

ABC siurbliai, naudodami ATP hidrolizės metu susidariusią energiją, dalyvauja daugelio medžiagų (dažų, jonoforinių peptidų, lipidų, steroidinių cukrų, amino rūgščių, jonų, antibiotikų, geležies kompleksų, polisacharidų ir baltymų) dvikryptėje pernašoje per ląstelės apvalkalėlį (Lomonovskaya ir Watkins, 2001, Borges-Walmsley ir kt., 2003).

ABC siurbliai turi keturis skirtingus domenus: du labai hidrofobinius membraninius domenus, kurių kiekvienas paprastai susideda iš šešių membraną veriančių α -spiralių, ir du hidrofilinius nukleotidų surišimo domenus, turinčius Walker A ir B motyvus. Individualus domenas gali būti ekspresuojamas kaip vienas arba keli suliejami baltymai (Putman ir kt., 2000, Borges-Walmsley ir kt., 2003).

Dauguma ABC vaistų pernašos sistemų lemia specifinę antibiotikų išnašą. Pirmasis prokariotų ABC siurblys LmrA buvo rastas *Lactococcus lactis* bakterijose. Tai 590 aminorūgščių ilgio membranos baltymas, turintis N-galinį hidrofobinį domeną, sudarytą iš šešių membraną veriančių α -spiralių, ir C-galinį hidrofilinį domeną, turintį ATF-surišančią kasetę. Kai kurie ABC nešikliai, įskaitant LmrA homologą MsbA *E. coli* bakterijose, gali pernešti lipidus (Putman ir kt., 2000).

1.3.2. MATE šeima

Šios šeimos atstovai dažniausiai sudaryti iš ~ 450 aminorūgščių ir turi 12 membraną veriančių segmentų. Jie turi topologinių panašumų su MF didšeimės siurbliais, tačiau homologijos tarp jų nėra. Šio tipo siurbliai buvo atskirti į šeimą, identifikavus dauginio atsparumo Na⁺ priešnašos baltymą NorM *Vibrio parahaemolyticus* bakterijose, kur jis suteikia atsparumą katijoniniams dažams, aminoglikozidams, fluorochinolonams ir chloramfenikoliams. Kitas MATE šeimos pavyzdys – YdhE – siurblys, suteikiantis *E. coli* atsparumą katijoniniams antimikrobiniais vaistams (Borges-Walmsley, 2003).

MATE yra sąlyginai nauja, lyginant su kitomis bakterijų siurblių šeimomis, todėl nėra žinoma apie jų struktūrą, reguliacijos mechanizmą (Borges-Walmsley ir kt., 2003, Moreira ir kt., 2004).

1.3.3. SMR šeima

SMR šeimai priklauso antibiotikų/protonų priešnašos sistemos, kurios savo procesams naudoja protonavaros jėgą (Borges-Walmsley ir kt., 2003). Šiai šeimai priklauso mažiausi žinomi vaistų išmetimo baltymai, dažniausiai sudaryti iš nedaugiau kaip 110 amino rūgščių. Remiantis struktūrinių tyrimų duomenimis, buvo nustatytas tvirtai supakuoto keturių spiralių antiparalelinio pluošto (*angl.* „tightly packed four-helix antiparallel bundle“) modelis. Skirtingai nei kitos keturios atsparumą užtikrinančių siurblių šeimos, SMR šeimos siurbliai sudaro tik 4 membraną veriančius segmentus.

Atsižvelgiant į dauginio atsparumo SMR šeimos mažą dydį, nustatyta, kad jie gali funkcionuoti kaip homooligomeriniai kompleksai, dažniausiai sudarantys trimerus (Putman ir kt., 2000).

Nors šios šeimos siurbliai priklauso dauginio vaistų atsparumo sistemoms, tačiau šalina iš ląstelės tik lipofilinius katijonus (įskaitant šiai cheminių junginių klasei priklausančius antiseptikus bei dezinfekcijos priemones) (Li ir Nikaido, 2004).

Modelinė SMR šeimos pernašos sistema yra *E. coli* ir kitoms enterobakterijoms būdingas EmrE siurblys. Tai 110 aminorūgščių hidrofobinis baltymas, sudarantis 4 TMS (Che Ma ir kt., 2003). Šis siurblys suteikia dauginį atsparumą katijoniniams hidrofobiniams junginiams: tetraciklinui, etidžio bromidui, metilviologenui, tetrafenilfosfoniui, antiseptikams bei dažams. Antibiotikų išstūmimas vyksta keičiantis dviejų heterodimerų konformacijai (Borges-Walmsley ir kt. 2003).

1.3.4. RND šeima

RND šeimos nešikliai, įvairių cheminių medžiagų (amfifilinių, lipofilinių molekulių, divalenčių katijonų ir kt.) transportui iš ląstelės, naudoja prtonovaros jėgą. RND šeimai priklausantys baltymai yra sudaryti apytiksliai iš 1000 aminorūgščių (Pumbwe ir kt., 2002, Rosenberg ir kt., 1999).

Antrinę RND tipo baltymų struktūrą sudaro 12 TMS, su dvejomis didelėmis kilpomis tarp 1 TMS ir 2 TMS bei 7 TMS ir 8 TMS. Membraną veriančiuose domenuose yra identifikuotos trys konservatyvios neigiamai įkrautos aminorūgščių. Daugelis dauginio atsparumo nešiklių substratų yra teigiami, todėl membranoje esantis neigiamas amino rūgštinų liekanų krūvis gali dalyvauti substrato surišime (Putman M. ir kt., 2000).

Gramneigiamosiose bakterijose RND šeimos pernešimo baltymai yra trikomponenčių sistemų dalis, kuriose jie sąveikauja su išorinės membranos kanalu per membranos sujungimo baltymą, esantį periplazmoje. Ši sąveika leidžia išstumti substratus per vidinę ir išorinę gramneigiamųjų bakterijų membranas (Pumbwe ir kt., 2002).

RND tipo pernašos sistemos yra identifikuotos visose trijose karalystėse: *Bacteria*, *Eukarya* ir *Archaea* (Moreira ir kt., 2004, Putman ir kt., 2000).

1.3.4.1. AcrB - dauginio atsparumo siurblys

AcrAB yra nuolat sintetinamas pagrindinis *E. coli* dauginio atsparumo vaistams tridalis siurblys (3 pav.). Jo biosintezė gali būti indukuojama streso ir atsako į ląstelės pažeidimus metu (Moreira ir kt., 2004, Ahmed ir kt., 2005).

AcrB yra vienas geriausiai žinomų RND šeimos narių. Šio baltymo homologų yra randama daugelyje patogeninių gramneigiamųjų bakterijų rūšių. Jis sudarytas iš 1048 aminorūgščių ir turi 12 membraną veriančių α -spiralių (Zgurskaya ir kt., 1999). Šis baltymas sąveikauja su išorinės membranos kanalu TolC ir membranos suliejimo baltymu AcrA. Šių trijų komponentų sistema gali išstumti įvairaus krūvio junginius - anijoninius, katijoninius, cviterjoninius ir neutralius – iš ląstelės tiesiai į terpę (Murakami ir kt., 2006).

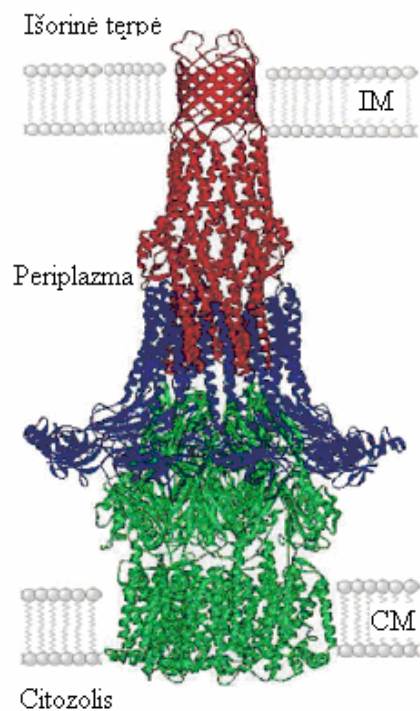
AcrB yra trimeras, sudarytas iš trijų sluoksnių, išsidėsčiusių paraleliai membranai: membraną veriančio, siurblio ir su TolC jungiamojo domenų. Siurblio domene yra funkciškai svarbus spiralių pluoštas – centrinė spiralė – sudaryta iš trijų α -spiralių. Su TolC jungiančiajame domene, AcrB atsidaro kaip tunelis, atitinkantis TolC galą. Šis ryšys įrodo tiesioginę AcrB ir TolC sąveiką (Murakami ir kt., 2006, Putman ir kt., 2000).

Išorinės membranos baltymas TolC yra trečiasis AcrAB transporto sistemos komponentas. Tai daugiafunkcinis baltymas, dalyvaujantis smulkių vaistų ir didelių polipeptidinių toksinų, tokių kaip hemolizinas, translokacijoje. Jis gali dalyvauti skirtinguose procesuose, tokiuose kaip substrato indukuota trumpalaikė sąveika su vaistų ar toksinų transporto baltymais (Borges-Walmsley ir kt., 2003).

TolC taip pat yra trimeras ir formuoja 140 Å cilindrinį kanalą, kuris veria išorinę membraną ir yra dalyje periplazmos (3 pav.). Šis tunelis gali laikinai atsidaryti po sąveikos su energizuotu vidinės membranos transporteriu ir sudaryti kanalą tarp citozolio ir išorinės aplinkos (Putman ir kt., 2000). TolC sudarytas iš dviejų dalių: išorinės membranos β -statinės domeno ir periplazminio α -spiralinio domeno. β -statinės domenas yra atviras kanalas išorinėje membranoje, sudarytas iš dvylikos β -klosčių. α -spiralinis domenas yra kairio sukimo dvylikos spiralių statinė (Borges-Walmsley ir kt., 2003, Murakami ir kt., 2006).

AcrB-TolC kompleksą supa AcrA baltymas (Murakami ir kt., 2006). Tai asimetrinis baltymas, priklausantis membranos suliejimo baltymų (MFP) šeimai (Putman ir kt., 2000).

RND tipo dauginio atsparumo siurblys AcrAB yra svarbus bakterijoms apsisaugant nuo antimikrobinių ir kitų organinių junginių. *acrA* geno produktas *E. coli* ilgai buvo žinomas kaip svarbus atsparumo veiksnys prieš pagrindinius dažus, detergentus ir antibiotikus. Tiriant šį lokusą, buvo išaiškinti du genai, *acrA* ir *acrB*, kurie yra lokalizuoti viename operone. Operono *acrAB* transkripcija *E. coli* bakterijose yra reguliuojama represoriaus AcrR (Putman ir kt., 2000).



3 Pav. AcrAB siurblio struktūra. Raudona spalva pažymėtas TolC kanalas; žalia – AcrB; mėlyna – jungiamasis baltymas AcrA (Putman ir kt., 2000).

1.3.5. MF didšeimė

MF didšeimė sudaryta iš membranos transporto baltymų, kurie randami visuose organizmuose nuo bakterijų iki aukštesniųjų eukariotų. Jie dalyvauja įvairių substratų, tokių kaip cukrūs, Krebso ciklo tarpiniai junginiai, fosfato esteriai, oligosacharidai ir antibiotikai, viennašoje, sąnašoje ir priešnašoje (Borges-Walmsley ir kt., 2003). Šie baltymai būdingi tiek gramneigiamosioms, tiek gramteigiamosioms bakterijoms. Jie gali būti skiriami į dvi grupes: sudarantys 12 ir 14 membraną veriančius segmentus (Putman ir kt., 2000).

MF didšeimės siurbLIAI paprastai sudaryti iš apie 400 aminorūgščių, kurios yra išsidėsčiusios į 12 membraną veriančių spiralių su didele citoplazmine kilpa tarp šeštos ir septintos spiralių. Tikėtina, kad ši struktūra susidarė dėl transporto baltymo genų padvigubėjimo. 14 membraną veriančių segmentų topologiją turi mažesnė šios didšeimės baltymų dalis, be to, šio tipo MF didšeimės nariai turi žymiai mažesnę citoplazminę kilpą (Borges-Walmsley ir kt., 2003).

Daugelis šios didšeimės sistemų medžiagų transportavimui į/iš ląstelės naudoja elektrocheminį gradientą, dažniausiai protonovaros jėgą (Borges-Walmsley ir kt., 2003; Li ir

Nikaido, 2004). Geriausiai žinomi šios šeimos transporto baltymų pavyzdžiai *E. coli* bakterijose yra MdfA ir TetA siurbliai.

1.3.5.1. MdfA siurblys

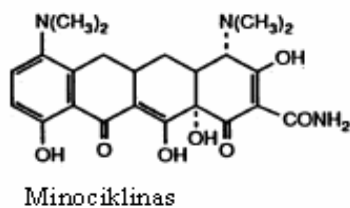
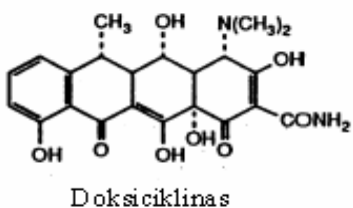
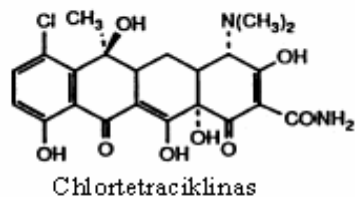
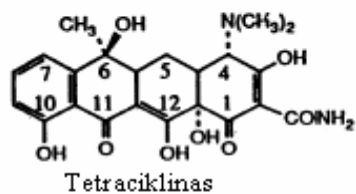
MdfA yra dauginio atsparumo siurblys, sudarytas iš 410 aminorūgščių ir veria citoplazminę membraną 12 kartų; N ir C galinės sritys nukreiptos į citoplazmą. TMS yra labai hidrofobiniai ir turi vieną neigiamą aminorūgšties liekaną, glutamatą 26 pozicijoje (Glu26), kuri yra svarbi substrato atpažinimui (Adler ir kt., 2002).

Genai, koduojantys šį transporto baltymą, yra lokalizuoti daugiakopijinėse plazmidėse. MdfA siurbliai suteikia ląstelėms atsparumą įvairų krūvį turintiems substratams: lipofiliniams kationams (pvz., etidžio bromidas, tetrafenilfosfonis), cviterjoniniams vaistams (pvz., ciprofloksacinas) ir neutraliems junginiams (Adler ir kt., 2004).

1.4. Tetraciklinai

Tetraciklinai yra plataus veikimo antibiotikų šeima. Pastarieji antibiotikai naudojami gydant gramneigiamųjų (*Neisseria gonorrhoeae*, *E. coli* ir kt.) ir granteigiamųjų (*Streptococcus pyogenes*, *S. pneumoniae* ir kt.) bakterijų sukeltas ligas. Šiai šeimai priklauso tetraciklinas, chlortetraciklinas, doksiciklinas, minociklinas (3 pav.) ir kiti junginiai. Tetraciklinai, prasiskverbę pro bakterijų citoplazminės membranos lipidų dvisluoksnį, slopina baltymų grandinių sintezę, neleisdami aminoacil-tRNR molekulėms susijungti su ribosomos 30S subvieneto akceptorine vieta (Sloan ir kt., 1994).

Kristalinė struktūrinė analizė rodo, kad ribosomos 30S subvienete yra daugiau nei šešios tetraciklino prisijungimo vietos (Hancock, 2005).



4 pav. Tetraciklinų struktūros (Rasmussen ir kt., 1991).

Tetraciklinas patenka į ląstelę pasyvosios difuzijos būdu per porinus OmpF ir OmpC, komplekse su divalenčių metalų jonais (Ca^{2+} ir Mg^{2+}) (Sapunaric ir Levy, 2005; Sloan ir kt., 1994). Katijoninis metalo-tetraciklino kompleksas yra traukiamas Donnan'o potencialo per išorinę membraną ir antibiotikas kaupiasi periplazmoje, kur kompleksas disocijuoja. Krūvio neturinčios tetraciklino molekulės, dėl pH gradiento tarp periplazmos ir citoplazmos difunduoja į ląstelės citozolį (Schnappinger ir Hillen, 1996).

Kai terpės pH yra artimas fiziologiniam, tetraciklinai gali egzistuoti dvejose laisvose formose: lipofilinėje nejonizuotoje (mažos energijos) ir hidrofiliinėje (didelės energijos) formoje. Abi šios formos yra reikalingos antibakteriniam tetraciklino aktyvumui pasireikšti. Mažai energijos turinti lipofilinė konformacinė forma reikalinga šio antibiotiko perėjimui per citoplazminę membraną, o daug energijos turinti hidrofiliinė forma gali prisijungti prie ribosomos (Rasmussen ir kt., 1991).

1.4.1. Atsparumą tetraciklinui įtakojantys veiksniai

Bakterijų atsparumą tetraciklinams gali lemti trys mechanizmai: aktyvus tetraciklino transportas iš ląstelės, ribosomų apsauga ir tetraciklinų modifikacija.

Nuo energijos priklausantis tetraciklino išmetimas vyksta protonų pakeitimo tetraciklino-katijono kompleksu būdu. Tai gali būti vertinama kaip priešnašos sistema, kuri naudoja protonų varomąją jėgą kaip energijos šaltinį ir yra slopinama junginių, naikinančių elektrocheminį protonų gradientą (Schnappinger ir Hillen, 1996).

1.4.1.1. Genetiniai elementai, lemiantys bakterijų atsparumą tetraciklinams

Gramneigiamųjų bakterijų atsparumas tetraciklinams priklauso nuo genų (*tetA*), kurio sužadinimas lemia atsparumo antibiotikui baltyminės sistemos sintezę. Šių genų raiška yra reguliuojama represoriniu baltymu TetR (Hancock, 2005).

Bakterijų atsparumą antibiotikams ir vaistams gali lemti judrieji genetiniai elementai. Vienas geriausiai ištirtų transpozonų yra *Tn10*, koduojantis atsparumą tetraciklinui įtakojanti siurblių *TetA*. Šio transpozono pagrindiniame regione yra 2 genai: *tetA* ir *tetR* (Traub ir Beck, 1985). Pirmasis – *tetA* koduoja struktūrinį *TetA* baltymą, esantį citoplazminėje membranoje, kitas – *tetR* genas koduoja represorių *TetR*. Represorius slopina abiejų genų transkripciją, surišdamas dvi operatorines vietas, sutampančias su *tetA* ir *tetR* promotoriais. Kai ląstelės auginamos be tetraciklino, represorius slopina *tetA* raišką, jei terpėje yra tetraciklino, jis, patekęs į ląstelę, jungiasi su represoriumi ir padaro jį neveikliu (Rothstein ir kt., 1993, Bambecke ir kt., 2003).

Tetraciklinas, patekęs į ląstelę, indukuoja transkripciją nuo *tetA* ir *tetR* genų promotorių, prisirišdamas prie *TetR* represoriaus (Lenski ir kt., 1994).

Manoma, kad *tet* genai, judriųjų genetinių elementų pagalba gali plisti tarp skirtingų ekosistemų bakterijų (Schnappinger, Hillen, 1996).

Atsparumas pavieniams antibiotikams, gramneigiamosiose bakterijose, dažniausiai sąlygojamas MFS didšeimės nešiklių. Šių baltymų genai dažniausiai yra aptinkami plazmidėse (Kobayashi ir kt., 2001).

TetA yra citoplazminis membranos baltymas, priklausantis MFS didšeimei. Jis palaiko periplazminę tetraciklino koncentraciją žemiau ląstelės augimo slopinimo lygio, nuo energijos priklausomu tetraciklino išmetimo iš ląstelės būdu. Šis baltymas turi 12 membraną veriančių α -spiralių ir yra perskirtas į dvi dalis: α ir β domenus (N-galinė ir C-galinė pusės, atitinkamai), kurie

yra išsivystę iš vieno domeno duplikacijos. Įrodyta, kad TetA funkcijai reikalinga abiejų domenų sąveika. Transporto sistemai priklauso ir vandens pripildytas membranos kanalas (Sapunaric ir Levy, 2005).

1.5. Atsparumą sąlygojančių siurblių slopikliai

Išryškėjęs bakterijų atsparumas antibiotikams skatina ieškoti analogiškų junginių, kurie neigiamai veiktų bakterijų gyvybingumą.

Vienas kelias yra ieškoti antibiotikų su naujais veikimo mechanizmais, kuriems bakterijos nėra išvysčiusios apsauginių sistemų. Kitas kelias – ieškoti atsparumo mechanizmus blokuojančių junginių, kurių pagalba žinomi antibiotikai išliktų efektyvūs (Putman ir kt., 2000).

Kaip žinoma, bakterijų antibiotikų išmetimo siurbliai išstumia iš ląstelės medžiagas, kurias atpažįsta kaip kenksmingas ar tiesiog svetimas ląstelei. Taigi junginiai, galintys paveikti ląstelės gyvybingumą, turėtų būti unikalios struktūros, kurios bakterijos negalėtų atpažinti, ir slopinti siurblių veikimą, nepakenkdami infekuoto organizmo ląstelių gyvybingumui, arba turėtų veikti kitas bakterijų struktūras nei jau žinomi antibiotikai, taip apeidami atsparumo mechanizmus (Bambeke ir kt., 2006).

Atsparumo tetraciklinams, kurį sąlygoja efektyvi siurblių veikla, įveikimo būdai: naujai sukurti, bakterijoms dar neatpažįstamos struktūros, tetraciklinų analogai; struktūriškai svetimi tetraciklinams junginiai, kurie slopintų tetraciklino siurblių veiklą, tokiu būdu didindami vidinę antibiotiko koncentraciją bakterijose (Lomovskaya, 2001).

Atsparumą antibiotikams slopinantys junginiai yra išskiriami į dvi kategorijas. Pirmajai slopiklių kategorijai priskiriami klinikinėje praktikoje naudojamų antibiotikų chemotipai, pasižymintys žemu esminiu antibakteriniu poveikiu. Išskiriamos trys pagrindinės šių junginių šeimos: tetraciklino, aminoglikozidų ir chinolonų analogai. Nustatytas minimalus šių junginių išmetimas iš bakterinių ląstelių. Antrajai kategorijai priskiriami slopikliai, struktūriškai nesusiję su žinomais antibiotikais. Kai kurie iš jų slopina daugiavaistį atsparumą įtakojančius siurblius (Bambeke ir kt., 2006).

Siurblių slopikliai gali veikti dvejopai. Vieni jų gali išsklaidyti ląstelės sienelės energijos gradientą, reikalingą siurblio veiklai (pvz., karbonilcianid-em-chlorofenilhidrazonas (CCCP) ir dinitrofenolis (DNP)), kiti - blokuoti pačius siurblius ir leisti veikti žinomiems antibiotikams (pvz., rezerpinas, chlorpromazinas ir kt.) (Piddock, 2006).

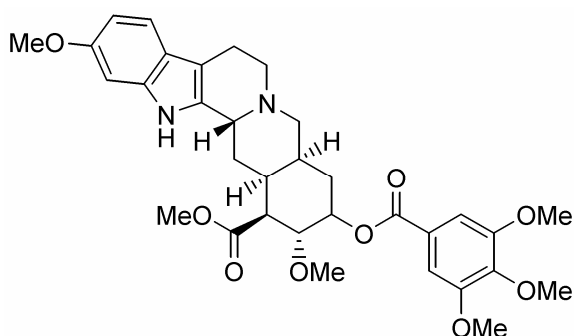
Siurblių slopikliai, naudojami kartu su antibiotiku, gali būti siurblio substrato konkurentais (pvz., TPP+ jonai) arba gali sutrikdyti išorinės membranos kanalo arba pačių tridalių siurblių sistemų funkcijas (Bambeke ir kt., 2006).

Pirmieji išmetimo siurblių slopikliai buvo atrasti tarp egzistuojančių vaistų. Populiariausias iš jų yra rezerpinas, bet panašus efektas buvo pastebėtas ir su fenotiozinais, kalcio antagonistais, serotonino įsisavinimo slopikliais ir protonų siurblių slopikliais. Didžiausias apribojimas kombinuojant šiuos vaistus su antibiotikais yra tas, kad siurblių slopinimui reikia žymiai didesnės koncentracijos nei reikalinga gydomajam efektui pasiekti. Todėl šių slopiklių tyrimai kol kas atliekami tik *in vitro* (Bambeke ir kt., 2006).

1.5.1. Rezerpinas

Rezerpinas (4 pav.) yra natūralus alkaloidas, išskiriamas iš *Rauwolfia vomitoria* augalų šaknų (Mullin ir kt., 2004). Medicinoje jis naudojamas kaip vaistas, mažinantis kraujospūdį (<http://en.wikipedia.org/wiki/Reserpine>). Šis junginys yra žinomas daugiavaisčio atsparumo siurblių slopiklis (Gibbons ir kt., 2000). Jis veikia įvairius daugiavaisčio atsparumo siurblius, nuo NorA (MFS) iki žmogaus P-glikoproteino (ABC) (Hsieh ir kt., 1998). Nustatyta, kad rezerpinas gali padidinti viduląstelinę antibiotiko koncentraciją, užblokuodamas membranos kanalus, ir taip įtakodamas ląstelės žūtį (Schmitz ir kt., 1998). Pavyzdžiui, naudojamas kartu su tetraciklinu, rezerpinas gali keturis kartu sumažinti šio antibiotiko slopinančią koncentraciją (Ruiz ir kt., 2005).

Nors šis vaistas jau naudojamas gydymui, tačiau vartojamų koncentracijų neužtenka siurblių blokavimui, o didesnės jos yra toksiškos eukariotinėms ląstelėms (Kaatz ir kt., 2003).



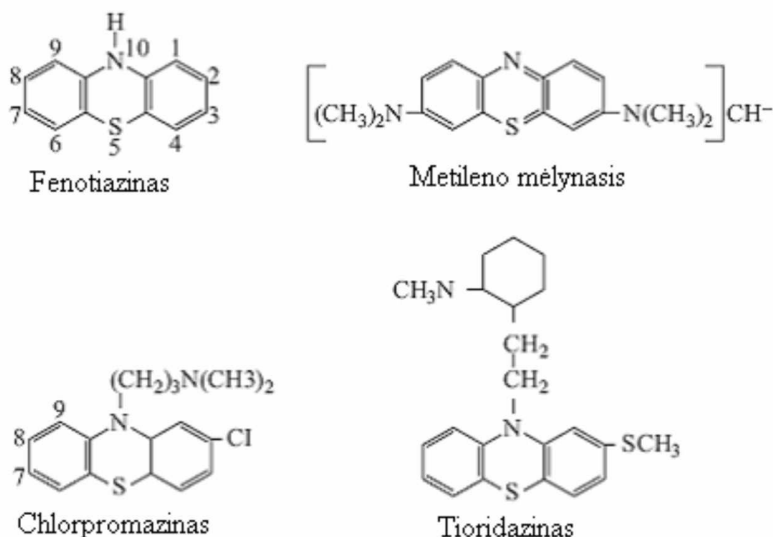
4 Pav. Cheminė rezerpino struktūra (<http://en.wikipedia.org/wiki/Reserpine>).

1.5.2. Chlorpromazinas

Chlorpromazinas priklauso antibiotikų, fenotiazinų (*angl.* “phenothiazines”), klasei (5 pav.). Šie antibiotikai naudojami nervinės sistemos ligų ir tuberkuliozės gydymui. Nustatyta, kad fenotiazinai blokuoja kalio jonų pasisavinimą ir taip slopina nuo kalio jonų priklausomos ATPazės veiklą, tuo pačiu ir transporto procesus žinduolių organizme bei bakterijose (Amaral ir kt., 2007).

Chlorpromazinas yra katijoninė amfipatinė molekulė, kuri, įsiterpusi į vidinį membranos lipidinio dvisluoksnio lapelį, indukuoja membranos topologijos pakitimus. Jis taip pat sukelia bendrą streso atsaką ir silpnina augimą, taigi jo slopinamasis efektas gali sukelti bendrą ląstelės fiziologijos sutrikimą (Hewlett ir kt., 1982). Nustatyta, kad fenotiazinai įsiterpia į DNR spiralės nukleotidus ir taip slopina su DNR susijusius procesus, tarp jų ir slopina replikaciją (Amaral ir kt., 2007).

Kaip ir kitiems antibiotikams, fenotiazinams yra atsparių bakterijų. Jų atsparumas taip pat gali būti susijęs su atsparumo siurbliais ir kitais ląstelė nuo antibiotikų poveikio saugančiais veiksniais (Amaral ir kt., 2000). Pavyzdžiui, chlorpromazinas yra AcrB siurblio substratas (Amaral ir kt., 2007).



5 pav. Fenotiazinų struktūros (Amaral ir kt., 2007).

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1. Reagentai, mikroorganizmai

Agaras	-Vlodivostok
Chloramfenikolis	-Roth
Chlorpromazinas	- Sigma
EDTA	- Serva
Fenilalanin-Arg- β -naftilamidas	- Sigma
Gliukoze	- Roth
Gramicidinas D	- Sigma
NaCl	- Roth
Polimiksinas B	- Sigma
Rezerpinas	-Sigma
Tetraciklinas	- Serva
TRIS·HCl	- Fluka
Triptonas Bacto	- Oxoid
Tetrafenilfosfonio chloridas	- Sigma
Mitybinis agaras	- Vlodivostok
Mielų ekstraktas	- Oxoid

Darbe naudoti laboratorijos mikroorganizmų kolekcijoje esantys *Escherichia coli* kamienai IQ86 (*zhd::Tn10, sps^f*), MC4100 (*F_{avaD 139lac}* Δ *U169thi relA rpsL mot*), KMY1 (MK12 λ RS45[Φ (*emrK'*-*lacZ*)] ir KMA1 (KMY1 *acrA::cat*).

2.2. Mitybinės terpės, tirpalai ir jų paruošimas

Mitybinės terpės ir tirpalai (išskyrus antibiotikus) autoklavuojami 0,5 val. 1 atm. slėgyje. Terpių sudėtis nurodyta 1 L distiliuoto vandens:

LB terpė	Triptonas	10 g
	Mielų ekstraktas	5 g
	NaCl	9 g

Agarizuota terpė	Mitybinis agaras	35 g
	Agaras	10 g

Tirpalai:

NaCl	0,9 %
Tris-HCl, pH 8,0	100 mM
EDTA, pH 8,0	195 mM

Antibiotikų tirpalai:

Tetraciklinas	20 mg/ml
Polimiksinas B	20 mg/ml
Gramicidinas D	5 mg/ml
Rezerpinas	10 mg/ml
Chlorpromazinas	20 mg/ml
Chloramfenikolis	70 mg/ml
PAβN	5 mg/ml

2.3. Darbo metodai

2.3.1. Ląstelių auginimas

Į 25 ml sterilios LB terpės mikrobiologine kilpele užsėjama viena bakterijų kolonija ir auginama per naktį purtyklėje, 37 °C temperatūroje. Auginant *E. coli* IQ86, KMY1 ir KMA1, į naktinės kultūros auginimo terpę pridedama atitinkamai 10 µg/ml tetraciklino, 25 µg/ml streptomicino ir 35 µg/ml chloramfenikolio. Užaugusi naktinė kultūra skiedžiama LB terpe iki optinio tankio (540 nm ilgio bangoje) 0,045 ir auginama 37 °C purtyklėje, kol optinis tankis pasiekia 1.

2.3.2. Ląstelių dorojimas EDTA

EDTA yra chelatinis junginys, kuris suriša divalenčius Mg^{2+} ir Ca^{2+} jonus. Šių jonų pašalinimas iš ląstelės padidina gramneigiamųjų ląstelių laidumą (Marvin et al, 1989).

Po centrifugavimo ląstelės sukcentruojamos 100mM Tris-HCl (pH 8) buferyje, 1/15 pradinio terpės tūrio, pridedamas reikiamas EDTA kiekis (galutinė koncentracija 2mM) ir inkubuojama 10 min 37°C purtyklėje. Ląstelės nusodinamos centrifuguojant 6000×rpm, 15 min. 4°C temperatūroje ir sukcentruojamos 100 mM Tris-HCl (pH 8) buferyje, 1/150 pradinio auginimo terpės tūrio.

2.3.3. TetA siurblio indukcija tetraciklinui

Auginamos kultūros (*E. coli* IQ86) optiniam tankiui pasiekus 0,75, į auginimo terpę pridedama reikiama tetraciklino koncentracija ir inkubuojama papildomai 15 minučių purtyklėje, 37 °C temperatūroje.

2.3.4. Ląstelių suspensijos ruošimas

Užaugusios iki optinio tankio 1, ląstelės centrifuguojamos 6000 rpm, 15 min. 4 °C temperatūroje, gautos nuosėdos sukcentruojamos 750 μl LB terpės. Bandymo metu koncentruota ląstelių suspensija laikoma lede, ne ilgiau kaip 5 valandas.

Paskaičiuojama, kiek mikrolitrų ląstelių suspensijos reikės įnešti į paruoštą mėgintuvėlį su 10 ml LB terpės, kad optinis tankis (540 nm ilgio bangoje) mėgintuvėlyje būtų 0.9.

2.3.5. Potenciometriniai matavimai

TPP⁺ jonų koncentracijų registravimui buvo naudojami membraniniai TPP⁺ jonams selektyvūs elektrodai. Elektrodai buvo prijungti prie signalo stiprinimo sistemos, pagamintos Biochemijos ir biofizikos katedroje, Membranų laboratorijoje, aukštą įėjimo varžą turinčio operacinio stiprintuvo AD549JH pagrindu. Duomenų perdavimo plokštės DT302 perduoda sustiprintą signalą į kompiuterį, kuriame registruojami TPP⁺ jonų koncentracijos pokyčių skaitmeniniai duomenys.

Kiekvieno matavimo pradžioje atliekama selektyvaus elektrodo kalibracija, pridedant į matavimo kiuvetę su buferiu tam tikrą TPP⁺ kiekį. Nusistovėjus elektrodo parodymams,

pridedamas reikiamas ląstelių kiekis. Nusistovėjus naujai TPP⁺ jonų koncentracijai matavimo kiuvetėje, pridedami tiriami priedai ir registruojami šių lipofilinių jonų koncentracijos pokyčiai.

Indikatorinio jono koncentracija terpėje apskaičiuojama, remiantis tiesine priklausomybe: E-f(IgC). Potencialas E išreiškiamas mV (pagal prietaiso parodymus). Žinodami tikslų terpės tūrį matavimo kiuvetėje, iš matavimo sistemos duomenų galime apskaičiuoti sugertą TPP⁺ jonų kiekį.

2.3.6. Gyvybingumo įvertinimas

Reikiamas kiekis ląstelių suspensijos įnešamas į mėgintuvėlį su 10ml skystos LB terpės, mėgintuvėlis kelias sekundes pamaišomas „Vorteksu“ ir 5ml LB terpės su ląstelėmis perkeliamas į kitą sterilų mėgintuvėlį, kurie inkubuojami 10 min. 37°C 165 aps./min. purtyklėje. Tokiu būdu gaunam identiška kontrolė.

Po 10 min. inkubacijos į vieną iš mėgintuvėlių su ląstelėmis pridedamas tam tikras kiekis antibiotiko (tetraciklino). Antrajame mėgintuvėlyje esančios kontrolinės ląstelės nebuvo paveikiamos jokiais priedais. Abu mėgintuvėliai toliau inkubuojami 20 min. 37 °C 165aps/min. purtyklėje.

Po inkubacijos ląstelės skiedžiamos ($2,6 \cdot 10^5$ kartų) ir išsėjamos po 50 μ l ir 100 μ l į Petri lėkšteles su agarizuota LB terpe.

Lėkštelės inkubuojamos 37 °C termostate 14-16 val., suskaičiuojamos užaugusios kolonijos ir lyginant su kontrole įvertinamas ląstelių gyvybingumas (%).

Literatūra

- Adler J. and Bibi E.** (2002). Membrane Topology of the Multidrug Transporter MdfA: Complementary Gene Fusion Studies Reveal a Nonessential C-Terminal Domain. *Journal of Bacteriology*, Vol. **184** (12), 3313–3320.
- Adler J. and Bibi E.** (2004). Determinants of substrate recognition by the *Escherichia coli* multidrug transporter MdfA identified on both sides of the membrane. *J. Biol. Chem.*, Vol. **279** (10), 8957-8965.
- Ahmed A. M., Shin-ichi M., Sumio S. and Tadashi S.** (2005). Molecular characterization of a multidrug-resistant strain of enteroinvasive *Escherichia coli* O164 isolated in Japan. *Journal of Med Microbiology* (2005), **54**, 273–278.
- Amaral L., Viveiros M. and Kristiansen J. E.** (2001). Phenothiazines: potential alternatives for the management of antibiotic resistant infections of tuberculosis and malaria in developing countries. *Tropical Med and International Health* **6**, 1016-1022.
- Amaral L., Martins M. and Viveiros M.** (2007). Enhanced killing of intracellular multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by compounds that affect the activity of efflux pumps. *JAC* **10**, 1093-1500.
- Beveridge, T. J. and Koval, S. F.** (1981). Binding of metals to cell envelopes of *Escherichia coli* K-12. *Appl Environ Microbiol* **42**, 325-35.
- Berens C. and Wolfgang H.** (2003). Gene regulation by tetracyclines. Constrains of resistance regulation in bacteria shape TetR for application in eukaryotes. *Eur. J. Biochem* **270**, 3109-3121.
- Buivydas A., Daugelavičius R.** (2006). Use of tetraphenylphosphonium ions for studies of activity of tetracycline-extruding pumps. *Biologija* Nr.2, 24-27.
- Borges-Walmsley, M. I., McKeegan, K. S. and Walmsley, A. R.** (2003). Structure and function of efflux pumps that confer resistance to drugs. *Biochem J* **376**, 313-38.
- Coleman D. C., I. Chopra, S. W. Shales, T. G. B. Howe, ir T. J. Foster** (1982). Analysis of Tetracycline Resistance Encoded by Transposon Tn10: Deletion Mapping of Tetracycline-Sensitive Point Mutations and Identification of Two Structural Genes. *J of Bacteriol*, **153**, 921-929.
- Coyer, J., Andersen, J., Forst, S. A., Inouye, M. and Delihis, N.** (1990). micF RNR in ompB mutants of *Escherichia coli*: different pathways regulate micF RNR levels in response to osmolarity and temperature change. *J Bacteriol* **172**, 4143-50.
- Decad G. M. and Nikaido H.** (1976). Outer Membrane of Gram-Negative Bacteria XII. Molecular-Sieving Function of Cell Wall. *J Bacteriol* **128**, 325-336.

- Doerrler W. T.** (2006). Lipid trafficking to the outer membrane of Gram-negative bacteria. *Mol Microbiology* **60**(3), 542–552.
- Elkins, C. A. and Nikaido, H.** (2002). Substrate specificity of the RND-type multidrug efflux pumps AcrB and AcrD of *Escherichia coli* is determined predominantly by two large periplasmic loops. *J Bacteriol* **184**, 6490-8.
- Haim T., Ofek I., Cohen S., and Fridkin M.** (2000). The Functional Association of Polymyxin B with Bacterial Lipopolysaccharide Is Stereospecific: Studies on Polymyxin B Nonapeptide. *American Chemical Society* **39**.
- Haim T., Ofek I., Cohen S., Eisenstein M., Fridkin M.** (2002). Modulation of the Hydrophobic Domain of Polymyxin B Nonapeptide: Effect on Outer-Membrane Permeabilization and Lipopolysaccharide Neutralization. *Mol Pharmacol*, **62**:1036–1042.
- Hancock R. E.W.** (2005). Mechanisms of action of newer antibiotics for Gram-positive pathogens. *Lancet Infect Dis* **5**: 209-18.
- Hewlett E. L., Myers G. A. and Pearson R. D.** (1982). Susceptibility of *Bordetella* Species to Growth Inhibition and Killing by Chlorpromazine. *Antimicrob agents and Chemotherapy* **23**, 201-206.
- Hsieh P.-C., Siegel S. A., Rogers B., Davis D., Lewis K.** (1998). Bacteria lacking a multidrug pump: A sensitive tool for drug discovery. *Applied Biological Sciences* Vol. **95**, p. 6602–6606.
- Gibbons S. and Udo E. E.** (2000). The Effect of Reserpine, a Modulator of Multidrug Efflux Pumps, on the *in vitro* Activity of Tetracycline Against Clinical Isolates of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Possessing the *tet(K)* Determinant. *Phytother. Res.* **14**, 139–140.
- Gros P., T. F., Tang-Wai D, Bibi E, Kaback HR.** (1992). Lipophilic cations: a group of model substrates for the multidrug-resistance transporter. *Biochemistry* **7**, 25-31.
- Kaatz G. W., Moudgal V. V., Seo S. M., and Kristiansen J. E.** (2003). Phenothiazines and Thioxanthenes Inhibit Multidrug Efflux Pump Activity in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, vol. **47** (2), 719–726.
- Kobayashi, N., Nishino, K. and Yamaguchi, A.** (2001). Novel macrolide-specific ABC-type efflux transporter in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **183**, 5639-44.
- Lenski R. E., Souza V., Duong L. P, Phan Q. G., Nguyen T. N. M. ir Bertrand K. P.** (1994). Epistatic effects of promoter and repressor functions of the *Tn10* tetracycline-resistance operon on the fitness of *Escherichia coli*. *Mol Ecology* **3**: 127-135.

- Loenarz C., Jimenez S. M. F., Haim T., and Mati F.** (2001). Structure Function Study of the Antimicrobial Peptide: Polymyxin B. *Scientific Reports of the International Summer Science Institute C3*, 29-34.
- Li, X. Z. and Nikaido, H.** (2004). Efflux-mediated drug resistance in bacteria. *Drugs* **64**, 159-204.
- Lomovskaya O. and Watkins W. J.** (2001). Efflux Pumps: Their Role in Antibacterial Drug Discovery. *Cur Med Chemistry* **8**, 1699-1711.
- Marvin, H. J., ter Beest, M. B. and Witholt, B.** (1989). Release of outer membrane fragments from wild-type *Escherichia coli* and from several *E. coli* lipopolysaccharide mutants by EDTA and heat shock treatments. *J Bacteriol* **171**, 5262-7.
- Mullin S., Mani Nagraj, and Grossman Trudy H.** (2004). Inhibition of Antibiotic Efflux in Bacteria by the Novel Multidrug Resistance Inhibitors Biricodar (VX-710) and Timcodar (VX-853). *Antimicrob agents and Chemotherapy* **48**, 4171–4176.
- Marquez B.** (2005). Bacterial efflux systems and efflux pumps inhibitors. *Biochimie* **87**, 1137-1147.
- Murakami S., Nakashima R., Yamashita E., Matsumoto Takashi, Yamaguchi Akihito** (2006). Crystal structures of a multidrug transporter reveal a functionally rotating mechanism. *Nature* **443**:14.
- Moreira M. A. S.; E. C. de Souza; C. A. de Moraes** (2004) Multidrug efflux systems in Gram-negative bacteria. *J. Microbiol.* vol.**35** (1-2).
- Ma C. ir Chang G.** (2004). Structure of the multidrug resistance efflux transporter EmrE from *Escherichia coli*. *PNAS* **101**, 2852-2857.
- Nishino, K. and Yamaguchi, A.** (2001). Analysis of a complete library of putative drug transporter genes in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **183**, 5803-12.
- Nikaido H.** (1998). Multiple antibiotic resistance and efflux. *Current Opinion in Microbiology* **1**: 516-23.
- Nelson M. L.** (2002). Modulation of Antibiotic Efflux in Bacteria. *Curr. Med. Chem. – Anti-Infective Agents*, **1**, 35-54 35.
- Paulsen Ian T., Brown Melissa H. and Skurray Ronald A.** (1996). Proton-Dependent Multidrug Efflux Systems. *Microb Reviews* **60**, 575–608.
- Peterson A. A., Fesik W. S., McGroarty J. E.** (1986). Decreased Binding of Antibiotics to Lipopolysaccharides from Polymyxin-Resistant Strains of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Antimic agents and Chemotherapy*, **31**, 230-37.

- Piddock L. J. V.** (2006). Clinically Relevant Chromosomally Encoded Multidrug Resistance Efflux Pumps in Bacteria. *Clinical Microbiol Rev*, Vol. **19** (2), 382–402.
- Pumbwe L., Piddock L. J.V.** (2002). Identification and molecular characterization of CmeB, a *Campylobacter jejuni* multidrug efflux pump. *FEMS Microbiology Letters* **206**: 185-86.
- Putman M., Hendrik W. van Veen, and Wil N. Konings** (2000). Molecular Properties of Bacterial Multidrug Transporters. *Microbiology and Mol Biology Rev*, Vol.64(4),672-693.
- Rasmussen, B., Noller, H. F., Daubresse, G., Oliva, B., Misulovin, Z., Rothstein, D., M., Ellestad, G. A., Gluzman, Y., Tally, F. P. and Chopra, I.** (1991). Molecular basis of tetracycline action: identification of analogs whose primary target is not the bacterial ribosome. *Antimicrob Agents Chemother* **35**, 2306-11.
- Rothstein, D. M., McGlynn, M., Bernan, V., McGahren, J., Zaccardi, J., Cekleniak, N. and Bertrand, K. P.** (1993). Detection of tetracyclines and efflux pump inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* **37**, 1624-9.
- Sapunaric, F. M. and Levy, S. B.** (2005). Substitutions in the interdomain loop of the Tn10 TetA efflux transporter alter tetracycline resistance and substrate specificity. *Microbiology* **151**, 2315-22.
- Schnappinger D., Wolfgang H.** (1996). Tetracyclines: antibiotic action, uptake, and resistance mechanisms. *Arch Microbiol* **165**: 359-369.
- Schneider, G. B., Schmitt M., Leybold C.** (2002). Picosecond time-resolved fluorescence of Tetracycline and its complexes with Mg⁺⁺ or Ca⁺⁺. *Genet Mol Res* **2**, 48-62.
- Sloan, J., McMurry, L. M., Lyras, D., Levy, S. B. and Rood, J. I.** (1994). The *Clostridium perfringens* TetP determinant comprises two overlapping genes: tetA(P), which mediates active tetracycline efflux, and tetB(P), which is related to the ribosomal protection family of tetracycline-resistance determinants. *Mol Microbiol* **11**, 403-15.
- Traub, B. and Beck, C. F.** (1985). Resistance to various tetracyclines mediated by transposon Tn10 in *Escherichia coli* K-12. *Antimicrob Agents Chemother* **27**, 879-81.
- Wiese A., M. M. nstermann, T. Gutsmann, B. Lindner, K. Kawahara, U. Za" hringer, U. Seydel** (1998). Molecular Mechanisms of Polymyxin B-Membrane Interactions: Direct Correlation Between Surface Charge Density and Self-Promoted Transport. *J. Membrane Biol.* **162**, 127–38.
- Van Bambeke F., Glupczynski Y., Plésiat P., J. C. Pechère ir P. M. Tulkens** (2003). Antibiotic efflux pumps in prokaryotic cells: occurrence, impact on resistance and strategies for the future of antimicrobial therapy. *J of Antimicrob Chemotherapy* **51**, 1055–1065.

Van Bambeke F., Pagès J.-M and Ving J. Lee (2006). Inhibitors of Bacterial Efflux Pumps as Adjuvants in Antibiotic Treatments and Diagnostic Tools for Detection of Resistance by Efflux. *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery*, **1**, 157-175.

Van Veen H.W., Bolhuis H., Putman M.and Konings W.N. (1996). Multidrug Resistance in Prokaryotes: Molecular Mechanisms of Drug Efflux. *Elsevier Science B.V.* **2**.

Zgurskaya H. I. and Nikaido H. (1999). Bypassing the periplasm: Reconstitution of the AcrAB multidrug efflux pump of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 7190–7195.