

VILNIAUS UNIVERSITETAS  
BIOCHEMIJOS INSTITUTAS

**Andrius Buivydas**

ANTIBIOTIKUS IŠMETANČIŲ POMPU VEIKLOS  
*ESCHERICHIA COLI* IR *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*  
LĄSTELĖSE TIESIOGINIS VERTINIMAS

Daktaro disertacijos santrauka  
Fiziniai mokslai, biochemija (04 P)

Vilnius, 2010

Disertacija rengta 2005-2010 metais Vilniaus universiteto Gamtos mokslų fakulteto Biochemijos ir biofizikos katedroje ir Helsinkio universiteto Biologijos mokslų katedroje.

*Mokslinis vadovas:*

prof. dr. Rimantas Daugelavičius (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, biochemija – 04 P)

*Mokslinis konsultantas:*

prof. dr. Dennis Bamford (Helsinkio universitetas, biomedicinos mokslai, biologija – 01 B)

Disertacija ginama Vilniaus universiteto Biochemijos mokslo krypties taryboje:

*Pirmininkas:*

prof. dr. Donaldas Čitavičius (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, biologija – 01 B)

*Nariai:*

prof. habil. dr. Vida Mildažienė (Vytauto Didžiojo universitetas, fiziniai mokslai, biochemija – 04 P)

prof. dr. Edita Sužiedėlienė (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, biochemija – 04P)

dr. Lida Bagdonienė (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, biochemija – 04 P)

doc. dr. Saulius Šatkauskas (Vytauto Didžiojo universitetas, biomedicinos mokslai, biofizika – 02 B)

*Oponentai:*

prof. dr. Alvydas Pavilionis (Kauno medicinos universitetas, biomedicinos mokslai, medicina – 07 B)

dr. Rolandas Meškys (Biochemijos institutas, fiziniai mokslai, biochemija – 04 P)

Disertacija bus ginama viešame Biochemijos mokslo krypties tarybos posėdyje 2010 m. birželio 11 d. 15 val. Vilniaus universiteto Gamtos mokslų fakulteto Didžiojoje auditorijoje

Adresas: M. K.Čiurlionio 21/27, LT-03101, Vilnius

Disertacijos santrauka išsiuntinėta 2010 gegužės mėn. 11 d.

Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus universiteto ir Biochemijos instituto bibliotekose

VILNIUS UNIVERSITY  
INSTITUTE OF BIOCHEMISTRY

**Andrius Buivydas**

REAL-TIME ASSESSMENT OF THE ACTIVITY OF  
ANTIBIOTIC EFFLUX PUMPS IN *ESCHERICHIA COLI*  
AND *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Summary of doctoral dissertation  
Physical sciences, Biochemistry (04 P)

Vilnius, 2010

This dissertation was prepared at the Department of Biochemistry and Biophysics, Faculty of Natural Sciences, Vilnius University and Department of Biological Sciences and Institute of Biotechnology, University of Helsinki

*Scientific supervisor:*

prof. dr. Rimantas Daugelavičius (Vilnius University, physical sciences, biochemistry – 04 P)

*Scientific advisor:*

prof. dr. Dennis Bamford (University of Helsinki, biomedical sciences, biology – 01 B)

The defense of the dissertation will be held at Vilnius University Council of Biochemistry:

*Chairman:*

prof. dr. Donaldas Čitavičius (Vilnius University, biomedical sciences, biology – 01 B)

*Members:*

prof. habil. dr. Vida Mildažienė (Vytautas Magnus University, physical sciences, biochemistry – 04 P)

prof. dr. Edita Sužiedėlienė (Vilnius University, physical sciences, biochemistry – 04P)

dr. Lida Bagdonienė (Vilnius University, physical sciences, biochemistry – 04 P)

doc. dr. Saulius Šatkauskas (Vytautas Magnus University, biomedical sciences, biophysics – 02 B).

*Opponents:*

prof. dr. Alvydas Pavilonis (Kaunas University of Medicine, biomedical sciences, medicine – 07 B)

dr. Rolandas Meškys (Institute of Biochemistry, physical sciences, biochemistry – 04 P)

The dissertation will be defended at the public session of the Council of Biochemistry at 15:00 on June 11, 2010 in the auditorium 214 at the Faculty of Natural Sciences, Vilnius University

Address: M. K.Čiurlionio 21/27, LT-03101, Vilnius, Lithuania

Posting date: May 11, 2010

The dissertation is available at the Libraries of Vilnius University and Institute of Biochemistry

## IVADAS

Antibiotikų atradimas buvo vienas iš didžiausių mokslo pasiekimų. Tačiau pradėjus plačiai taikyti peniciliną, žmonija susidūrė su bakterijų atsparumu priešmikrobinėms medžiagoms (Fernandes, 2006). Laiko bėgyje mikroorganizmai išvystė atsparumą visiems patvirtintiems antibiotikams. Infekcijų gydymas tapo sudėtingas dėl išsivysčiusio dauginio atsparumo antibiotikams (DAA). Atsparumą antibiotikams lemiantys veiksniai nebėra ribotas ligoninių reiškinys (Smith & Romesberg, 2007). Nenuosaikus antibiotikų naudojimas visuomenėje bei maisto pramonėje ženkliai paspartino atsparių bakterijų gausėjimą. Nuo 2006-ųjų metų pradžios Europos sąjungoje buvo uždrausta antibiotikus naudoti kaip augimo aktyvatorius (COD/2002/0073:22/09/2003 - Final legislative act). Tokiu būdu siekiama bent iš dalies sumažinti atsparumo antibiotikams plitimą (Levy & Marshall, 2004; Livermore, 2004).

Mikroorganizmai naudoja keletą atsparumo strategijų, kurių dėka tampa atsparūs įvairiems vaistams ir antiseptikams. Bakterijose yra aptinkami šie atsparumo mechanizmai: taikinio pakeitimas, antibiotikus ardantys fermentai, mažas ląstelės apvalkalėlio laidumas bei aktyvus kenksmingų medžiagų išmetimas iš ląstelės. Pastarojo mechanizmo indėlis yra pats didžiausias bakterijų DAA (Wright, 2007). Mikroorganizmų atsparumo antibiotikams didėjimą lemia pagrindinės evoliucijos varomosios jėgos – mutacijos ir horizontalus genų perdavimas. Be to, kartu su atsparumo genais, virulentiškumą lemiantys veiksniai gali būti perduodami iš vienu bakterijų kitoms. Tokiu būdu, įprastai aplinkoje aptinkamos bakterijos gali virsti patogeninėmis (Smith & Romesberg, 2007).

*Pseudomonas aeruginosa* yra lengvai prie aplinkos prisitaikančios gramneigiamosios bakterijos, todėl yra aptinkamos daugelyje ekologinių nišų. Be to, tai yra oportunistinės patogeninės bakterijos, sukeliančios pacientams su silpna imunine sistema sunkiai įveikiamas infekcijas (Wilson & Dowling, 1998). *P. aeruginosa* sukeltų infekcijų gydymo sunkumus lemia daugiavaistį atsparumą (DVA) užtikrinančios pompos, priklausančios RND (atsparumo-pumpuravimosi-ląstelės dalijimosi, iš angl. k. „resistance-nodulation-cell division“) didšeimei (Kumar & Schweizer, 2005). Svarbus faktas yra tai, kad egzistuoja visiems specifiniams *P. aeruginosa* sukeltų infekcijų

gydymui naudojamiems antibiotikams atsparūs klinikiniai izoliatai (Bonomo & Szabo, 2006).

Dauginį atsparumą vaistams lemiančių pompų veikimo mechanizmų atskleidimas ir gebėjimas greitai įvertinti šių pompų veiklos efektyvumą įvertinimas yra prioritetinės svarbos uždaviniai, nes tik tada gydytojai galėtų pritaikyti efektyvius infekcijų, kurias sukelia antibiotikams atsparios bakterijos, įveikimo būdus. DVA lemiančios pompos yra vienas iš labiausiai tyrinėjamų atsparumą antibiotikams lemiančių veiksnių (Pages & Amaral, 2009). Pompų identifikavimui yra naudojami keli metodai (Mesaros *et al.*, 2007; Vedel, 2005; Zhu *et al.*, 2007). Pompų aktyvumo įvertinimui dažniausiai naudojami fluorescuojantys molekuliniai zondai: etidžio bromidas (Babayan & Nikaido, 2004), pironinas Y (Pannek *et al.*, 2006) ir akriflavinas (Li *et al.*, 2004). Be paminėtų fluorescuojančių junginių, DVA pompų tyrimuose dar yra naudojami radioaktyviais izotopais žymėti antibiotikai (Aires & Nikaido, 2005; Li *et al.*, 2004), tetrafenilfosfonio jonai (Rotem & Schuldiner, 2004) arba kiti lipofiliniai junginiai. Tiek spektrofluorimetrinių, tiek ir radioizotopinių metodų procedūros (ląstelių centrifugavimas arba filtravimas, inkubavimas uždaruose laboratoriniuose induose) neigiamai paveikia bakterijų energetinę būseną, kuri įgalina pompų veiklą. Labai trūksta tiesioginių pompų tiesioginio veiklos vertinimo metodų, kurie suteiktų galimybę nepertraukiamai sekti ir detaliam nagrinėti DVA pompų veiklą ir palengvintų šių pompų slopiklių paiešką.

**Darbo tikslas:**

sukurti metodą antibiotikus išmetančių pumpų veiklos tiesioginiam vertinimui gramneigiamosiose bakterijose.

**Uždaviniai:**

- įvertinti tetracikliną išmetančios pompos TetA(B) veiklą *E. coli* ląstelėse;
- parinkti optimalias eksperimentines sąlygas tiesioginiams RND pumpų veiklos tyrimams *P. aeruginosa* ląstelėse;
- įvertinti RND pumpų veiklą klinikiniuose *P. aeruginosa* izoliatuose.

**Mokslinis naujumas**

Šiame darbe buvo sukurtas tiesioginis daugiavaistį lemiančių pumpų veiklos tiesioginio vertinimo metodas. Tuo tikslu buvo panaudoti tetrafenilfosfonio jonai (TPP<sup>+</sup>) ir jiems atrankūs elektrodai. Šio metodo didelis privalumas yra tai, kad jame nenaudojami nei radioaktyvūs, nei kenksmingi junginiai (pavyzdžiui, etidžio bromidas). Svarbus metodo privalumas yra ir tai, jog tyrimo metu yra kontroliuojama mėginio temperatūra ir aeracija. Be to, nereikia nutraukti eksperimento eigos, norint į bakterijų suspensijos mėginį įdėti tiriamų medžiagų priedus ar paimti bakterijų suspensijos mėginius kitiems tyrimams.

Buvo parodyta, kad temperatūra, terpės sudėtis ir aeracija turi didelę įtaką TPP<sup>+</sup> kaupimuisi *P. aeruginosa* ląstelėse. Kontroliuojant paminėtus faktorius, šiuo metodu galima gauti patikimus ir atsikartojančius rezultatus. Buvo parodyta, kad DVA pumpų veikla skirtingose *P. aeruginosa* augimo stadijose gali skirtis dėl kintančios terpės sudėties. Be to, buvo parodyta, kad *E. coli* pompa TetA(B) yra gimingesnė TPP<sup>+</sup> nei tetraciklinui.

Šio darbo metu gauti duomenys leidžia giliau pažvelgti į ląstelių fiziologijos įtaką DVA pumpų veiklai bei atskleidžia eksperimentų sąlygų standartizavimo svarbą, norint gauti kiekybiškai palyginamus duomenis.

## MEDŽIAGOS IR METODAI

**Bakterijų padermės.** *E. coli* MC4100 (F<sup>-</sup>araD 139 lacΔU169 thi relA rpsL mot<sup>-</sup>) (Casadaban, 1976); IQ86 (MC4100 *zdh::Tn10*) (Shiba *et al.*, 1984); *P. aeruginosa* PAO1 (laukinio tipo); PT629 (PAO1 *nalB*, padidėjusi *mexAB-oprM* raiška) (Kohler *et al.*, 1997b); EryR (PAO1 *nfxB*, padidėjusi *mexCD-oprJ* raiška) (Hamzehpour *et al.*, 1995); PAO7H (PAO1 *nfxC*, padidėjusi *mexEF-oprN* raiška) (Kohler *et al.*, 1997a); MutGR1 (PAO1 *mexZ*, padidėjusi *mexXY* raiška) (Vogne *et al.*, 2004); PAODeltaBex (PAO1 Δ*mexB*) padermė buvo gauta iš prof. Patrick Plésiat (CHU Minjoz, Besançon); klinikiniai izoliatai išvardinti 12 paveiksle.

**Terpės ir auginimo sąlygos.** *E. coli* ląstelės buvo auginamos Luria-Bertani (LB) terpėje (Sambrook & Russell, 2001), savo sudėtyje turinčioje 0,9% NaCl. *P. aeruginosa* ląstelės auginamos LB terpėje turinčioje 0,5% NaCl. Šokolado ir elektrolitų stokojančio cisteinolaktozės (CLED) agarizuotos terpės buvo naudojamos *P. aeruginosa* klinikinių izoliatų išskyrimui.

**Ląstelių suspensijos ruošimas.** Ruošiant ląstelių suspensiją, ląstelės auginamos iki OD<sub>540</sub> 1 (*E. coli* atveju) arba OD<sub>550</sub> 1 (*P. aeruginosa* atveju, jeigu nenurodyta kitaip), nusodinamos centrifuguojant 6000 g, 15 minučių 4°C temperatūroje ir resuspenduojamos buferiniame tirpale (100 mM Tris-HCl (pH 8) *E. coli* atveju, 100 mM natrio fosfato buferiniame tirpale (pH 8) *P. aeruginosa* atveju), 1/100 pradinio terpės tūrio. Tyrimo metu koncentruota ląstelių suspensija laikoma lede, ne ilgiau kaip 4 valandas.

**Minimalios slopinančios koncentracijos (MSK) nustatymas.** MSK buvo nustatinėjama *P. aeruginosa* PAO1, PT629 ir PAODeltaBex ląstelėms. MSK nustatymas buvo atliktas naudojant dvigubo mikroskiedimo metodą, 96 šulinėlių plokštelėse, LB terpėje. Pradinė ląstelių koncentracija buvo 5\*10<sup>5</sup> ląst./ml. Fenilalanil-arginil-β-naftilamido (PAβN) galutinė koncentracija buvo 60 μg/ml. MSK buvo nustatinėjamos ampicilinui, chloramfenikoliui, streptomycinui, triklozanui, tetraciklinui ir tetrafenilfosfonui.

***E. coli* gyvybingumo įvertinimas.** Į mėgintuvėlius su 5 ml skystos LB terpės pridedama ląstelių suspensijos iki OD<sub>540</sub> 0,9. Mėgintuvėliai (kontrolė ir bandinys) inkubuojami 10 min 37°C purtyklėje, po to pridedamas reikiamas tetraciklino priedas; kontrolė ir bandinys inkubuojami papildomai 20 min 37°C purtyklėje. Mėginiai skiedžiami 0,9% NaCl ir išsėjami Petri lėkštelėse su agarizuota LB terpe. Lėkštelės inkubuojamos 37°C temperatūroje. Po 14-16 valandų skaičiuojamos užaugusios kolonijos.

***tetA* indukcija tetraciklinu.** *E. coli* kultūros optiniam tankiui pasiekus 0,8, į auginimo terpę pridedamas reikiamas tetraciklino kiekis ir 15 minučių papildomai inkubuojama purtyklėje, 37°C temperatūroje. Po to ląstelės laidinamos EDTA, kaip aprašyta toliau.

***E. coli* laidinimas EDTA.** Ląstelės auginamos iki OD<sub>590</sub> 1, nusodinamos centrifuguojant 6000 g, 15 minučių 4°C temperatūroje ir resuspenduojamos 100 mM Tris-HCl (pH 8) buferyje 1/10 pradinio terpės tūrio. Į gautą suspensiją pridedama 2 mM EDTA ir inkubuojama 10 min 37°C purtyklėje. Po inkubacijos ląstelės nusodinamos



centrifuguojant ir resuspenduojamos 100 mM Tris-HCl (pH 8) buferyje, 1/100 pradinio auginimo terpės tūrio. Tyrimo metu suspensija laikoma lede, ne ilgiau kaip 4 valandas.

### ***P. aeruginosa* klinikiniai izoliatų išskyrimas**

63 *P. aeruginosa* klinikiniai izoliatai (pavadinimai pateikti 11 pav.) buvo išskirti iš paviršinių odos (kojų, pėdų ir pragulų) žaizdų. Mėginiai buvo surinkti 2007 metais iš 11 Helsinkio ligoninių ir 18 sveikatos centrų. Mėginiai buvo paimami steriliu vatos pagaliuku ir patalpinti į sterlius mėgintuvėlius. Tolesnėje eigoje mėginiai buvo išsėjami ant šokolado ir elektrolitų stokojančio cisteino-laktozės (CLED) agarizuotų terpių Petri lėkštelių. Lėkštelės buvo inkubuojamos 18 val. 35°C.

### ***P. aeruginosa* padermių atsparumas antibiotikams**

Atsparumas antibiotikams (ciprofloksacinui, ceftazidimui, meropenemui, piperacillin ir tazobaktamo mišiniui, tobramicinui ir amikacinui) buvo patikrintas su visomis, darbe naudotomis *P. aeruginosa* padermėmis, išskyrus PAOdeltaBex. Tyrimai buvo atlikti naudojant difuzinių diskų metodą. Atsparumas tirtiems antibiotikams įvertintas vadovaujantis CLSI rekomendacijomis ([www.clsi.org](http://www.clsi.org)).

### ***P. aeruginosa* klinikinių izoliatų grupavimas pagal DVA pompų veiklą**

*P. aeruginosa* klinikiniai izoliatai buvo sugrupuoti pagal jų sąveiką su TPP<sup>+</sup> ir tyrime naudotais junginiais. Izoliatų grupavimui buvo panaudota programa MVSP ver2.5, pasirenkant „Minimal variance“ (mažiausio variantiškumo, dar žinomas kaip Ward'o metodas) algoritmą. Vertinant pradinį TPP<sup>+</sup> sugėrimą, skaitinė vertė „1“ buvo suteikiama tokiais atvejais kai TPP sumažėjimas matavimo terpėje buvo nestebimas. Skaitinės reikšmės „2“ ir „3“ buvo suteikiamos, kai TPP<sup>+</sup> koncentracija terpėje sumažėdavo atitinkamai iki 1 arba daugiau nei 1 μM. Vertinant tolesnius *P. aeruginosa* sąveikos su TPP<sup>+</sup> etapus, priklausomai nuo atsako, buvo panaudotos reikšmės nuo „1“ iki „5“. „1“ buvo priskiriamas tuo atveju, kai atsakas į priedą būdavo priešingas (EDTA lemdavo ne papildomą TPP<sup>+</sup> sugėrimą, bet ištekėjimą iš ląstelių, žr. 11 pav.). „2“ buvo priskiriamas tokiu atveju, kai priedas nelemdavo jokio ląstelių atsako. Reikšmės „3“, „4“ ir „5“ atitinkamai būdavo priskiriamos, kuomet TPP<sup>+</sup> koncentracija matavimo terpėje pakisdavo <0,5 μM, 0,5-1 μM ir >1 μM. Gautos dendogramos ilgis buvo apribotas iki 30% viso ilgio, nes tolesniame grupavime persidengia skirtingos izoliatų savybės.

### **Potenciometriniai matavimai**

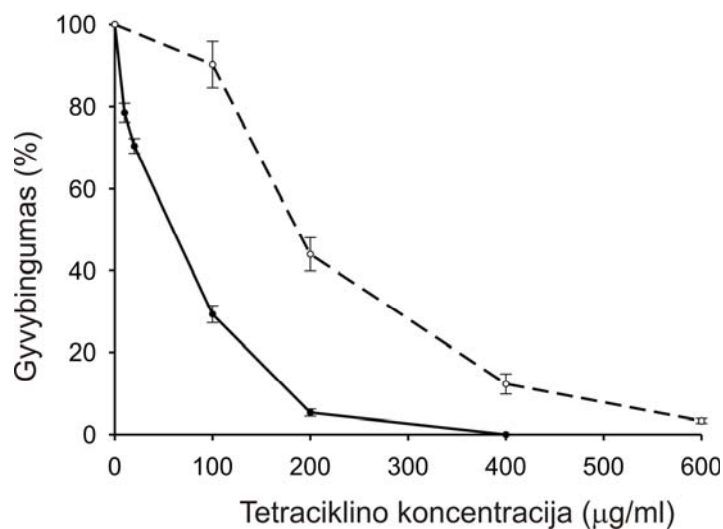
TPP<sup>+</sup> jonų koncentracija buvo registruojama potenciometriškai, naudojant TPP<sup>+</sup> jonams atrankius elektrodai (Daugelavicius *et al.*, 1997; Daugelavicius *et al.*, 2007). Kiekvieno eksperimento sąlygos nurodytos prie atitinkamų paveikslų. Eksperimentai buvo pakartoti 3 kartus, pateiktos tipinės kreivės.

## REZULTATAI

### 1. Tetracikliną išmetančios pompos TetA(B) veiklos vertinimas

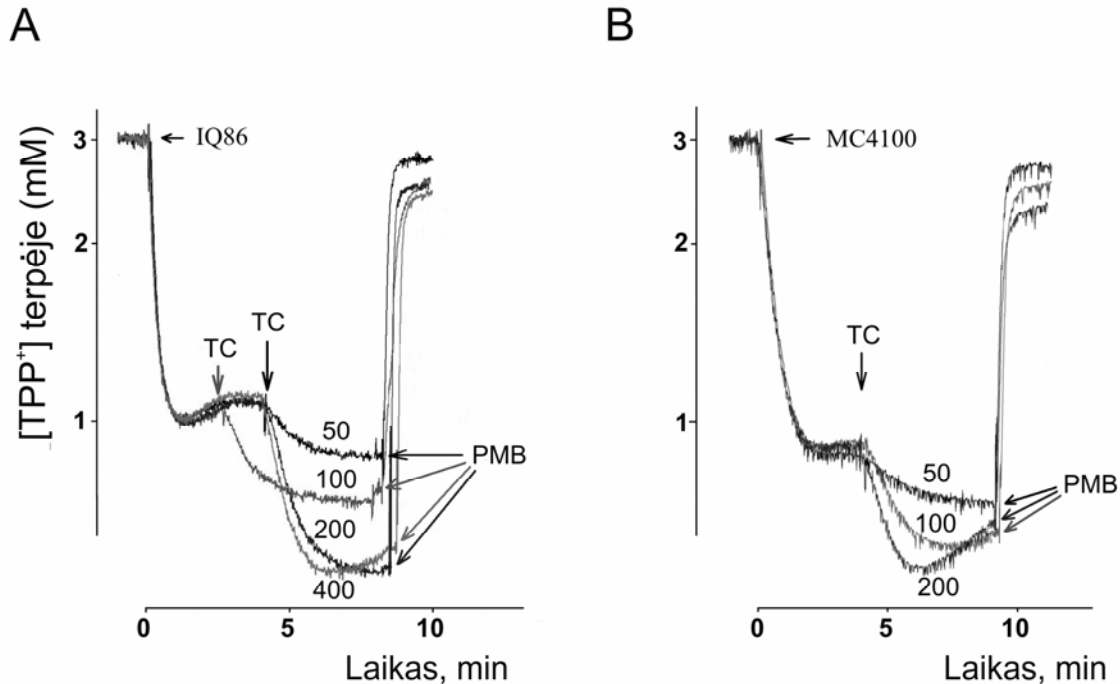
#### Tetraciklino įtaka *E. coli* gyvybingumui

Transpozone *Tn10* koduojamos TetA(B) pompos veiklos įvertinimui buvo pasirinktos *E. coli* izogeninės padermės – MC4100 (tėvinė padermė) ir IQ86. Buvo įvertintas šių bakterijų padermių gyvybingumas esant skirtingoms tetraciklino koncentracijoms terpėje. MC4100 padermės gyvybingumas siekė tik ~5%, kai tetraciklino koncentracija buvo 200  $\mu\text{g/ml}$ . IQ86 gyvybingumas buvo daug didesnis – gyvybingos ląstelės buvo aptinkamos net panaudojus 600  $\mu\text{g/ml}$  tetraciklino koncentraciją (1 pav.).



1 pav. *E. coli* IQ86 (punktūrinė linija) ir MC4100 (vientisa linija) gyvybingumas, esant skirtingoms tetraciklino koncentracijoms. Eksperimentai kartoti tris kartus, pateikti rezultatų vidurkiai, strypeliai – standartinė paklaida.

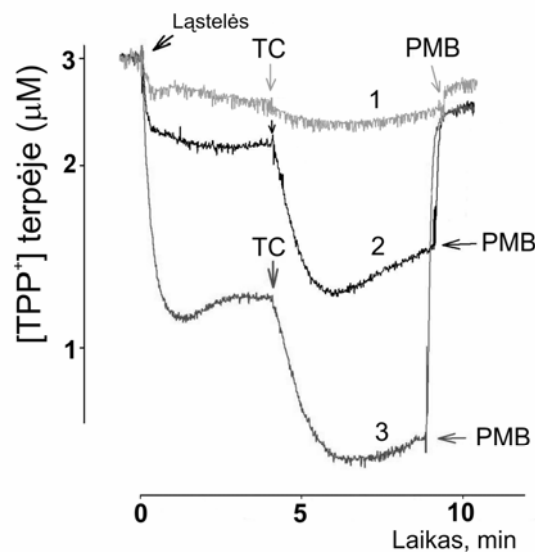
## TetA(B) pompos aktyvumas neindukuotose ląstelėse



2 pav. IQ86 (A) ir MC4100 (B) ląstelių sąveika su tetraciklinu. Eksperimentai buvo atlikti 100 mM Tris-HCl (pH 8) buferiniame tirpale, 37°C temperatūroje. Tris-EDTA dorotų ląstelių suspensiją įnešama į matavimo kiuvetę iki OD<sub>540</sub> 2. Tetraciklino galutinės koncentracijos (µg/ml) yra nurodytos prie kiekvienos kreivės. Polimksino B (PMB) galutinė koncentracija – 100 µg/ml.

MC4100 ląstelių pradinis TPP<sup>+</sup> sugėrimas buvo nedaug didesnis palyginus su IQ86 (2 pav.). Skirtumai tarp ląstelių sugerto TPP<sup>+</sup> kiekio buvo pastebėti naudojant tetraciklino 50 ir 100 µg/ml galutinės koncentracijos. Tačiau skirtumai tarp ląstelių pranyko, kai buvo panaudotos 200 µg/ml tetraciklino koncentracijos. Esant pastarajai tetraciklino koncentracijai MC4100 atveju buvo stebima ląstelių depoliarizacijos pradžia (2 pav., B). IQ86 atveju, ląstelių nežymi depoliarizacija buvo stebima tik pridėjus tetraciklino iki 400 µg/ml. Šie duomenys, kartu su aukščiau aprašytais gyvybingumo eksperimentais rodo, kad IQ86 ląstelės yra mažiau jautrios didesnėms tetraciklino koncentracijoms nei MC4100.

## TetA(B) pompos aktyvumas tetraciklinu indukuotose ląstelėse



3 pav. Tetraciklinu indukuotų MC4100 (kreivė 1) ir IQ86 (kreivė 2) ląstelių sąveika su tetraciklinu. Eksperimentai atlikti, kaip aprašyta 2 pav. Tetraciklino priedų galutinės koncentracijos 400 μg/ml. 3 kreivė yra pateikiama iš 2 pav. (A).

Tetraciklinu indukuotų MC4100 ląstelių (3 pav., 1-a kreivė) pradinis ir po tetraciklino priedo sugerti TPP<sup>+</sup> kiekiai buvo nedideli. Tetraciklinu indukuotų IQ86 (3 pav., 2-a kreivė) pradinis TPP<sup>+</sup> sugėrimas labai skyrėsi, lyginant su neindukuotomis (3 pav., 3-a kreivė) ląstelėmis. Tetraciklinu neindukuotos IQ86 ląstelės sukaupė ~1.9 karto daugiau TPP<sup>+</sup>, lyginant su indukuotomis. Po tetraciklino pridėjimo buvo stebimas ženklus TPP<sup>+</sup> koncentracijos sumažėjimas matavimo terpėje. Tetraciklinu indukuotos IQ86 ląstelės TPP<sup>+</sup> sugėrė ~1.7 karto daugiau, lyginant su indukuotomis. TetA(B) yra apibūdinama kaip tetraciklinui atranki pompa, tačiau didžiausia ląstelių TPP<sup>+</sup> sugertis buvo pasiekta tik su 300 kartų didesne (400 μg/ml) tetraciklino koncentracija nei TPP<sup>+</sup> (esant dar didesnėms tetraciklino koncentracijoms buvo stebima ląstelių depoliarizacija). Tai rodo, kad TPP<sup>+</sup> išmetimas į terpę nėra lygiavertiškai slopinamas net daug didesnėmis tetraciklino koncentracijomis.

## 2. RND didšeimės pompų tyrimai *P. aeruginosa* ląstelėse

### MexAB-OprM pompos įtaka *P. aeruginosa* gyvybingumui

2 lentelė. Skirtingų antibiotikų ir antibakterinių medžiagų MSK *P. aeruginosa* padermėms su skirtinga MexAB-OprM pompos raiška. Visų tirtų junginių koncentracijos nurodytos  $\mu\text{g/ml}$ . Galutinė PA $\beta$ N koncentracija – 60  $\mu\text{g/ml}$ . Sutrumpinimai: AP – ampicilinas, TET – tetraciklinas, CM – chloramfenikolis, STR – streptomocinas, TRI – triklozanas, TPP·Cl – tetrafenilfosfonio chloridas)

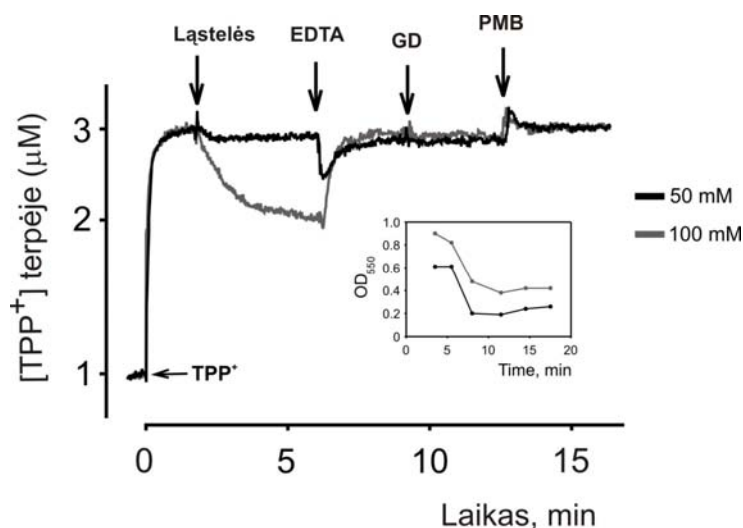
		<i>P. aeruginosa</i> padermės		
		PAO1	PT629	PAO $\Delta$ mexB
<b>Antibakterinė medžiaga</b>	AP	1024	1024	1024
	TET	16	64	16
	CM	16	128	16
	STR	16	16	32
	TRI	>1024	>1024	>1024
	TPP·Cl	>8192	>8192	>8192
<b>Antimikrobinė medžiaga + PA<math>\beta</math>N</b>	AP	64	256	128
	TET	4	8	4
	CM	0,5	1	0,5
	STR	32	32	32
	TRI	64	128	64
	TPP·Cl	512	1024	1024

MexAB-OprM pompos įtakos ląstelių jautrumo antimikrobinėms medžiagoms įvertinimui buvo pasirinktos skirtinga šios pompos genų raiška pasižyminčios *P. aeruginosa* padermės. Ženklių skirtumų tarp MSK nustatytų kiekvienai padermei nebuvo pastebėta, išskyrus tetraciklino ir chloramfenikolio atvejus, kuomet MSK PT629 ląstelėms buvo išskirtinai didesnės (1 lentelė). Naudojant PA $\beta$ N (RND didšeimės pompų slopiklį) kartu su antimikrobine medžiaga, buvo stebimas ženklus visų tirtų junginių, išskyrus streptomociną, MSK. Tokiu būdu buvo įsitikinta, jog didžioji dauguma tirtų junginių yra RND pompų substratai. Mažiausia TPP·Cl MSK reikšmė buvo stebima PAO1 ląstelėms – 512  $\mu\text{g/ml}$  (1,36 mM). Šie duomenys parodo, kad potenciometriniuose bandymuose naudojama TPP<sup>+</sup> koncentracija (3  $\mu\text{M}$ ) neturi įtakos ląstelių gyvybingumui.

### Terpės parinkimas *P. aeruginosa* ląstelių tyrimams

Ribotą gramneigiamųjų bakterijų TPP<sup>+</sup> sugėrimą gali sąlygoti šie veiksniai: i) mažas  $\Delta\psi$ ; ii) nepralaidi išorinė membrana; iii) intensyvi DVA pompų veikla. Labai

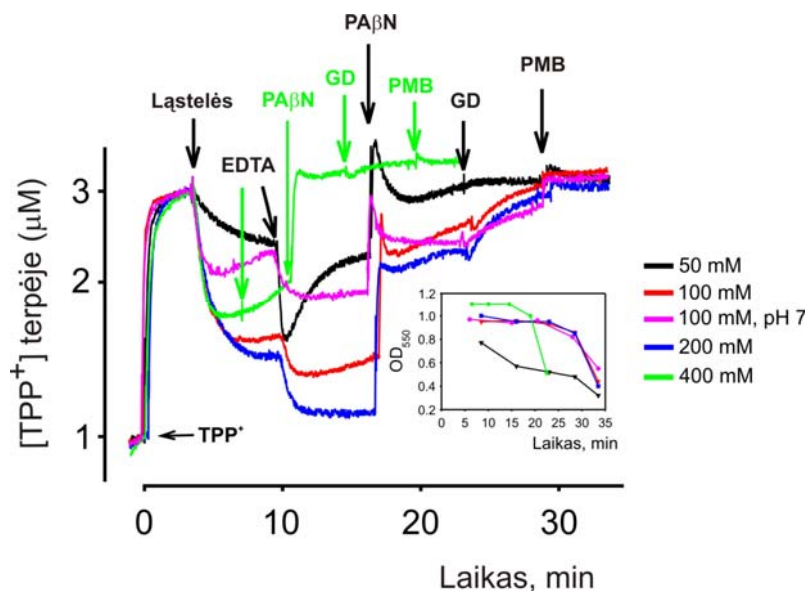
svarbu panaikinti arba įvertinti išorinės membranos barjerą, nes tiek išorinė membrana, tiek aktyvios išmetimo pompos trukdo nuo  $\Delta\psi$  priklausomam  $\text{TPP}^+$  kaupimuisi ląstelėse. Todėl reikia nustatyti eksperimento sąlygas, kuriomis būtų užtikrinamas pakankamai didelis ir nekintantis išorinės membranos laidumas. Be to, tokios sąlygos neturi daryti įtakos pumpų veiklai. Pagrindiniai enterobakterijų ląstelių išorinės membranos laidinimo būdai yra šie: ląstelių laidinimas Tris/EDTA (Daugelavicius *et al.*, 1997) arba pridėdant EDTA bandymo metu į Tris buferį suspenduotas ląsteles (Daugelavicius *et al.*, 2000). Tris/EDTA poveikyje iš enterobakterijų ląstelių į terpę atsiskiria dideli kiekiai lipopolisaharidų (LPS) (Alakomi *et al.*, 2003; Babayan & Nikaido, 2004). Manoma, jog LPS praradimą kompensuoja glicerofosfolipidai, sudarydami lipofiliniams junginiams laidžias lipidinio dvisluoksnio saleles ląstelių išorinėje membranoje. (Vaara, 1992).



4 pav. Tris/EDTA poveikis *P. aeruginosa* ląstelėms. Eksperimentai buvo atliekami 5ml Tris/HCl (pH 8) buferiniame tirpale, 37°C temperatūroje. Koncentruota PAO1 suspensija buvo dedama iki  $\text{OD}_{550}$  1. EDTA buvo pridėta iki galutinės 0,4 mM koncentracijos, GD ir PMB galutinės koncentracijos buvo atitinkamai 4  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ir 60  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .  $\text{OD}_{550}$  matavimams buvo imami 70  $\mu\text{l}$  mėginiai (intarpas).

*P. aeruginosa* ląstelių išorinė membrana buvo laidinama, veikiant šias Tris buferiniame tirpale suspenduotas bakterijas EDTA. 0,4 mM EDTA priedas į 100 mM Tris buferiniame tirpale esančią PAO1 ląstelių suspensiją lėmė visišką sugerto  $\text{TPP}^+$  ištekėjimą iš ląstelių. (4 pav., 100mM). Kai eksperimentai buvo atliekami 50 mM Tris buferyje, PAO1 ląstelės sukauptė tik nedidelį  $\text{TPP}^+$  kiekį po EDTA priedo, tačiau tolesniuose etapuose buvo stebimas greitas  $\text{TPP}^+$  ištekėjimas į terpę (4 pav., 50 mM). Sukaupto  $\text{TPP}^+$  staigus ištekėjimas į terpę bei suspensijos optinio tankio mažėjimas (4

pav., idėtinis pav.) parodė, kad EDTA priedas suardo PAO1 ląsteles. Todėl *P. aeruginosa* ląstelių dorojimas Tris/EDTA nėra tinkamas metodas šių ląstelių išorinei membranai laidinti.

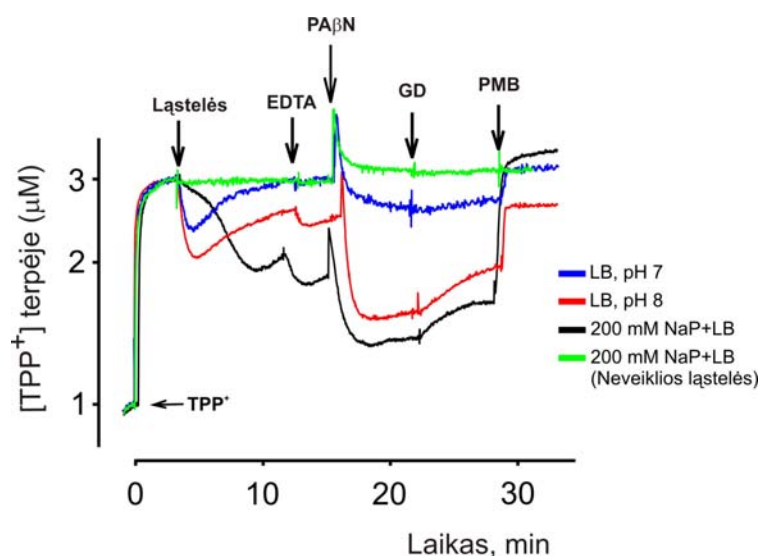


5 pav. Skirtingų natrio fosfato buferinio tirpalo koncentracijų įtaka *P. aeruginosa* pompų veiklai. natrio fosfato koncentracijos nurodytos paveiksle, visais atvejais tirpalo pH buvo 8, nebent nurodyta kitaip. Eksperimentai atlikti analogiškai, kaip aprašyta 4 pav. Galutinė PAβN koncentracija – 60 μg/ml.

Priešingai nei enterobakterijoms, EDTA gali laidinti *Pseudomonas syringae* išorinę membraną fosfato buferiniame tirpale (Daugelavicius *et al.*, 2005). Negalėdami pritaikyti Tris/EDTA *P. aeruginosa* išorinės membranos laidinimui, mes panaudojome natrio fosfato buferinį tirpalą ir EDTA. Joninė terpės jėga gali įtakoti išorinės membranos laidumą,  $\Delta\psi$  ir DVA pompų veiklą. Atsižvelgiant į tai, *P. aeruginosa* sąveika su TPP<sup>+</sup> buvo tiriama skirtingų natrio fosfato koncentracijų tirpaluose (5 pav.). EDTA laidinantis poveikis buvo stebimas visose tirtose natrio fosfato buferinio tirpalo koncentracijose, išskyrus 400 mM. Ląstelių optinio tankio mažėjimas buvo stebimas tik naudojant 50 mM natrio fosfato buferinį tirpalą. PAβN priedas visais atvejais lėmė staigų TPP<sup>+</sup> ištekėjimą iš terpės, tačiau neturėjo įtakos suspensijos optiniam tankiui (5 pav., intarpas). Kanalus membranose formuojantis antibiotikas gramicidinas D (GD) lemdavo papildomą TPP<sup>+</sup> ištekėjimą į terpę, tačiau ryškų ląstelių suspensijos optinio tankio sumažėjimas buvo stebimas tik po polikatijoninio antibiotiko polimiksino B

priedo. Šie duomenys rodo, kad PA $\beta$ N sukeltas staigus TPP<sup>+</sup> ištekėjimas į terpę yra plazminės membranos depoliarizacijos pasekmė. Būtina paminėti, kad šie rezultatai yra gaunami tik atliekant eksperimentus natrio fosfato buferiniame tirpale, be mitybinių medžiagų. Ląstelių sąveika su TPP<sup>+</sup> buvo stabiliausia naudojant 200 mM (pH 8) natrio fosfato buferinį tirpalą.

### Mitybinių priedų įtaka DVA pompų veiklai



6 pav. Mitybinių terpės komponentų įtaka DVA pompų veiklai. Eksperimentai buvo atliekami LB arba LB sumaišytoje santykiu 1:1 su 400 mM (pH 8) natrio fosfato buferiniu tirpalu. Žalia kreivė buvo gauta atliekant eksperimentus su neveikliomis, 15 minučių 70°C temperatūroje kaitintomis, ląstelėmis.

Jeigu RND didšeimės pompos išmeta TPP<sup>+</sup>, tuomet į terpę pridėjus pompų slopiklio PA $\beta$ N turėtų būti stebimas papildomas TPP<sup>+</sup> sugėrimas. DVA pompų aktyvumo sužadinimui dažniausiai kaip mitybinis priedas yra naudojama gliukozė (Lomovskaya *et al.*, 2001; Martins *et al.*, 2009; Pannek *et al.*, 2006). Tačiau stebint *P. aeruginosa* pompų veiklą fosfato buferiniame tirpale, po gliukozės priedų, nebuvo jokių TPP<sup>+</sup> sugerties pokyčių (duomenys nepateikiami). Todėl kaip mitybinį priedą buvo nuspręsta panaudoti LB terpę. Kaip matome iš 6 pav., grynoje LB terpėje PAO1 ląstelių pradinė TPP<sup>+</sup> sugertis buvo nedidelė, tačiau PA $\beta$ N priedas lėmė žymų TPP<sup>+</sup> kiekio sumažėjimą terpėje. Taip rodo, kad *P. aeruginosa* RND didšeimės pompos, išmetančios iš ląstelių TPP<sup>+</sup>, yra veiklios. Gramicidinas neturėjo pastebimo poveikio TPP<sup>+</sup> sugerčiai

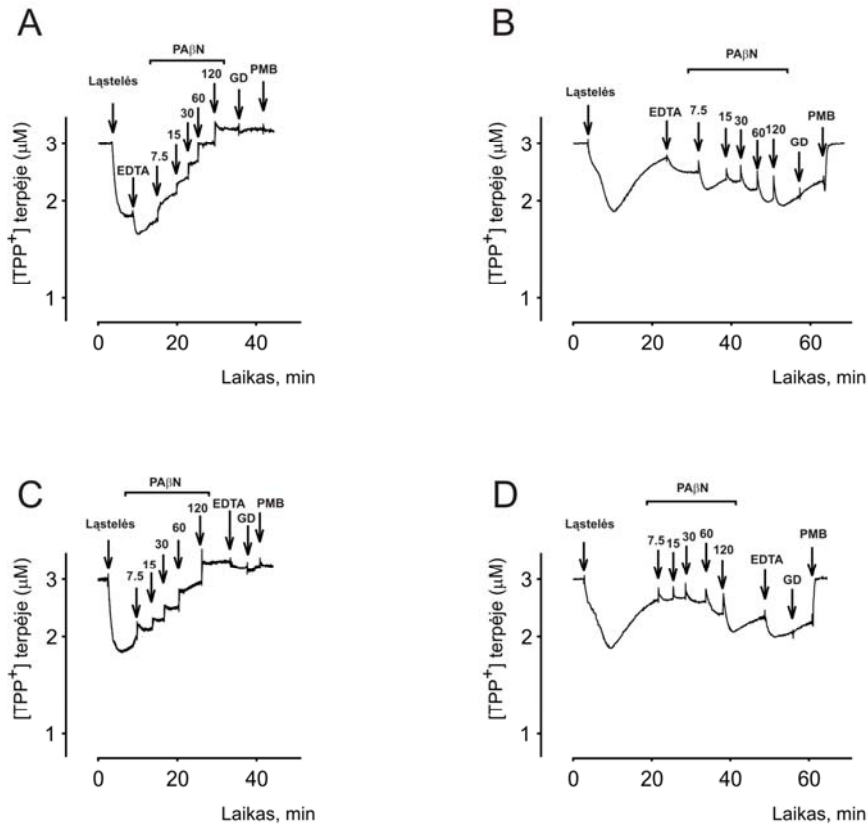


LB terpėje. Ląstelėse sukaupto  $\text{TPP}^+$  visišką ištekėjimą į terpę buvo stebimas tik pridėjus polimiksino B. Tai parodė, kad  $\text{TPP}^+$  susirišimas su ląstelėmis buvo sąlygotas  $\Delta\psi$  (6 pav.).

Skirtumai tarp pradinių  $\text{TPP}^+$  sugerčių natrio fosfato tirpale ir LB terpėje parodė, kad LB komponentai turi didelę įtaką DVA pompoms ir/arba PAO1 ląstelių išorinės membranos laidumui. Ląstelių geba kaupti  $\text{TPP}^+$  taip pat buvo priklausoma nuo pH (palyg. 5 pav. rožinę ir raudoną kreives; 6 pav. mėlyną ir raudoną kreives). Siekiant padidinti LB terpės buferinį talpumą, LB terpė buvo sumaišyta su 400 mM natrio fosfato buferiniu tirpalu (pH 8), santykiu 1:1. Pradinis  $\text{TPP}^+$  kaupimasis ląstelėse ir nedidelis laidinantis EDTA efektyvumas (lyginant su eksperimentais natrio fosfato buferiniame tirpale) buvo stebimas visais atvejais (žr. toliau), kai eksperimentų su ląstelių suspensijomis terpėje būdavo LB terpės priedas. PA $\beta$ N poveikis (papildoma  $\text{TPP}^+$  sugertis) visais atvejais buvo didelis, GD priedas nelemdavo didelių  $\text{TPP}^+$  koncentracijos pasiskirstymų tarp terpės ir ląstelių, o PMB lemdavo  $\text{TPP}^+$  ištekėjimą į terpę. Eksperimentu su neveikliomis ląstelėmis buvo parodyta, kad PA $\beta$ N neturi įtakos naudojamiems elektrodams (6 pav., žalia kreivė). Reziumuojant,  $\text{TPP}^+$  kiekių skirtumas terpėje prieš ir po PA $\beta$ N priedo gali būti traktuojamas, kaip šiam slopikliui jautrių išmetimo pompų aktyvumo matas.

## Skirtingų PAβN koncentracijų poveikis *P. aeruginosa* PAO1 ląstelėms

PAβN poveikiui *P. aeruginosa* PAO1 ląstelėms detaliau iširti buvo atlikti eksperimentai, laipsniškai didinant šio slopiklio koncentraciją terpėje (7 pav.).

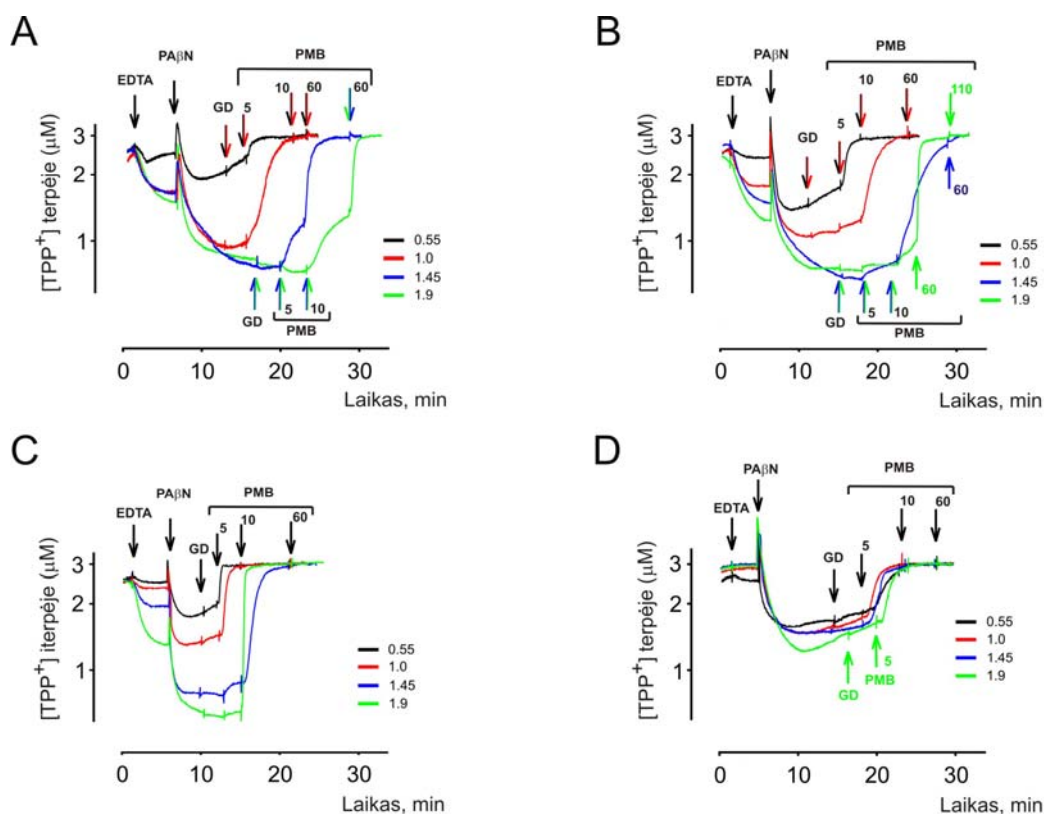


7 pav. PAβN poveikis *P. aeruginosa* PAO1 ląstelėms. Eksperimentai buvo atlikti 200 mM (pH8) natrio fosfato buferiniame tirpale (A ir C) ir LB sumaišytoje santykiu 1:1 su 400 mM (pH 8) natrio fosfato buferiniu tirpalu (B ir D). PAβN koncentracijos (μg/ml) nurodytos virš kreivių. Koncentruota ląstelių suspensija buvo dedama į matavimo terpę iki OD<sub>550</sub> 1. EDTA, GD ir PM priedai buvo pridėti iki atitinkamų galutinių koncentracijų 0,4 mM, 4 μg/ml ir 60 μg/ml.

Tyrimuose naudojant tik natrio fosfato buferinį tirpalą (7 pav. A ir C), didinant PAβN koncentraciją buvo stebimas bakterijų sukaupto TPP<sup>+</sup> atsipalaidavimas į terpę. EDTA priedas titravimo slopikliu pabaigoje nesukėlė papildomo TPP<sup>+</sup> kaupimosi ląstelėse, o GD ir PMB priedai nelėmė papildomo TPP<sup>+</sup> koncentracijos padidėjimo terpėje. Tai rodo, kad PAβN depoliarizavo PAO1 ląsteles. EDTA, GD ir PMB poveikiai skyrėsi, kai tyrimui buvo naudojama LB terpė, sumaišyta su 400 mM (pH 8) natrio fosfato buferiniu tirpalu. Jeigu ląstelės matavimo terpėje nebuvo laidinamos EDTA,

tuomet PAβN poveikis nebuvo stebimas iki 30 μg/ml šio slopiklio koncentracijos (7 pav. D). Toliau didinant PAβN koncentraciją iki 120 μg/ml, TPP<sup>+</sup> kiekis terpėje laipsniškai mažėjo, bet tokio titravimo pabaigoje į tiriamąją suspensiją pridėjus EDTA buvo stebimas papildomas TPP<sup>+</sup> kaupimasis ląstelėse. Tai parodo, kad PAβN efektyviai nėra išorinės membranos laidintojas. PAβN efektyvumas pastebimai sustiprėja, kai prieš šio slopiklio priedus ląstelės buvo pralaidinamos EDTA prieš šio slopiklio priedus (7 pav., B). TPP<sup>+</sup> kaupimosi ląstelėse padidėjimas stebimas esant mažiausiai tirtai PAβN koncentracijai (7,5 μg/ml). Esant didžiausiai tirtai PAβN koncentracijai (120 μg/ml), buvo stebima silpna ląstelių plazminės membranos depoliarizacija.

### Skirtingų augimo stadijų *P. aeruginosa* sąveika su TPP<sup>+</sup>



8 pav. Skirtingų augimo stadijų ląstelių sąveika su TPP<sup>+</sup>. PAO1 (A), PAODeltaBex (B) and PT629 (C) ląstelės buvo auginamos LB terpėje, aeruojant 37°C temperatūroje iki OD<sub>550</sub> nurodytų paveiksle. Reikiamo optinio tankio ląstelių kultūra buvo maišoma su 400 mM (pH 8) natrio fosfato buferiniu tirpalu. (D) dalyje PAO1 skirtingų augimo stadijų kultūros buvo praskiedžiamos LB terpe iki OD<sub>550</sub> 0,45 ir sumaišomos su 400 mM (pH 8) natrio fosfato buferiniu tirpalu, santykiu 1:1. EDTA, PAβN ir GD priedai buvo pridėti iki atitinkamų galutinių koncentracijų 0,4 mM, 60 μg/ml ir 4 μg/ml. PMB buvo pridėta iki koncentracijų (μg/ml), nurodytų paveiksle.

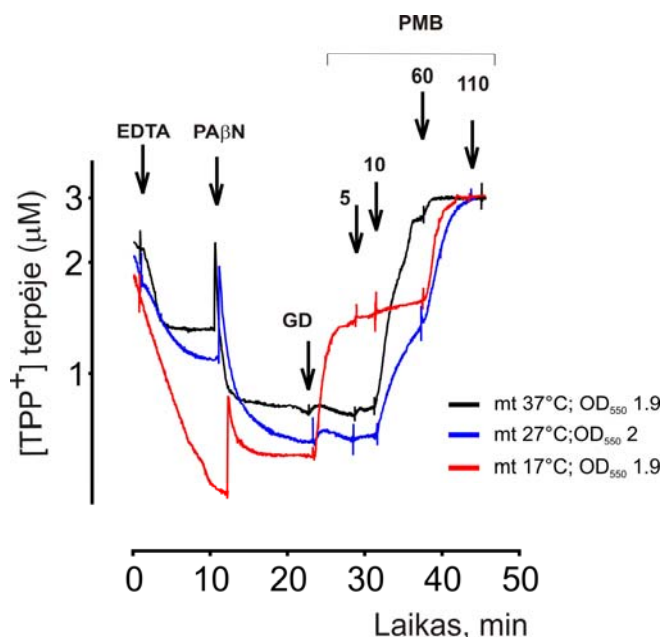
Koncentruota ląstelių suspensija yra naudinga, kai tiriami veiksniai turintys įtakos DVA pompų veiklai. Be to, galima atlikti keletą palyginamųjų eksperimentų su tomis pačiomis ląstelėmis, kurių koncentruota suspensija laikoma lede. Tačiau ląstelių energetinei būsenai gali turėti įtakos tokie eksperimento etapai kaip centrifugavimas, resuspendavimas mažuose tūriuose ir laikymas lede. Norint išvengti minėtųjų etapų, 2,5 ml mėginiai buvo tiesiogiai imami iš augančios ląstelių kultūros ir sumaišomi su vienodu tūriu 400 mM (pH 8) natrio fosfato buferinio tirpalo mažose matavimo kiubetėse.

EDTA poveikis PAO1 ląstelėms iš skirtingų augimo stadijų buvo skirtingas. PAO1 ląstelėms iš ankstyviausios augimo stadijos ( $OD_{550}$  0,55) EDTA poveikis buvo nedidelis, tačiau sustiprėjo vėlyvesnių augimo stadijų ląstelėms (8 pav., A). PAβN lėmė didelį  $TPP^+$  koncentracijos sumažėjimą terpėje visais tirtais atvejais. Gramicidino poveikis ląstelių sąveikai su  $TPP^+$  nebuvo stebimas. Mažesnių optinių tankių ( $OD_{550}$  0,55 - 1) ląstelių suspensijos buvo jautresnės polimiksino B priedams, lyginant su vėlyvesnio augimo ląstelėmis.

MexB yra plazminės membranos baltymas – atsakinga už substrato surišimą ir energijos panaudojimą MexAB-OprM pompos dalis (Guan & Nakae, 2001; Middlemiss & Poole, 2004; Sennhauser *et al.*, 2009). Pastaroji pompa išmeta iš ląstelės antibiotikus ir daugelį kenksmingų medžiagų, panaudodama protonų elektrocheminį gradientą (Li *et al.*, 1995; Li *et al.*, 2003; Tikhonova *et al.*, 2002). Mes palyginome, kaip skirtinga minėtosios pompos raiška pasižyminčios bakterijų padermės (PAO1 (8 pav., A), PAOdeltaBex (8 pav., B) ir PT629 (8 pav., C) sąveikauja su  $TPP^+$ . EDTA laidinimas nebuvo didelis, naudojant ankstyviausios augimo stadijos ląsteles ( $OD_{550}$  0,55). PAβN priedas lėmė didelius  $TPP^+$  koncentracijos pokyčius terpėje, tačiau pastarieji nebuvo stabilūs – buvo stebimas negreitas  $TPP^+$  koncentracijos didėjimas terpėje. EDTA laidinantis poveikis buvo skirtingas, tiriant vėlesnių augimų stadijų ( $OD_{550}$  1,0 – 1,45) ląsteles. MexAB-OprM padidėjusia raiška pasižyminčios padermės PT629 ląstelės sugėrė pastebimai mažesnę  $TPP^+$  kiekį, lyginant su PAOdeltaBex ir PAO1 padermėmis. Šis skirtumas išnyko, kai buvo tiriamos vėlyviausios augimo stadijos ( $OD_{550}$  1,9) ląstelės. Verta pastebėti, kad PT629 padermės ląstelė atsakai į priedus buvo pastebimai greitesni lyginant su kitomis dvejomis padermėmis.

Ląstelių augimo stadija arba kiekis gali įtakoti TPP<sup>+</sup> sugertį ir ląstelių jautrumą PMB. Į tai buvo atsižvelgta tiriant vienodą skirtingų augimo stadijų PAO1 ląstelių kiekį. Skirtingų augimo stadijų ląstelės buvo skiedžiamos LB terpe iki OD<sub>550</sub> 0,5 ir sumaišomos su natrio fosfato buferiniu tirpalu 1:1. Tokių PAO1 ląstelių suspensijų atsakai į priedus buvo panašūs (8 pav., D). Tokiu būdu buvo parodyta, kad DVA pumpų veikla priklauso nuo ląstelių augimo stadijos ir terpės sudėties.

### Temperatūros įtaka DVA pumpų veiklai

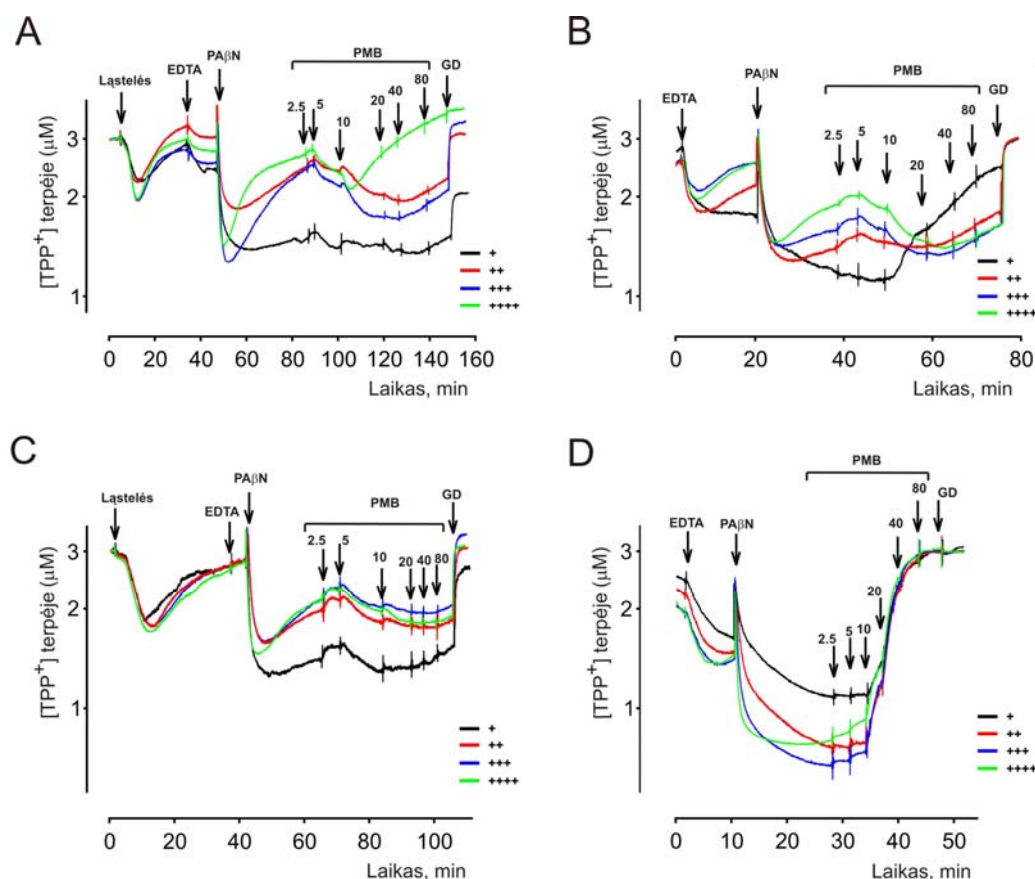


9 pav. Temperatūros įtaka *P. aeruginosa* PAO1 DVA pumpų veiklai. Eksperimente naudotos temperatūros yra nurodytos paveiksle. EDTA, PAβN ir GD priedų koncentracijos atitinkamai buvo 0,4 mM, 60 μg/ml ir 4 μg/ml. PMB galutinės koncentracijos (μg/ml) nurodytos paveiksle.

DVA pumpų veikla dažniausiai yra tiriama kambario arba 37°C temperatūroje. Norint įvertinti temperatūros įtaką DVA pumpų veiklai, buvo tiriamos per naktį užaugintos PAO1 ląstelės (9 pav.). Įprastai biologinių membranų laidumas lipofiliniams junginiams didėja kartu su temperatūra (Bhatti *et al.*, 1999; Rahmati-Bahram *et al.*, 1995). Tačiau PAO1 ląstelės 17°C temperatūroje išskirtinai greitai prisikaupė TPP<sup>+</sup>. EDTA neturėjo įtakos ląstelių laidumui – po priedo nebuvo stebimas greitesnis TPP<sup>+</sup> koncentracijos mažėjimas terpėje (9 pav., raudona kreivė). Šioje temperatūroje PAβN poveikio nebuvo, tačiau GD priedas lėmė didelį TPP<sup>+</sup> koncentracijos padidėjimą terpėje.

Esant 27°C ir 37°C temperatūroms, didelių skirtumų tarp atsakų nebuvo (9 pav. juoda ir mėlyna kreivės). Šie rezultatai rodo, kad nedideli GD poveikiai 27°C ir 37°C temperatūrose gali būti sąlygoti DVA pompų veiklos, kuri trukdo šiam antibiotikui pasiekti plazminę membraną.

### Aeracijos įtaka DVA pompų veiklai



10 pav. Aeracijos įtaka PAO1 ląstelių sąveikai su TPP<sup>+</sup>. Eksperimentai buvo atlikti su iki OD<sub>550</sub> 1 (A, B) arba per naktį augintomis ląstelėmis (C, D), 37°C temperatūroje. A ir C atvejais buvo naudojama koncentruota ląstelių suspensija, TPP<sup>+</sup> koncentracijos pokyčiai buvo registruojami LB terpėje sumaišytoje su natrio fosfato buferiniu tirpalu (pH 8), santykiu 1:1. B ir D atvejais mėginiai buvo imami tiesiogiai iš augančios bakterijų kultūros ir sumaišomi su natrio fosfato buferiniu tirpalu (pH 8), santykiu 1:1. Aeracijos intensyvumas buvo kontroliuojamas magnetine maišykle, intensyvumas žymimas „+“. EDTA, PAβN ir GD priedų galutinės koncentracijos buvo atitinkamai 0,4 mM, 60 μg/ml ir 4 μg/ml. PMB priedų galutinės koncentracijos nurodytos paveiksle (μg/ml).

Mėginio aeracija yra dar vienas DVA tyrimuose kintantis veiksnys. Norėdami įvertinti aeracijos įtaką *P. aeruginosa* DVA pompų veiklai, naudojome 30 ml termostatuojamas kiuvetes. Aeracijos lygis buvo keičiamas magnetinės maišyklės pagalba (Daugelavicius *et al.*, 2007).

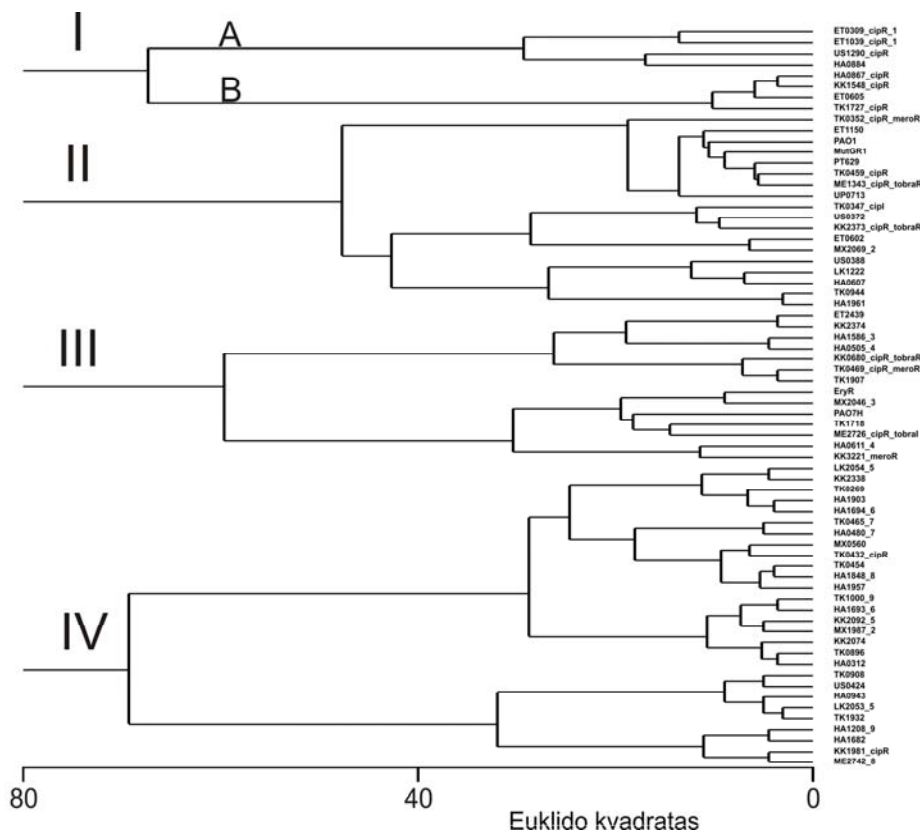
Koncentruota bakterijų suspensija, gauta iš iki OD<sub>550</sub> 1 užaugintų PAO1 ląstelių, buvo jautri aeracijos pokyčiams (10 pav., A). EDTA poveikis nebuvo didelis, PAβN nulemtas TPP<sup>+</sup> koncentracijos sumažėjimas buvo grįžtamas procesas, priklausantis nuo aeracijos intensyvumo. Maža PMB koncentracija lėmė PAO1 depoliarizaciją tik esant intensyviausiai aeracijai, kitais atvejais – mažos PMB koncentracijos lemdavo papildomą TPP<sup>+</sup> sugėrimą. GD priedas eksperimento pabaigoje sukeldavo visišką ląstelių depoliarizaciją. Priešingas polimiksino B poveikis buvo stebimas tiriant mėginį, tiesiogiai paimtą iš augančios kultūros – PMB mažose koncentracijose depoliarizavo tik tas ląsteles, kurios buvo mažiausiai aeruojamos (10 pav., B).

Analogiški tyrimai buvo atlikti su per naktį augintomis PAO1 ląstelėmis (10 pav., C ir D). EDTA laidinantis poveikis nebuvo stebimas, kai buvo tiriama koncentruota ląstelių suspensija. Ląstelių atsakai į priedus buvo mažiau priklausomi nuo aeracijos, lyginant su logaritminės augimo fazės ląstelėmis (palyg. 10 pav. A ir B su C ir D). Esant mažiausiai aeracijai, PAβN poveikis buvo mažiausias, kai tyrimai buvo atliekami su tiesioginiais mėginiais iš per naktį augintos bakterijų kultūros (10 pav., D).

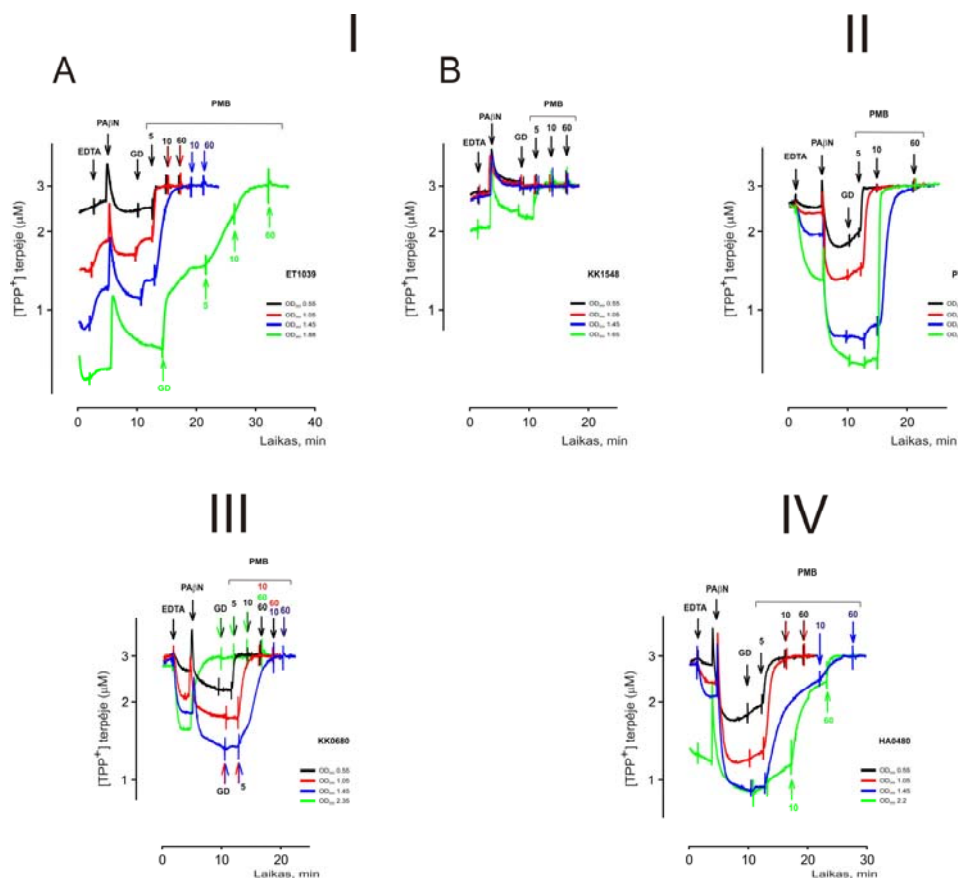
Gautieji rezultatai rodo, kad aeracijos intensyvumas ir bakterijų suspensijos tipas (koncentruota centrifuguojant ar tiesioginė iš augančios kultūros) turi reikšmingos įtakos DVA pompų veiklos tyrimams. Be to, pateikti rezultatai rodo, kad mitybinės terpės pokyčiai gali būti pagrindinė skirtingos DVA pompų veiklos skirtingose bakterijų augimo stadijose priežastis.

### **Klinikinių *P. aeruginosa* izoliatų tyrimai**

Visų klinikinių izoliatų (63) ir kontrolinių padermių (PAO1, EryR, MutGR1, PAO7H ir PT629) pompų veiklos skirtumai buvo įvertinti visose augimo stadijose, kaip aprašyta aukščiau 8 pav. apraše (A-C). Sugrupavus visus klinikinius izoliatų pagal DVA pompų atsakus į registravimo metu naudotus priedus (kaip aprašyta metoduose) buvo gautos 4 izoliatų grupės (11 pav.).



11 pav. Sugrupuotų klinikinių *P. aeruginosa* izoliatų dendograma. Numeris prie pavadinimų reiškia pacientą iš kurio buvo paimtas mėginys (tas pats numeris nurodo tą patį pacientą). CipI – vidutinis atsparumas ciprofloksacinui; cipR – atsparumas ciprofloksacinui; meroR – atsparumas meropenemui; tobrA – vidutinis atsparumas tobramicinui; tobrR – atsparumas tobramicinui;



12 pav. Skirtingų klinikinių *P. aeruginosa* izoliatų grupių tipiniai atstovai. Eksperimentai atlikti kaip aprašyta 8 pav. (A-C).



Kiekvienos grupės tipinio izoliato pompų registravimo rezultatai pateikti 12 paveiksle. Grupavimui naudotoje programoje MVSP ver2.5, buvo pasirinktas „Minimal variance“ (mažiausio variantiškumo) algoritmas, nes jo pagalba programa lygina vieno izoliato visas savybes su kitu. Kitų algoritmų atliekami grupavimai yra paremti atskirų savybių lyginimu. Dendogramose, gautose panaudojant kitus algoritmus („tolimiausio kaimyno“ ir „vidurkio“), panašia sąveika su TPP<sup>+</sup> pasižymintys izoliatai būdavo patalpinami į skirtingas grupes.

Tolesniuose grupių analizės etapuose buvo ieškota sąsajos su izoliatų atsparumu antibiotikams ir kilme iš to paties paciento. I-oje grupėje buvo santykinai daugiausia atsparių izoliatų (6 iš 8). II-oje (18 izoliatų) ir III-oje grupėse (14 izoliatų) atsparių izoliatų skaičius buvo atitinkamai 5 ir 4. IV-oje, didžiausioje grupėje (28 izoliatai) buvo mažiausiai antibiotikams atsparių izoliatų. Izoliatai išskirti iš tų pačių pacientų, pagal savo DVA pompų veiklos vertinimą buvo priskirti toms pačioms grupėms, išskyrus du izoliatus – MX2069 (II grupė) ir MX1987 (IV grupė) (12 pav.).

Kontrolinės *P. aeruginosa* padermės pasiskirstė dvejose grupėse. PAO1, MutGR1 ir PT629 II grupei, o EryR ir PAO7H – III grupei. Tai rodo, kad pritaikant apibūdintą DVA pompų veiklos tyrimo metodą galima taikyti, charakterizuojant klinikinius izoliatus.

## REZULTATŲ APTARIMAS

TPP<sup>+</sup> yra plačiai naudojami  $\Delta\psi$  tyrimuose, taip pat šis junginys yra universalus DVA pompų substratas. Šiame darbe pateikti tiesioginio DVA pompų vertinimo rezultatai, kurie buvo gauti naudojant neradioaktyvų TPP<sup>+</sup> ir šiam lipofiliniam katijonui atrankius elektrodus. Tiriant DVA pompas, mėginys yra aeruojamas ir palaikoma stabili pasirinkta temperatūra. Be to, į tiriamą ląstelių suspensiją gali būti dedami įvairūs priedai bei imami mėginiai tolimesniems tyrimams, nepertraukiant eksperimento eigos.

Išorinė ląstelės membrana turi įtakos DVA pompų substratų pasiskirstymui tarp aplinkos ir ląstelės vidaus. Turinčių krūvį substratų pasiskirstymą papildomai veikia ir  $\Delta\psi$ . TPP<sup>+</sup> turi keletą privalumų DVA pompų veiklos tyrimams: i) TPP<sup>+</sup> sąveika su bakterijų apvalkalėliu bei citozoliu yra nuodugnai išnagrinėta (Flewelling & Hubbell,

1986; Hockings & Rogers, 1996; Lolkema *et al.*, 1983); ii) šis lipofilinis katijonas mažiau veikia ląstelės funkcijas, lyginant su tokiais junginiais kaip etidžio bromidas, o eksperimentuose naudojamos koncentracijos neturi įtakos ląstelių gyvybingumui (1 lentelė); iii) naudojant TPP<sup>+</sup> galima pastebėti plazminės membranos depoliarizaciją, kurią gali sukelti kiti DVA pompų substratai ir/arba slopikliai (pvz., GD ir PAβN); iv) pakankamai nesudėtinga TPP<sup>+</sup> struktūra leidžia šio junginio chemines modifikacijas (Murphy, 2008). Pastaroji savybė gali būti naudinga tiriant tam tikras DVA pompas.

*Tn10* koduojama tetraciklinui atranki pompos TetA(B) biosintezė yra indukuojama tetraciklinu. Tačiau TPP<sup>+</sup> koncentracijos kitimo skirtumai su tetraciklinu neindukuotomis *E. coli* izogeninėmis padermėmis leidžia daryti prielaidą, kad TetA(B) pompos sintezė yra kosntitutyvi IQ86 padermėje. TetA(B) veikla išryškėja tiriant tetraciklinu indukuotų *E. coli* sąveiką su TPP<sup>+</sup> (3 pav.). MC4100 gyvybingumas bei nedidelė sąveika su TPP<sup>+</sup> po indukcijos tetraciklinu rodo, kad IQ86 ląstelių gyvybingumui ir TPP<sup>+</sup> kaupimo skirtumams (palyginus su neindukuotomis ląstelėmis) daugiausia įtakos turi *tetA* geno raiška. Taip pat tai patvirtina akivaizdūs TPP<sup>+</sup> kaupimosi skirtumai tetraciklinu indukuotose ir neindukuotose ląstelėse. Šie rezultatai parodo, kad panaudojus TPP<sup>+</sup> jonus ir jiems skirtus elektrodus tiesiogiai galima vertinti ne tik antibiotikus išmetančių pompų substratų konkurenciją, bet ir fiziologinius ląstelių skirtumus nulemtus skirtinga pompas koduojančių genų raiška.

Vienas iš pagrindinių veiksnių, lemiančių TPP<sup>+</sup> pasiskirstymą tarp terpės ir gramneigiamųjų bakterijų – išorinės membranos laidumas lipofiliniams junginiams. Mes pritaikėme natrio fosfato buferinį tirpalą ir EDTA *P. aeruginosa* išorinės membranos laidinimui, nes įprastinis Tris/EDTA dorojimas suardo PAO1 ląsteles (4 pav.). Lipofiliniai vandenyje tirpūs jonai (pvz., TPP<sup>+</sup>) į ląstelę gali patekti pro lipidinį dvisluoksnį arba pro ląstelės apvalkalėlyje esančius porinus. Nepaisant mažos molekulinės masės (339 Da), TPP<sup>+</sup> įveikia enterobakterijų išorinės membranos barjerą tik tada, kai suardomas LPS (Daugelavicius *et al.*, 1997; Daugelavicius *et al.*, 2000). Ląstelių padidėjęs TPP<sup>+</sup> kaupimas po EDTA priedo rodo, kad šis lipofilinis katijonas įveikia *P. aeruginosa* išorinę membraną per lipidinį bisluoksnį. Tačiau negalima teigti, jog tai yra vienintelis TPP<sup>+</sup> patekimo į ląstelę kelias. Palyginimui, *E. coli* poriniais gali keliauti hidrofiliniai junginiai, kurių masė neviršija 600 Da, tuo tarpu pagrindiniu *P. aeruginosa* porinu OprF gali pereiti 2,000–3,000 Da masės polisacharidai (Hancock &

Brinkman, 2002; Nikaido, 2003). Taip pat, reikia atsižvelgti į tai, jog hidrofobiniai junginiai gali įveikti išorinės membranos LPS barjerą pasinaudodami kitais baltymiais kanalais (Hearn *et al.*, 2009).

DVA pompų veiklą įmanoma nuslopinti panaudojant savituosius slopiklius, pvz. PAβN atrankiai slopinantį RND pompų veiklą. Mes pastebėjome, kad natrio fosfato buferiniame tirpale PAβN depoliarizuoja *P. aeruginosa* plazminę membraną, ko pasekmė yra ląstelių sukaupto TPP<sup>+</sup> ištekėjimas į terpę (5 pav.). Svarbu paminėti tai, kad naudojant neigiamą krūvį turinčius pompų substratus, PAβN lemiamą depoliarizacija nebūtų pastebima, nes tiek slopiklio poveikis, tiek plazminės membranos depoliarizacija nulemtų indikatorinių jonų papildomą kaupimąsi ląstelėse. Plazminę membraną depoliarizuojantis PAβN poveikis išnyksta pridėjus į terpę mitybinių medžiagų (LB) (6 pav.).

Anksčiau buvo parodyta, kad PAβN veikimas yra pagrįstas tiesiogine sąveika su pompomis, o ne plazminės membranos depoliarizacija (Lomovskaya *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 2003). Todėl negalima atmesti fakto, kad PAβN nulemta depoliarizacija natrio fosfato buferiniame tirpale yra dėl intensyvaus, Δψ sekinančio, PAβN išmetinėjimo iš ląstelių arba šio slopiklio sąlygoto trumpo membranos potencialo sujungimo. Antra vertus, rezultatai gauti fosfato buferiniame tirpale sumaišytame su LB parodo mitybinių priedų svarbą terpėje. Koch (1986) parodė, kad aktyvios bakterijų protonų pompos gali padidinti protonų koncentraciją išorinėje plazminės membranos dalyje apie 100 kartų. Šis faktas galėtų paaiškinti, kodėl reikalinga gliukozė norint suaktyvinti DVA pompas enterobakterijose (Lomovskaya *et al.*, 2001; Martins *et al.*, 2009; Pannek *et al.*, 2006) bei protono ir substrato susirišimą su išskirtomis DVA pompomis (Aires & Nikaido, 2005; Schuldiner, 2009).

Daugelis DVA tyrimų skystoje terpėje yra atliekami mikroskiedimų plokštelėse arba mažuose mėgintuvėliuose, kur aeracija yra nekontroliuojama. Mūsų tyrimai parodė, kad aeracija yra labai svarbi vertinant pompų veiklą (10 pav.). Tiriant koncentruotas ląstelių suspensijas ir tiesiai iš auginimo terpės paimtus logaritminės augimo fazės bakterijų mėginius (10 pav., A, B, C), po TPP<sup>+</sup> sugėrimo buvo stebimi grįžtamieji procesai – TPP<sup>+</sup> koncentracijos didėjimas terpėje. Ląstelėse sukaupto TPP<sup>+</sup> ištekėjimas į terpę nebuvo stebimas esant mažiausiai aeracijai. Tai leidžia manyti, kad esant

optimalioms augimui sąlygoms – turtingai terpei ir intensyviai aeracijai – *P. aeruginosa* gali atkurti išorinės membranos barjerą, kuris yra kliūtis tiriant DVA pompų veiklą lipofiliniais junginiais. Minėti grįžtamieji procesai išnyko, kai buvo tiriami per naktį augintų bakterijų tiesiai iš auginimo terpės paimti mėginiai. Tai rodo, kad ne tik aeracija, bet ir mitybinių komponentų gausa terpėje yra svarbūs veiksniai DVA pompų veiklos registravime.

Visų ląstelės DVA pompų veikla yra nepastovi bei gali būti nepilnai įvertinta esant palankioms augimo sąlygoms. Šiame darbe buvo parodyta, kad *P. aeruginosa* išmetimo pompų veikla priklauso ne tik nuo  $\Delta\psi$ , bet ir nuo terpės sudėties (6 pav., 10 pav.), ląstelių augimo stadijos (8 pav., 10 pav.), aeracijos (10 pav.) bei temperatūros (9 pav.). Taip pat buvo parodyta, kad, atsižvelgiant į visus apibūdintus eksperimentų veiksnius, TPP<sup>+</sup> jonai gali būti naudojami efektyviam tiesioginiam DVA pompų aktyvumo vertinimui.

Publikuotų duomenų, kur būtų pateikiamas klinikinių bakterijų izoliatų grupavimas, pagrįstas fiziologiniais parametrais, kurie buvo tiriami šiame darbe, rasti nepavyko. Tiesioginis klinikinių izoliatų DVA pompų registravimas įgalina nuodugnesnę klinikinių izoliatų analizę. Taikant šį metodą galima įvertinti bakterijų tam tikrus fiziologinius požymius. Šio metodo taikymas gali padėti ne tik tiriant klinikose izoliuotų padermių panašumus ir skirtumus, bet ir įvertinti, kaip kinta ilgalaikę infekciją sukėlusių bakterijų fiziologija laiko bėgyje.

## IŠVADOS

- Indikatoriniai tetrafenilfosfonio jonai yra tinkami *E. coli* TetA(B) ir *P. aeruginosa* antibiotikus išmetančių pompų tiesioginiams aktyvumo tyrimams;
- TetA(B) selektyvumas TPP<sup>+</sup> yra didesnis nei tetraciklinui;
- RND didšeimės pompų slopiklio PAβN poveikis *P. aeruginosa* ląstelėms priklauso nuo inkubacijos terpės sudėties. PAβN depoliarizuoja *P. aeruginosa* plazminę membraną terpėje be mitybinių priedų;
- Žemesnė nei kambario temperatūra nuslopina pompų veiklą *P. aeruginosa* ląstelėse;
- Esant palankioms augimo sąlygoms, *P. aeruginosa* ląstelės atkuria ląstelės apvalkalėlio barjerą, trukdantį vertinti pompų veiklą;
- Sukurtas metodas gali būti pritaikytas vertinant DVA pompų veiklą *P. aeruginosa* klinikiniuose izoliatuose.

## Paskelbti moksliniai straipsniai:

**Buivydas A**, Daugelavičius R. “Use of tetraphenylphosphonium ions for studies of activity of tetracycline-extruding pumps“; *Biologija* 2006; 2: 24-27.

Daugelavičius R, **Buivydas A**, Senčilo A and Bamford DH. “Assessment of the activity of RND-type multidrug efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa* using tetraphenylphosphonium ions”, [priimta į *International Journal of Antimicrobial Agents*].

## Pranešimai konferencijose

**Buivydas A**. Rapid method for identification and monitoring of multiple drug resistance pumps in bacterial cells. Tarptautinė konferencija „Biodiversity, Molecular Ecology and Toxicology“, Palanga, Lietuva, 2005.

**Buivydas A** ir Daugelavičius R. „Tetrafenilfosfonio jonų panaudojimas tetracikliną išmetančių siurblių aktyvumui įvertinti“. Lietuvos biochemikų Draugijos IX suvažiavimas, Molėtai, Lietuva 2006.

**Buivydas A**, Senčilo A, Stukaitė S, Bamford D ir Daugelavičius R. “Online method for measuring of the activities of antibiotic efflux pumps in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*”. Tarptautinė konferencija “EHRlich II – 2nd World Conference on Magic Bullets”, Niurnbergas, Vokietija 2008.

**Buivydas A**, Senčilo A, Stukaitė S, Bamford D and Daugelavičius R. “Online determination of the activities of antibiotic efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*”. Tarptautinė konferencija “3<sup>rd</sup> FEMS Congress of European Microbiologists”, Geteborgas, Švedija 2009.

## **PADĖKA**

Norėčiau padėkoti visiems prisidėjusiems prie šios disertacijos rengimo:

Savo vadovui Rimantui Daugelavičiui už įdomias ir turingas doktorantūros studijas. Savo moksliniam konsultantui Dennis Bamford už visapusišką pagalbą. Elenutei už rūpestį. Virgai, Martui ir Matui Krupovičiams už tai, kad jie buvo visada šalia. Ingai ir Olegui už konsultacijas. Simonai už „naują kvėpavimą“. Taip pat visiems kartu laboratorijoje dirbusiems ir padėjusiems įgyvendinti užsibrėžtą tikslą. Taip pat norėčiau padėkoti prof. Patrick Plésiat už atsiųstas kontrolines *P. aeruginosa* padermes.

Ypatingai dėkoju savo tėveliam, kurie visada tikėjo ir buvo su manimi.

## SUMMARY

Multidrug resistance (MDR) pumps are one of the major causes of resistance in opportunistic pathogens, such as *Pseudomonas aeruginosa*. Consequently, fast and reliable methods are needed to assay the efficiency of MDR pumps in these bacteria. However, direct efflux pump functions' real-time assessment methods are missing. Such assays would improve the evaluation of MDR efflux pump activities and the search for potential inhibitors.

The assay for monitoring of MDR efflux pumps, employing voltage ( $\Delta\psi$ ) indicator tetraphenylphosphonium ( $\text{TPP}^+$ ) and  $\text{TPP}^+$ -selective electrodes was developed. The assay was applied to evaluate the activity of tetracycline specific efflux pump TetA(B) in *E. coli*. Competitive inhibition of TetA(B) activity was demonstrated. Moreover, it was shown that tetracycline-specific efflux pump TetA(B) has higher selectivity for  $\text{TPP}^+$  than tetracycline.

The designed method can be used for real-time monitoring of MDR efflux pumps in *P. aeruginosa*. The main factors influencing the activities of MDR efflux pumps were addressed: outer membrane permeability,  $\Delta\psi$ , aeration, temperature and cell growth stage. It was also shown that  $\text{TPP}^+$  in combination with the pump inhibitor phenylalanyl-arginyl- $\beta$ -naphthylamide (PA $\beta$ N) can be used to monitor the activity of RND-type efflux pumps in *P. aeruginosa*. By controlling the outer membrane permeability and  $\Delta\psi$ , the real-time measurements of the RND pump activity were performed. It was shown that PA $\beta$ N depolarizes plasma membrane of the cell in the medium without any nutrients. However, under optimal growth conditions *P. aeruginosa* cells are able to recreate the outer membrane barrier covering the activities of MDR efflux pumps. Furthermore, it was shown that the activities of *P. aeruginosa* MDR efflux pumps diminish in lower than room temperature.

Altogether, it was demonstrated that the activity of RND-type efflux pumps in *P. aeruginosa* is highly sensitive to incubation conditions such as the presence of nutrients, incubation medium, the level of aeration and temperature. Thus, it is of great importance to standardize the experimental conditions to obtain quantitative and comparative results.



## ANDRIUS BUIVYDAS

VU Gamtos mokslų fakulteto Biochemijos ir biofizikos katedros doktorantas

### Darbo adresas:

Vilniaus Universitetas, Gamtos mokslų fakultetas  
Biochemijos ir biofizikos katedra  
Čiurlionio 21, LT-03101, Vilnius  
Tel.: (8-5) 239-82-34  
Faksas: (8-5) 239-82-31  
El. paštas: andrius.buivydas@gmail.com

### Namų adresas:

Čiurlionio 27-141  
Vilnius LT-03100  
Tel.: 867700085

Gimimo vieta ir data: 1981 m. birželio 23, Kaunas, Lietuva.

**Išsilavinimas:** 2003 – Biochemijos bakalauras, Chemijos fakultetas, 2005 – Gamtos mokslų, genetikos krypties magistras, Gamtos mokslų fakultetas, Vilniaus Universitetas, Lietuva.

**Stażuotės/stipendijos:** 2004 06 – 2004 08 – tarptautinė ENLINO programa;

2008 02– 2008 08 – stažuotė Helsinkio Universitete pagal Erasmus/Socrates studentų mainų programą;

2008 10– 2009 03 – stažuotė Helsinkio Universiteto Biotechnologijos institute, pagal studentų Erasmus praktikos programą;

**Moksliniai interesai:** membranų biochemija, bioenergetika, bakterijų dauginis atsparumas antibiotikams, antimikrobinės medžiagos.

### Publikacijos:

Buivydas A, Daugelavičius R. „Use of tetraphenylphosphonium ions for studies of activity of tetracycline-extruding pumps“; *Biologija* 2006; 2: 24-27.

Daugelavičius R, Buivydas A, Senčilo A and Bamford DH. “Assessment of the activity of RND-type multidrug efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa* using tetraphenylphosphonium ions”, [priimta į *International Journal of Antimicrobial Agents*]