

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Ana Jurić i Eva Kukolj

UTJECAJ MUTACIJA METIL-TRANSFERAZE NpmA
NA BAKTERIJSKU REZISTENCIJU NA
ANTIBIOTIKE

Zagreb, 2010.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za biokemiju i molekularnu biologiju
Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom
doc. dr. sc. Gordane Maravić Vlahoviček i predan je na natječaj za dodjelu
Rektorove nagrade u akademskoj godini 2009/2010.

SADRŽAJ RADA

1	UVOD	1
1.1	ANTIBIOTICI	1
1.2	MEHANIZAM DJELOVANJA ANTIBIOTIKA.....	1
1.3	GENETIKA OTPORNOSTI	3
1.4	MEHANIZMI OTPORNOSTI	4
1.5	AMINOGLIKOZIDNI ANTIBIOTICI	5
1.6	OTPORNOST NA AMINOGLIKOZIDNE ANTIBIOTIKE	7
1.6.1	Promjena mjesta vezanja aminoglikozidnih antibiotika putem ribosomskih metil-transferaza.....	9
1.7	METIL-TRANSFERAZA NpmA.....	14
2	OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA	16
3	MATERIJAL I METODE	18
3.1	MATERIJAL.....	18
3.1.1	Standardne kemikalije	18
3.1.2	Pribor.....	19
3.1.3	Boje.....	19
3.1.4	Hranjivi mediji.....	19
3.1.5	Enzimi i ostali proteini.....	20
3.1.6	Specifične komercijalne smjese analitičkih reagensija- kompleti.....	20
3.1.7	Kromatografski materijal.....	20
3.2	BAKTERIJSKI SOJEVI I PLAZMIDI	21
3.3	HRANJIVE PODLOGE I UZGOJ BAKTERIJA.....	24
3.3.1	Noćna kultura	24
3.3.2	Glicerolna kultura	25
3.3.3	Rast bakterija na tekućoj hranjivoj podlozi.....	25
3.3.4	Rast bakterija na krutoj hranjivoj podlozi.....	26
3.4	TRANSFORMACIJA BAKTERIJSKIH STANICA EKSPRESIJSKOG SOJA <i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS EKSPRESIJSKIM VEKTOROM pET-25b(+)- <i>npmA</i> -His	26
3.4.1	Priprema kompetentnih stanica	27
3.4.2	Elektroporacija.....	28
3.5	EKSPRESIJA PROTEINA	28
3.5.1	Indukcija ekspresije proteina.....	28
3.5.2	Priprema uzorka za pročišćavanje na koloni	29
3.6	PROČIŠĆAVANJE PROTEINA	29

3.6.1	Afinitetna kromatografija na koloni Ni-NTA Agarose	30
3.6.2	Dijaliza	31
3.6.3	Određivanje koncentracije proteina	32
3.7	ELEKTROFOREZA U DENATURIRAJUĆEM POLIAKRILAMIDNOM GELU (SDS-PAGE)	33
3.8	METILACIJSKI TEST <i>IN VITRO</i>	35
3.8.1	Priprema reakcijske smjese	35
3.8.2	Postupak na mikrotitarskoj pločici.....	35
3.9	ODREĐIVANJE MINIMALNE INHIBITORNE KONCENTRACIJE KANAMICINA.....	37
4	REZULTATI.....	39
4.1	EKSPRESIJA METIL-TRANSFERAZE NpmA.....	40
4.2	PROČIŠĆAVANJE METIL-TRANSFERAZE NpmA.....	40
4.3	METILACIJSKI TEST <i>IN VITRO</i>	43
4.4	ODREĐIVANJE MINIMALNE INHIBITORNE KONCENTRACIJE KANAMICINA.....	44
5	RASPRAVA.....	47
6	ZAKLJUČAK.....	53
7	ZAHVALA.....	55
8	LITERATURA.....	56
9	SAŽETAK.....	61
10	SUMMARY.....	63

1 UVOD

1.1 ANTIBIOTICI

Antibiotici su otkriveni kasnih tridesetih i četrdesetih godina prošlog stoljeća kao netoksična kemoterapeutska sredstva koja selektivno i uspješno djeluju protiv bakterija te ih danas ubrajamo među vrlo djelotvorne i često upotrebljavane lijekove. No, bakterije imaju izvrsno razvijene mehanizme genetičke prilagodbe i redovito razvijaju rezistenciju kao posljedicu uporabe antibiotika.

1.2 MEHANIZAM DJELOVANJA ANTIBIOTIKA

Različita struktura antibiotika, bilo sintetičkih ili prirodno dobivenih, uvjetuje i različita ciljna mjesta, odnosno različite mehanizme djelovanja (Walsh, 2003) (Slika 1.2.1). Prepoznato je pet osnovnih mehanizama djelovanja antibiotika na bakterije:

- Inhibicija sinteze stanične stijenke
- Inhibicija sinteze proteina
- Povećanje propusnosti stanične membrane
- Inhibicija sinteze nukleinskih kiselina
- Blokiranje metaboličkih puteva

a) Inhibicija sinteze stanične stijenke

Stanična stijenka održava oblik i funkciju bakterijske stanice unutar koje vlada visok osmotski tlak. Izgrađena je od kompleksnih polimera peptidoglikana (N-acetilmuraminske kiseline, MurNAc i N-acetilglukozamina, GlcNAc) koji su međusobno povezani peptidnim lancima. Budući da se odvija na nekoliko razina, sinteza stanične stijenke može se zaustaviti specifičnim djelovanjem pojedinih antibiotika.

b) Inhibicija sinteze proteina

Sinteza proteina odvija se na ribosomima bakterijskih stanica u tri osnovne faze: inicijacija, elongacija, terminacija. Funkcionalna jedinica sinteze bakterijskih proteina je ribosom 70S koji se sastoji od dviju podjedinica: podjedinice 30S (sadrži 21 protein i 16S RNA) i podjedinice 50S (34 proteina i 23S i 5S RNA). Stanice sisavaca imaju ribosome 80S koji ne podliježu djelovanju većine antibiotika u kliničkoj uporabi te se upravo na toj bitnoj razlici temelji selektivna toksičnost antibiotika na bakterije, ali ne i na čovjeka. Mnogi antibiotici inhibiraju pojedine korake u sintezi proteina, primjerice stvaranje peptidne veze, translokaciju ili kretanje ribosoma uzduž mRNA.

c) Povećanje propusnosti stanične membrane

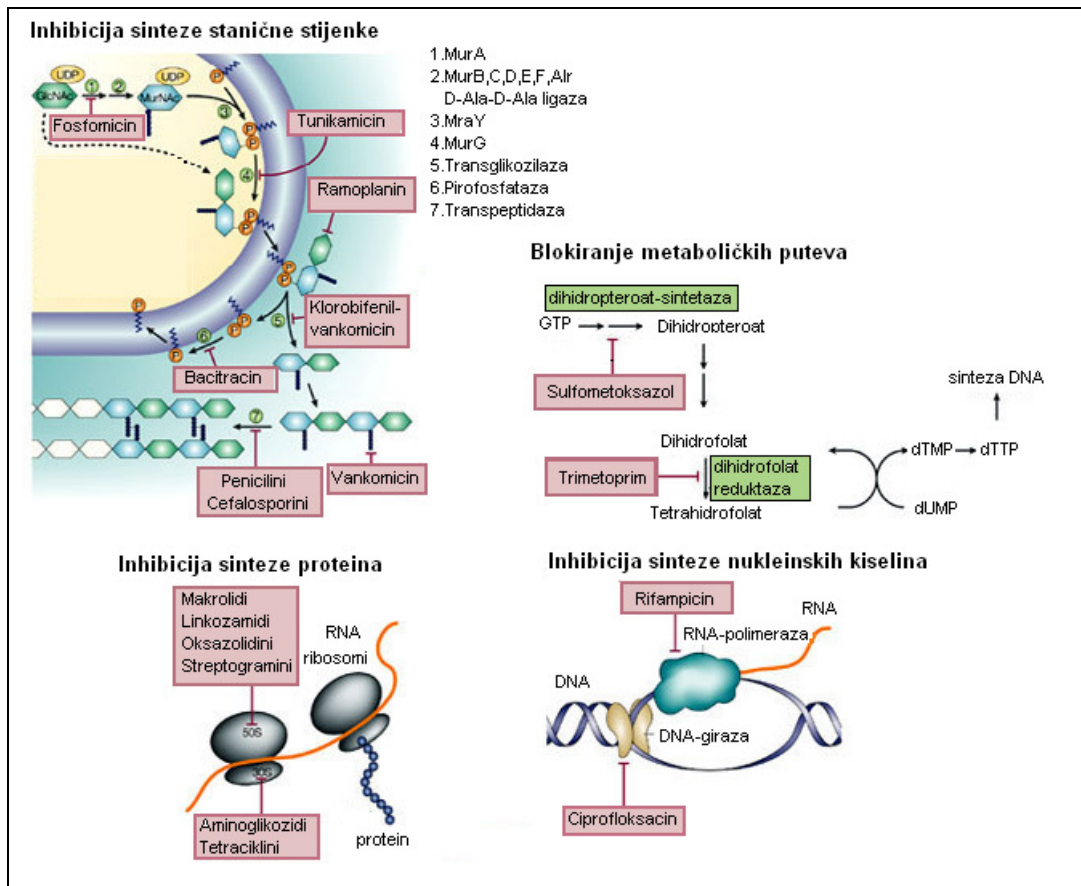
Stanična membrana svih živih stanica selektivno je propusna. Neki antibiotici i antifungici specifično remete propusnost stanične membrane mikroba čija je posljedica gubitak makromolekula i iona te oštećenje ili smrt stanica.

d) Inhibicija sinteze nukleinskih kiselina

Neki enzimi koji sudjeluju u replikaciji i transkripciji DNA se potpuno razlikuju po mjestu djelovanja kod prokariota i eukariota, pa se na toj razlici temelji djelovanje inhibitora sinteze RNA i DNA.

e) Blokiranje metaboličkih puteva

Folna kiselina je nužan spoj za sintezu nukleinskih kiselina u prokariota i eukariota. Mikroorganizmi za razliku od čovjeka sintetiziraju vlastitu folnu kiselinu unutar bakterijske stanice iz para-aminobenzojeve kiseline (PABA) i ostalih metabolita uz pomoć enzima dihidropteroat-sintetaze, dihidrofolat-sintetaze i dihidrofolat-reduktaze (DHFR). Antibiotici djeluju neizravno kao strukturni analozi PABA-e ili na navedene enzime (Bulat i sur., 2001).



Slika 1.2.1. Ciljna mjesta i mehanizmi djelovanja antibiotika na bakterijsku stanicu (preuzeto i prilagođeno s <http://www.nature.com>)

1.3 GENETIKA OTPORNOSTI

Mnoge bakterije uz bakterijski kromosom sadrže dodatne kružne molekule DNA zvane **plazmidi**, koje se repliciraju neovisno o bakterijskom kromosomu. Plazmidi sadrže gene za neka svojstva koja bakterijama znatno pomažu u nepovoljnim uvjetima, uključujući i rezistenciju na antibiotike. Neotporna bakterijska stanica može od rezistentne bakterije konjugacijom primiti plazmid s genima za rezistenciju te u vrlo kratkom vremenu postati otporna na pojedini antibiotik. Uz plazmide, nova svojstva (uključujući i rezistenciju na antibiotike) bakterijskoj stanici mogu dati i **bakteriofagi** jer se njihovi geni mogu eksprimirati zajedno s bakterijskim. Bakteriofagi su virusi koji inficiraju bakterije, a mogu biti virulentni (uništavaju bakterijsku stanicu) i lizogeni (liziraju bakterijsku stanicu i/ili se ugrađuju u bakterijski kromosom kao profagi) .

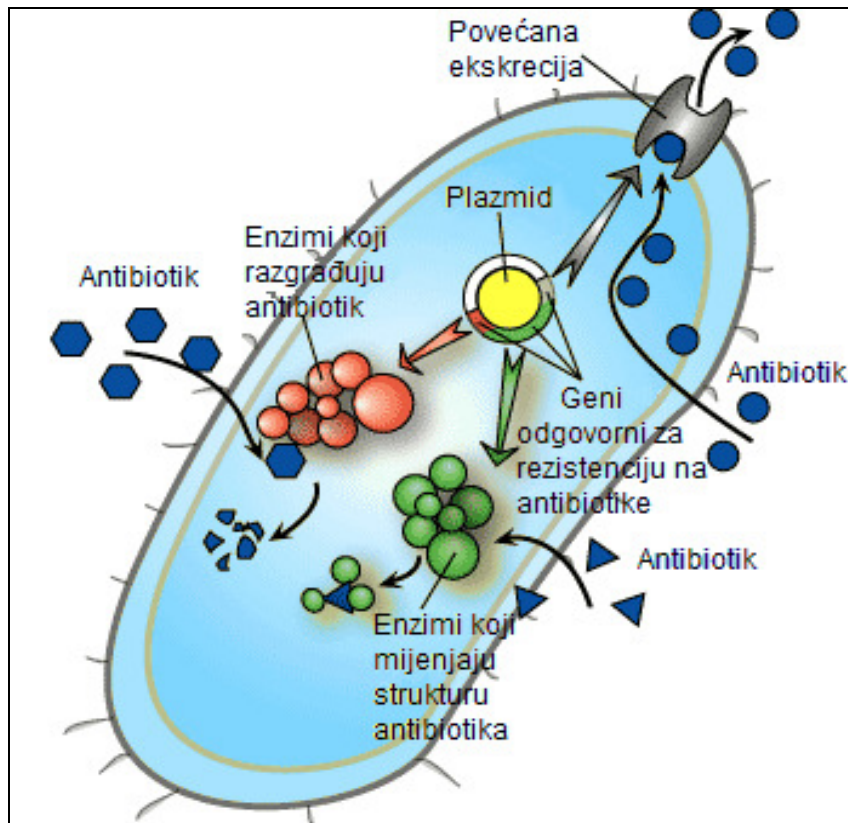
Geni za rezistenciju na antibiotike mogu se širiti i putem transpozona, odnosno integrona. **Transpozoni** su odsječci DNA koji se nehomolognom rekombinacijom premještaju s jednog plazmida ili kromosoma na drugi. Najčešće sadrže pojedinačne gene ili skupinu gena za rezistenciju međusobno povezanih specifičnim odsječcima DNA koji sadrže mjesta prepoznavanja za enzim transpozazu. Transpozaza katalizira selidbu transpozona s jednog plazmida ili kromosoma na drugi.

Slični transpozonomima su **integroni**, a budući da sadrže promotore transkripcije koji potječu iz nesrodnih organizama djeluju i kao ekspresijski vektori. Iako integronima nedostaju funkcije neophodne za transpoziciju, oni sadrže funkcije za mjesno-specifičnu integraciju uz pomoć enzima integraze (Dale i Park, 2004).

1.4 MEHANIZMI OTPORNOSTI

Zbog učestalog izlaganja antibioticima, bakterije moraju stvoriti mehanizme za neutralizaciju učinka lijeka te tako vrlo brzo postaju rezistentne. Razlikujemo četiri osnovna mehanizma otpornosti (Slika 1.4.1), koji se mogu međusobno preklapati:

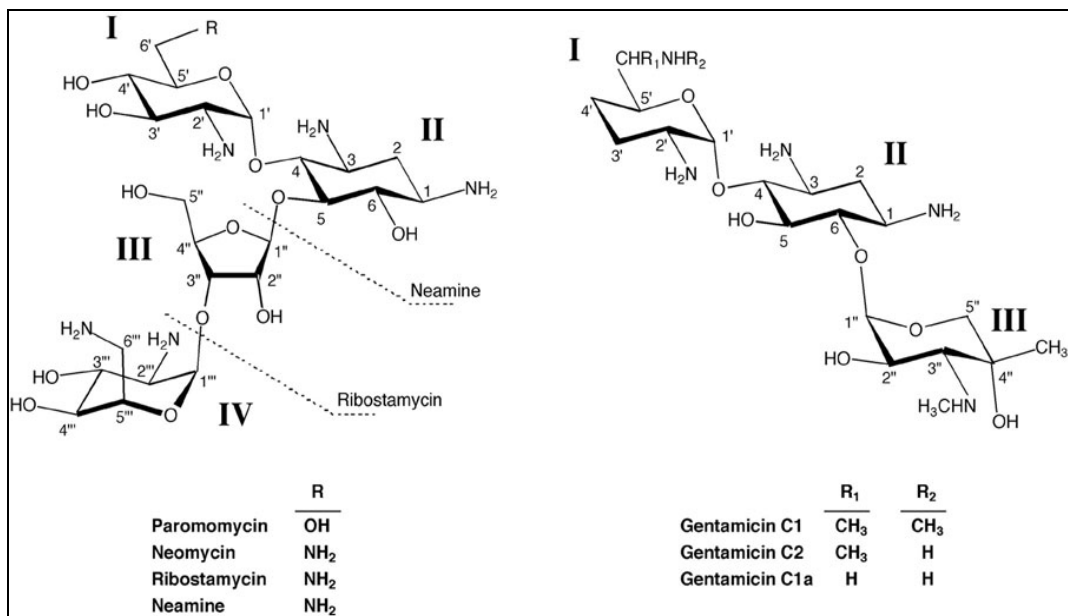
- **Stvaranje enzima koji razgrađuju molekulu antibiotika (enzimska inaktivacija lijeka).** Primjer je enzim β -laktamaza koja hidrolizira četveročlani β -laktamski prsten, aktivni dio molekule penicilina i cefalosporina, te navedeni lijekovi gube svoje djelovanje.
- **Promjene u staničnoj stijenci ili u sustavu stanične membrane,** čime je spriječeno prodiranje lijeka u bakterijsku stanicu.
- **Promjene u mjestu vezivanja lijeka ili nestanak tih veznih mjesta.** Većina lijekova djeluje na specifična mjesta kao što je protein, RNA, DNA ili membranska struktura pa samo male promjene tih mjesta mogu zaštititi bakteriju od štetnog djelovanja lijeka.
- **Promjene osnovnih metaboličkih puteva** (Talaro i Talaro, 2002).



Slika 1.4.1. Mehanizmi rezistencije bakterija na antibiotike (preuzeto i prilagođeno s <http://textbookofbacteriology.net>)

1.5 AMINOGLIKOZIDNI ANTIBIOTICI

Aminoglikozidi su skupina antibiotika složene kemijske strukture, međusobno slični po antimikrobnom djelovanju, farmakokinetičkim svojstvima i toksičnosti. Aminoglikozidi su hidrofilni, polikationski ugljikohidrati koji sadrže amino skupinu. Imaju tri- ili tetrasaharidnu strukturu i sastoje se od streptamina ili nekog streptaminskog derivata (uglavnom 2-deoksistreptamin) na koji su vezana 3 ili 4 aminošećerna ostatka. Većina aminoglikozida su prirodni produkti metabolizma aktinomiceta ili njihovi derivati. Glavni su lijekovi gentamicin, streptomycin, amikacin, tobramicin, netilmicin i neomicin (Rang i sur., 2006) (Slika 1.5.1). Antibakterijsko djelovanje aminoglikozida uključuje dva vjerojatno sinergistička djelovanja. Prvo, pozitivno nabijen aminoglikozid veže se za negativno nabijena mjesta na vanjskoj membrani bakterije, mijenjajući integritet membrane.



Slika 1.5.1. Neki od aminoglikozidnih antibiotika s 2-deoksistreptaminskom jezgrom (prsten II) (preuzeto i prilagođeno s <http://www.nature.com>)

Drugo, aminoglikozidi se ireverzibilno vežu na različita mjesta male ribosomske podjedinice, gdje ometaju inicijaciju sinteze proteina i uzrokuju pogreške u translaciji mRNA u proteine, što dovodi do nepovratnog oštećenja bakterije. Također se vežu i na veliku ribosomsku podjedinicu, iako važnost ovog vezanja nije utvrđena.

Primarno mjesto djelovanja aminoglikozida u stanici je ribosomska podjedinica 30S, koja sadrži 21 protein i molekulu 16S rRNA. Aminoglikozidi se vežu za ribosomsko A-mjesto i time dolazi do konformacijskih promjena u dijelu ključnom za nadgledanje interakcije kodon:antikodon. Antibiotik stoga povećava vjerojatnost ugradnje pogrešne aminokiseline te tako dolazi do sinteze pogrešnog proteina i smrti bakterijske stanice (Carter i sur., 2006). Koliko će aminoglikozidi prodrijeti kroz staničnu stijenku bakterije dijelom ovisi o prisutnosti kisika prilikom aktivnog transporta na poliaminskom nosaču, pa stoga slabo djeluju protiv anaerobnih mikroorganizama. Kloramfenikol onemogućava taj sustav aktivnog transporta. Djelovanje aminoglikozida je baktericidno, a pojačava se djelovanjem lijekova koji ometaju sintezu stanične stijenke.

Aminoglikozidi imaju i postantibiotički učinak jer nastavljaju inhibirati rast bakterija i nakon uklanjanja antibiotika iz bakterijskog mikrokoliša (Rang i sur., 2006). Klinički relevantno je djelovanje aminoglikozida na Gram-negativne bacile, stafilokoke i vrste roda *Pseudomonas*. Streptokoki i anaerobne bakterije su uglavnom otporne na aminoglikozide. Najšira im je primjena protiv Gram-negativnih crijevnih organizama i sepse.

Gentamicin je najčešće upotrebljavani aminoglikozid, ali za liječenje infekcija uzrokovanih bakterijama roda *Pseudomonas* iz ove skupine lijekova najčešće se primjenjuje tobramicin. Amikacin ima najširi antimikrobni spektar i zajedno s netilmicinom može biti učinkovit kod infekcija organizmima otpornim na gentamicin i tobramicin. Anaerobne bakterije ne akumuliraju u sebi aminoglikozide te stoga na njih aminoglikozidi ne djeluju (Craig i sur., 2000, Rang i sur., 2006).

1.6 OTPORNOST NA AMINOGLIKOZIDNE ANTIBIOTIKE

Rezistencija na aminoglikozide najčešće je rezultat ometanja transportnog mehanizma antibiotika, zbog modifikacije antibiotika jednim ili više serijskih enzima koje proizvode rezistentne bakterije. Ti enzimi su često kodirani plazmidnim genima, ali do porasta njihove količine dolazi i u prisutnosti transpozona i integrona. Ovi enzimi su klasificirani prema tipu i prema mjestu modifikacije molekule aminoglikozida. Do sada je identificirano više desetaka ovakvih enzima i njihovih inačica, koji su podijeljeni u tri glavne grupe:

- **AAC** - aminoglikozidne acetil-transferaze,
- **AAD** - aminoglikozidne adenilaze,
- **APH** - aminoglikozidne fosfotransferaze.

Identificirano je najmanje 16 različitih tipova acetil-transferaza, koje kataliziraju prijenos acetata iz acetil-koenzima A na amino-skupinu aminoglikozida. Ovi enzimi modificiraju samo aminoglikozide koji sadrže deoksistreptamin, tako da nemaju učinka na streptomycin ili spektinomycin.

Aminoglikozidne adenilaze su nukleotidne transferaze koje koriste ATP ili druge nukleotide kao supstrate, koje zatim vežu na izložene hidroksilne skupine. Aminoglikozidne fosfotransferaze također modificiraju hidroksilne skupine vezanjem molekule fosfata. Ciljno mjesto ovih enzima je prsten I (Craig i sur., 2000, Greenwood, 1995). Složenost rezistencije naglašena je istovremenom proizvodnjom više različitih enzima. Na taj način u kliničkim sojevima nastaju različiti tipovi križne rezistencije (Tablica 1.6.1)

Tablica 1.6.1. Primjeri nekih neuobičajenih enzima koji modificiraju aminoglikozide. Amk-amikacin, Gen-gentamicin, Kan-kanamicin, Neo-neomicin, Spc-spektinomycin, Str-streptomycin, Tob-tobramicin (preuzeto iz Greenwood, 1995)

ENZIM	SUPSTRAT	BAKTERIJSKA DISTRIBUCIJA	
		Gram-pozitivne	Gram-negativne
Acetil-transferaze			
AAC(3)-I	Gen	-	+
AAC(3)-II	Gen, Tob, Net	-	+
AAC(2')	Gen, Tob	-	+
AAC(6')-I	Tob, Amk, Net	+	+
AAC(6')-II	Gen, Tob, Net	-	+
Nukleotid-transferaze			
AAD(6)	Str	+	-
AAD(4')(4'')	Tob, Amk	+	-
AAD(2'')	Gen, Tob	-	+
AAD(3'')(9)	Str, Spc	-	+
AAD(9)	Spc	+	-
Fosfotransferaze			
APH(6)	Str	-	+
APH(3')	Neo, Kan	+	+
APH(2'')	Gen	+	-
APH(3'')	Str	+	+

Drugi mehanizam rezistencije na aminoglikozide posljedica je smanjenja permeabilnosti bakterijske stanice zbog izmjena u proteinima vanjske membrane, što dovodi do smanjenog unosa antibiotika u stanicu (Greenwood, 1995). Ovaj mehanizam rezistencije uočen je kod streptokoka, stafilokoka i roda *Pseudomonas*. Otpornost zbog neprodiranja lijeka može se donekle riješiti istodobnom uporabom penicilina i/ili vankomicina (Rang i sur., 2006).

Treći mehanizam rezistencije na aminoglikozide je njihova povećana ekskrecija putem specifičnih crpki, a četvrti mehanizam je modifikacija ciljnog mjesta vezanja antibiotika (16S rRNA) djelovanjem ribosomskih metil-transferaza (Kotra i sur., 2000, Poole, 2005, Rozenski i sur., 1999).

1.6.1 Promjena mjesta vezanja aminoglikozidnih antibiotika putem ribosomskih metil-transferaza

Metilacija je najjednostavnija i najučestalija modifikacija RNA te ima važnu ulogu u sastavljanju, sazrijevanju i regulaciji translacijskog aparata. Kod prokariota najučestalija modifikacija RNA je metilacija baza (Bujnicki i Rychlewski, 2000). Sudeći prema karti svih RNA modifikacija u ribosomu, razdioba metiliranih nukleozida nije nasumična, već nagomilana u evolucijski očuvanim i funkcionalno važnim regijama ribosoma. To su peptidil-transferaza, mjesta A, E i P, izlazni tunel i mjesta interakcije između ribosomskih podjedinica. Upravo stoga je predloženo da posebna metilacijska mjesta mogu utjecati na vezanje rRNA, na međudjelovanje između male i velike podjedinice ribosoma i na sve korake složenog procesa biosinteze proteina (Decatur i Fournier, 2002). Uza sve to metilacija rRNA može i promijeniti podložnost ribosoma antibioticima, sprječavajući tako njihov pogubni utjecaj na život bakterijske stanice (Garrett i sur., 2000).

Promjene na ciljnim mjestima djelovanja antibiotika dovode do strukturnih promjena koje onemogućavaju njihovo djelovanje. Dvije su vrste takvih promjena u prirodnim proizvođačima antibiotika:

- gubitak nekih metilacija koje se odvijaju na bakterijskom ribosomu u normalnim uvjetima rasta radi poboljšanja ribosomske funkcije

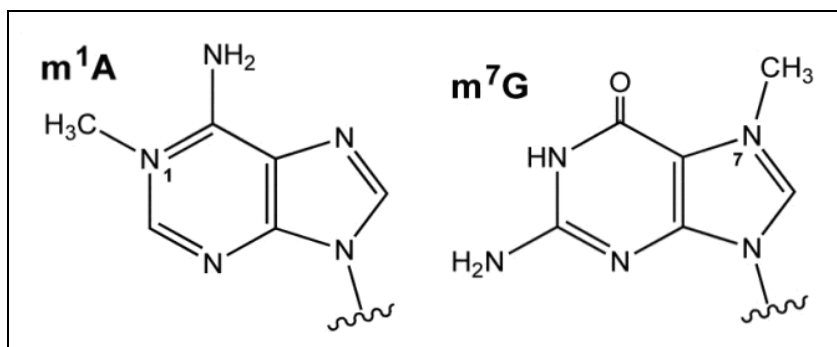
- nastanak novih metilacija putem ribosomskih metil-transferaza (Felnagle i sur., 2007, Helser i sur., 1972, Okamoto i sur., 2007, Sparling, 1970)

Metil-transferaze koje pružaju otpornost na aminoglikozidne antibiotike otkrivene su u prirodnim proizvođačima iz rodova *Streptomyces* i *Micromonospora*. Do danas su otkrivena dva mjesta djelovanja takvih metil-transferaza: N7 gvanina na položaju 1405 i N1 adenina na položaju 1408 (redosljed nukleotida prema 16S rRNA iz bakterije *Escherichia coli*). Metil-transferaze koje metiliraju mjesto G1405 pripadaju porodici Arm, nazvanoj prema kratici od *eng.* Aminoglycoside Resistance Methyltransferase (Maravić Vlahoviček i sur., 2008).

Metil-transferaze iz druge porodice ovih enzima, odnosno metil-transferaze Kam, djeluju na mjesto A1408. Metil-transferaza KamA izolirana je iz *Streptomyces tenjimariensis* (Cundliffe, 1989, Demydchuk i sur., 1998, Holmes i sur., 1991, Skeggs i sur., 1985, Skeggs i sur., 1987). Iz detaljnog prikaza vezanja aminoglikozida čija je osnova 2-deoksistreptaminska jezgra na ribosomsku podjedinicu 30S utvrđeno je kako navedene metilacije dovode do ometanja vezanja aminoglikozida. 2-deoksistreptaminska jezgra može biti disupstituirana na položajima 4 i 6 ili 4 i 5, te može biti monosupstituirana na položaju 4.

4,6-disupstituirani aminoglikozidi vezanjem za ribosomsko A-mjesto dolaze u izravan kontakt s G1405, te metilacija N7 na tom nukleotidu onemogućava vezanje aminoglikozida takve strukture, ali nema utjecaja na 4,5-disupstituirane aminoglikozide koji ne ulaze u interakciju s G1405. Metilacija m⁷G1405 (Slika 1.6.1, Slika 1.6.2) pruža visoku razinu rezistencije na kanamicinsku i gentamicinsku skupinu antibiotika (Cundliffe, 1989, Skeggs i sur., 1985, Thompson i sur., 1985). Supstituent na položaju 4 (prsten I) 2-deoksistreptaminske jezgre ulazi u interakciju s A1408, dakle u interakciju s tim nukleotidom ulaze i monosupstituirani i disupstituirani aminoglikozidi. Metilirani nukleotid m¹A1408 je pozitivno nabijen pri neutralnom pH stoga je vezanje aminoglikozida spriječeno ne samo konformacijskom promjenom već i elektrostatskim odbijanjem naboja.

Metilacija m¹A1408 pruža visoku razinu rezistencije na kanamicinsku skupinu antibiotika i apramicin. Također, iako je utvrđeno da se paromomicin veže za A1408 s dvije vodikove veze, metilacija ovog nukleotida ne dovodi do značajne rezistencije na ovaj antibiotik, čemu su vjerojatno razlog dodatne interakcije koje postiže s veznim mjestom i koje kompenziraju takvu modifikaciju (Carter i sur., 2000, Cundliffe, 1989)

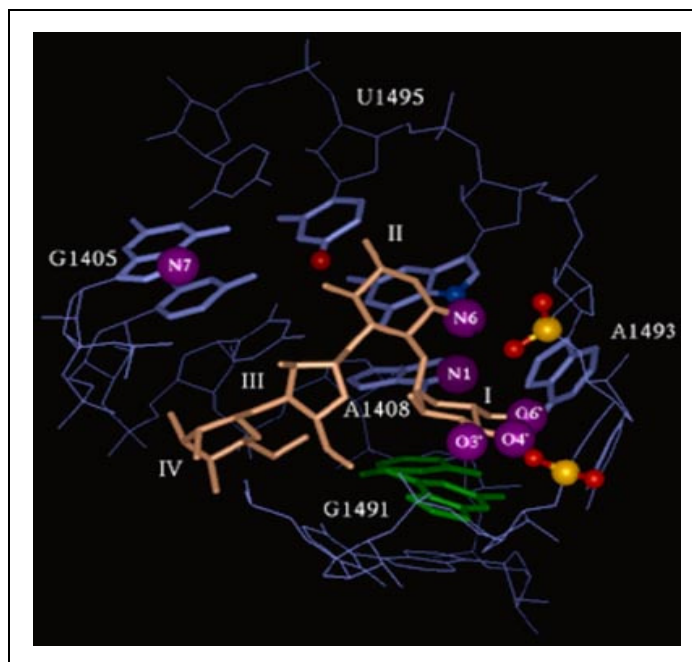


Slika 1.6.1. Metilirani nukleotidi: m⁷G1405 i m¹A1408

Do nedavno, sve pronađene 16S rRNA metil-transferaze u patogenim bakterijama bile su iz porodice Arm te modificirale nukleotid G1405 (Doi i Arakawa, 2007, Yamane i sur., 2005). Geni za te enzime nalaze se u transpozonomima i plazmidima, tako da predstavljaju mobilne genetičke elemente koji se horizontalno prenose među bakterijama (Garrett i sur., 2000, Tablica 1.6.2).

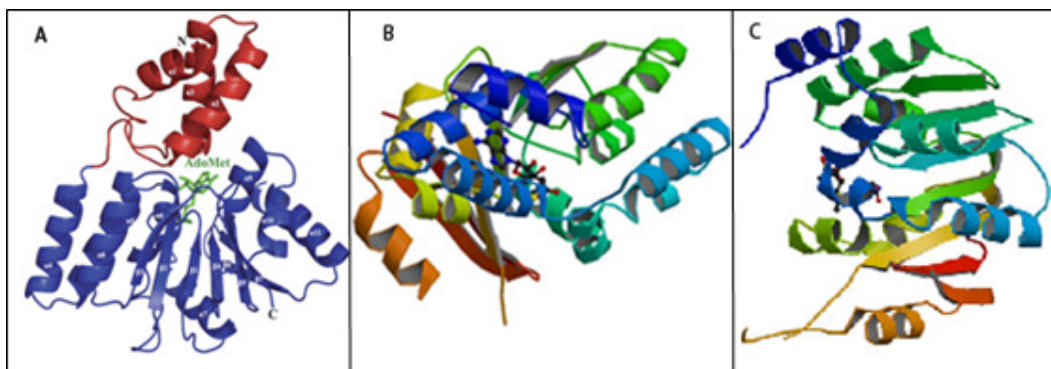
Prva izolirana takva metil-transferaza bila je ArmA iz *Citrobacter freundii*, a kasnije su izolirane i RmtA, RmtB, RmtC i RmtD. RmtA i RmtB, izolirane iz *Pseudomonas aeruginosa* i *Serratia marcescens* dovode do visoke razine rezistencije na skoro sve klinički korisne amininoglikozide, osim streptomocina (Doi i sur., 2004, Yokoyama i sur., 2003).

Moguće je da su neke od 16S rRNA metil-transferaza u patogenim mikroorganizmima nastale prijenosom gena pomoću pokretnih genetičkih elemenata iz prirodnih proizvođača antibiotika, ali za to ne postoje dovoljno jasni dokazi.



Slika 1.6.2. Prostorni prikaz vezanja paromomicina za ribosomsko A-mjesto. Mjesta na kojima se događaju kemijske modifikacije čija je posljedica razvoj rezistencije na antibiotike (na paromomicinu ili na rRNA) označena su ljubičasto. Metilacija N7 na G1405 dovodi do rezistencije na aminoglikozide koji ulaze u izravan kontakt s tim nukleotidom (preuzeto s puglisi.stanford.edu).

Nije poznata ni jedna funkcija ovih enzima u odsutnosti antibiotika te oni tada obično nisu ni eksprimirani. Svoje djelovanje metil-transferaze Arm i Kam izražavaju tek nakon stvaranja podjedinice 30S, dakle jedini supstrat koji se može uspješno metilirati je zrela ribosomska podjedinica 30S (Kojic i sur., 1992, Skeggs i sur., 1985, Thomson i sur., 1985, Xu i sur., 2008). Premda je nedavno riješena prostorna struktura triju pripadnika porodice Arm (Slika 1.6.3., Schmitt i sur., 2009, Husain i sur., 2010), potrebno je detaljnije ispitivanje strukture ovih enzima u kompleksu sa supstratom i mehanizma vezanja za 30S podjedinicu da bi se točno utvrdilo kakva je uloga RNA i proteina podjedinice 30S u ovom procesu. Nedavno je pronađena metil-transferaza NpmA, izolirana iz soja *E. coli* ARS3. To je prva 16S rRNA metil-transferaza nađena u kliničkom soju koja djeluje na nukleotid A1408 i posredovana je plazmidom. Pruža rezistenciju na široki spektar aminoglikozida (Wachino i sur., 2007).



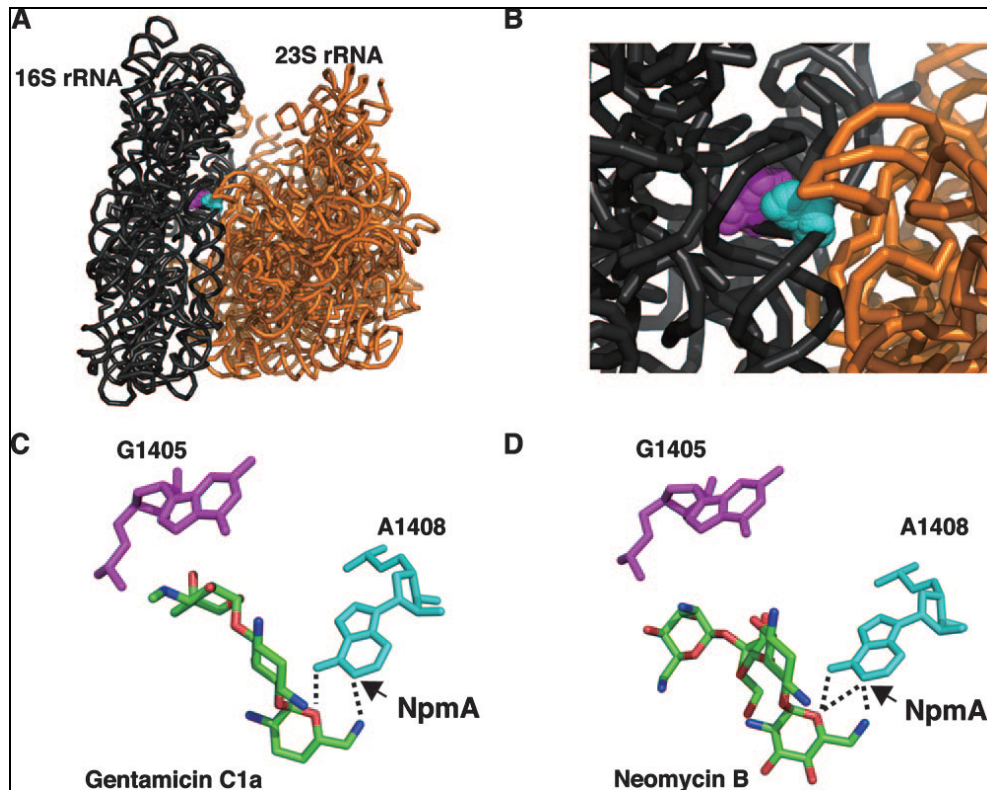
Slika 1.6.3. Prostorna struktura različitih enzima iz porodice Arm u kompleksu s kofaktorom S-adenozil-metioninom: (A) Sgm, (B) ArmA, (C) RmtB.

Tablica 1.6.3 Sažeti prikaz gena koji kodiraju 16S rRNA metil-transferaze povezanih s rezistencijom na antibiotike. ^aRezistencija nastaje odsutnošću (-) ili pojavom (+) metilacije; ^bH - gen kodira metil-transferazu prisutnu u bakteriji pod normalnim uvjetima rasta (eng. house-keeping methyltransferase); D - gen se nalazi u prirodnom proizvođaču antibiotika; P - gen je pronađen u patogenim bakterijama; ^cTlyA također metilira nukleotid C1920 u uzvojnici 69 na i 23S ribosomske RNA unutar podjedinice 50S.

Gen koji kodira metil-transferazu	Metilacija ^a			Rezistentni fenotip	Karakteristike gena ^b
	Mjesto	Pozicija			
<i>rsmG</i>	G527	N7	-	streptomycin	H, P
<i>tlyA</i> ^c	C1409	2'-O-riboza	-	kapreomicin, viomicin	P
<i>ksgA</i>	A1519	N6,N6	-	kasugamicin	H
<i>pct</i>	A964	N1	+	pactamicin	D
<i>kgmB</i>	G1405	N7	+	kanamicin, gentamicin	D
<i>armA</i>	G1405	N7	+	kanamicin, gentamicin	P
<i>kamA</i>	A1408	N1	+	kanamicin, neomicin, apramicin	D
<i>npmA</i>	A1408	N1	+	kanamicin, neomicin, apramicin	P
<i>cmnU</i>	?	?	+	kapreomicin, kanamicin (?)	P

1.7 METIL-TRANSFERAZA NpmA

Metil-transferaza NpmA prva je otkrivena 16S rRNA metil-transferaza u kliničkom patogenom soju koja metilira N¹A1408 i čiji se gen nalazi na plazmidu. Molekulska masa ovog enzima iznosi 25,6 kDa. Gen *npmA* izoliran je iz soja *Escherichia coli* ARS3. Metilacija ovim enzimom dovodi do rezistencije na strukturno različite antibiotike: na 4,6-disupstituirane-2-deoksistreptamine kao što su amikacin i gentamicin, zatim na 4,5-disupstituirane-2-deoksistreptamine uključujući neomicin i ribostamicin, te na 4-monosupstituirane-2-deoksistreptamine kao što je apramicin.



Slika 1.7.1. Pretpostavljena interakcija između aminoglikozida i 16S rRNA na ribosomskoj podjedinici 30S. (A) Kompleksna struktura 16S rRNA (crno) i 23S rRNA (narančasto) u 70S ribosomu *E. coli*. Plavo je istaknut A1408, a ljubičasto G1405. (B) Dio povećane slike A. (C i D) Prostorni model kompleksa između aminoglikozida (C- gentamicin C1a, D- neomicin B) i nukleotida G1405 i A1408 na ribosomskom mjestu A. Isprekidane crte prikazuju pretpostavljene vodikove veze. Strelicom je prikazan dio prstena (N¹) kao ciljno mjesto djelovanja enzima NpmA (Wachino i sur., 2007).

S druge strane, metil-transferaza NpmA ne pruža rezistenciju prema streptomycinu i spektinomycinu koji se ne vežu za A-mjesto na ribosomu. Dakle, ovaj enzim dovodi do rezistencije naspram raznih antibiotika koji se vežu za ribosomsko A-mjesto.

Utvrđeno je da kao i ostale 16S rRNA metil-transferaze NpmA uspješno metilira ribosomsku podjedinicu 30S samo kada je ona cjelovita, dok ribosomska podjedinica 50S ili gola 16S rRNA nisu dobri supstrati. Usporedbom izvedenih aminokiselinskih sljedova dokazano je <31% sličnosti sa 16S rRNA metil-transferazama KamA, KamB, KamB2, KamB3, KamC, i Amr koje se nalaze u prirodnim proizvođačima antibiotika i kodirane su genima na kromosomu (Kotra i sur., 2000, Yamane i sur., 2004).

G+C sadržaj gena *npmA* iznosi 34%, dok kod Kam metil-transferaza iznosi 70%, što ostavlja otvorenu mogućnost da su se, iako imaju istu funkciju, ovi enzimi razvili odvojeno (Wachino i sur., 2007).

2 OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

Svrha ovog rada je nastaviti u pokušajima da se spriječi bakterijska otpornost na aminoglikozidne antibiotike, koja se temelji na metilaciji rRNA unutar 30S podjedinice bakterijskog ribosoma putem enzima metil-transferaze NpmA. Cilj rada je odrediti kako mutacije evolucijski očuvanih aminokiselina (D30A, D55A, P106A, W107A, W177A i W197A) utječu na aktivnost metil-transferaze NpmA i bakterijsku rezistenciju na aminoglikozidne antibiotike. Divlji tip i mutirane varijante gena za metil-transferazu NpmA prethodno su u laboratoriju klonirani u ekspresijski vektor pET-25b(+) za dobivanje dovoljne količine pripadnih proteina. Pročišćavanjem bakterijskog lizata dobit će se čisti mutirani proteini za ispitivanje enzimske aktivnosti. Metilacijskim testom utvrdit će se aktivnost mutanata *in vitro*, dok će se u pokusima *in vivo* ispitati sposobnost ostvarivanja rezistencije u stanicama *E. coli*, koja je prirodno neotporna na kanamicin. Dobiveni rezultati proširit će spoznaje o ulozi pojedinih aminokiselina i mehanizmu djelovanja metil-transferaze NpmA, te na taj način poduprijeti napore za pronalaskom selektivnog inhibitora koji bi onemogućio bakterijsku rezistenciju na aminoglikozidne antibiotike.

Pojedinačni ciljevi za ostvarenje krajnjeg cilja istraživanja jesu:

- izrada kompetentnih stanica BL21(DE3)
- transformacija bakterijskih stanica BL21(DE3) vektorom pET-25b(+)-*npmA*-His s divljim tipom te vektorima pET-25b(+) s mutiranim varijantama enzima NpmA
- indukcija ekspresije za dobivanje veće količine topljivog proteina u soju *E. coli* BL21(DE3)pLysS/ pET-25b(+)-*npmA*-His
- izrada bakterijskog lizata
- pročišćavanje metil-transferaze NpmA divljeg tipa i mutiranih varijanti
- ispitivanje aktivnosti divljeg tipa enzima i mutiranih varijanti metilacijskim testom *in vitro*

- određivanje minimalne inhibitorne koncentracije kanamicina u stanicama *E. coli* koje ekspimiraju divlji tip i mutirane varijante metil-transferaze NpmA

3 MATERIJAL I METODE

3.1 MATERIJAL

3.1.1 Standardne kemikalije

akrilamid/bisakrilamid mix (*Sigma*)

amonijev klorid, NH_4Cl (*Sigma*)

amonijev persulfat, APS (*Sigma*)

ampicilin (*Sigma*)

ekstrakt kvasca (*Difco*)

etanol (*Sigma*)

etilendiamin tetraoctena kiselina, EDTA (*Sigma*)

glicerol (*Sigma*)

glicin (*Sigma*)

glukoza (*Sigma*)

imidazol (*USB*)

IPTG, izopropil- β -D-tiogalaktozid (*Fermentas*)

izopropanol (*Sigma*)

kalijev klorid, KCl (*Sigma*)

kanamicin (*Sigma*)

kloramfenikol (*Sigma*)

kloridna kiselina, HCl (*Sigma*)

ledena octena kiselina (*Sigma*)

magnezijev klorid, MgCl_2 (*Sigma*)

magnezijev sulfat, MgSO_4 (*Sigma*)

β - merkaptoetanol (*Sigma*)

natrijev hidroksid, NaOH (*Sigma*)

N-metil-2-pirolidon (*Axis*)

natrijev klorid, NaCl (*Sigma*)

natrijev dihidrogen-fosfat monohidrat, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ (*Merck*)

propilenglikol (*Axis*)

SDS, natrijev dodecil sulfat (*Sigma*)

sumporna kiselina, H_2SO_4 (*Axis*)

TEMED, N,N,N',N'- tetrametil- etilen-diamin (*Sigma*)
tripton (*Difco*)
Tris, tris[hidroksimetil]aminometan- Trizma base® (*Sigma*)

3.1.2 Pribor

filter za sterilizaciju FP 03013 (*Schleicher & Schuell*)

3.1.3 Boje

Coomassie brilliant blue® R-250 (*Biorad*)

3.1.4 Hranjivi mediji

LB tekući medij

tripton.....	8 g/L
ekstrakt kvasca	5 g/L
natrijev klorid, NaCl.....	8 g/L
pH 7.0 ± 0.2 pri 25°C	

Difco™ LB Broth Lennox

tripton.....	10 g/L
ekstrakt kvasca.....	5 g/L
natrijev klorid, NaCl.....	5 g/L
pH 7.0 ± 0.2 pri 25°C	

LB kruti medij

tripton.....	10 g/L
ekstrakt kvasca.....	5 g/L
natrijev klorid, NaCl.....	10 g/L
agar.....	15 g/L
pH 7.0 ± 0.2 pri 25°C	

SOC medij

tripton.....	20g/L
ekstrakt kvasca.....	5g/L
natrijev klorid, NaCl.....	0.58g/L

kalijev klorid, KCl.....	0.185g/L
magnezijev klorid, MgCl ₂	0.95g/L
magnezijev sulfat, MgSO ₄	1.2g/L
glukoza.....	3.6g/L
pH 7.0 ± 0.2 pri 25°C	

3.1.5 Enzimi i ostali proteini

Inhibitori proteaza, Complete EDTA-free/Protease inhibitor (*Roche*)

Standard molekulskih masa za denaturirajuću elektroforezu u poliakrilamidnom gelu, Unstained protein molecular weight marker (*Fermentas*)

3.1.6 Specifične komercijalne smjese analitičkih reagensija- kompleti

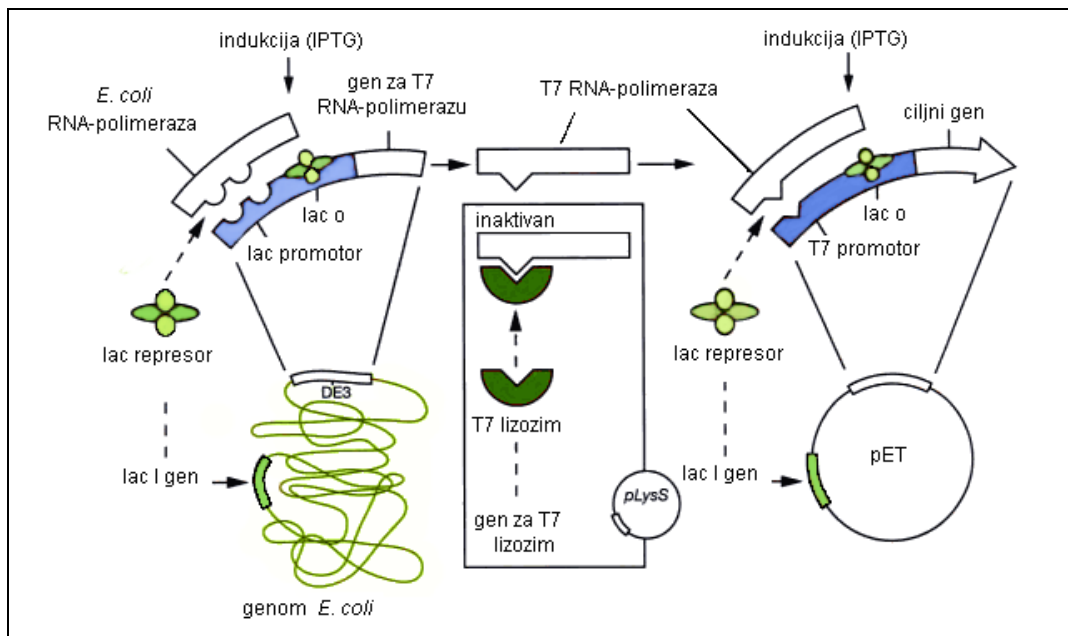
Axis® Homocystein EIA Kit

3.1.7 Kromatografski materijal

Ni-NTA Agarose (*Qiagen*)

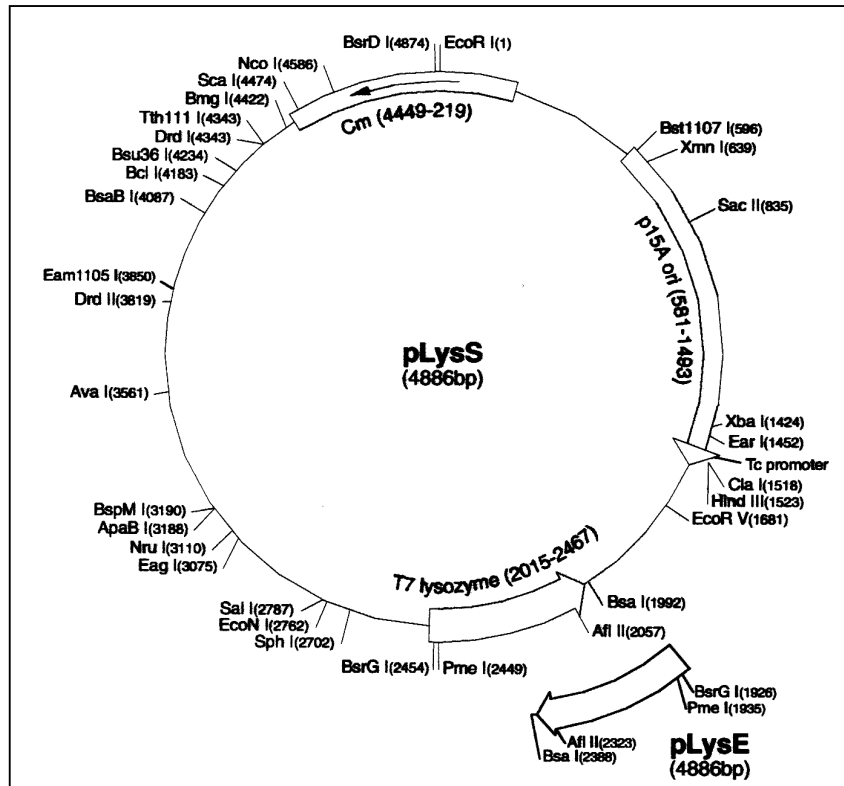
3.2 BAKTERIJSKI SOJEVI I PLAZMIDI

Soj *E. coli* BL21(DE3)pLysS (*F_{ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm (DE3) pLysS}*) korišten je za ekspresiju ispitivane metil-transferaze NpmA. Ovaj soj sadrži kromosomsku kopiju gena za T7 RNA-polimerazu. To je λ (DE3) lizogen soja BL21 koji nema citoplazmatsku proteazu Lon i proteazu OmpT, vezanu s vanjske strane membrane. Bakteriofag DE3 je derivat bakteriofaga λ koji sadrži gen *lacI*, promotor *lacUV5* i gen za T7 RNA-polimerazu pod kontrolom tog promotora, tako da se sinteza ove RNA-polimeraze, a time i sinteza proteina kloniranog u odgovarajući vektor pod kontrolom T7 promotora, inducira dodatkom IPTG (Slika 3.2.1). . Da bi se umanjila bazalna ekspresija kloniranog gena, soj sadrži plazmid pLysS na kojem se nalazi gen za lizozim, prirodni inhibitor T7 RNA-polimeraze. Uz prisutnost lizozima ne može doći do proizvodnje ciljnog proteina sve do indukcije sinteze T7 RNA-polimeraze dodatkom IPTG. Dodatna pogodnost koju nudi prisutnost lizozima jest autoliziranje skupljenih stanica nakon smrzavanja i ponovnog odmrzavanja (pET System Manual, 2006).



Slika 3.2.1. Shema i kontrolni elementi ekspresijskog sustava T7 (preuzeto i prilagođeno iz pET System Manual, 2006.).

Plazmid pLysS kao selektivni biljeg sadži i gen za rezistenciju na kloramfenikol (Cm), ishodište replikacije (p15A ori) te brojna mjesta koja prepoznaju različiti restrikcijski enzimi, čiji je položaj na plazmidu označen brojevima (Slika 3.2.2).

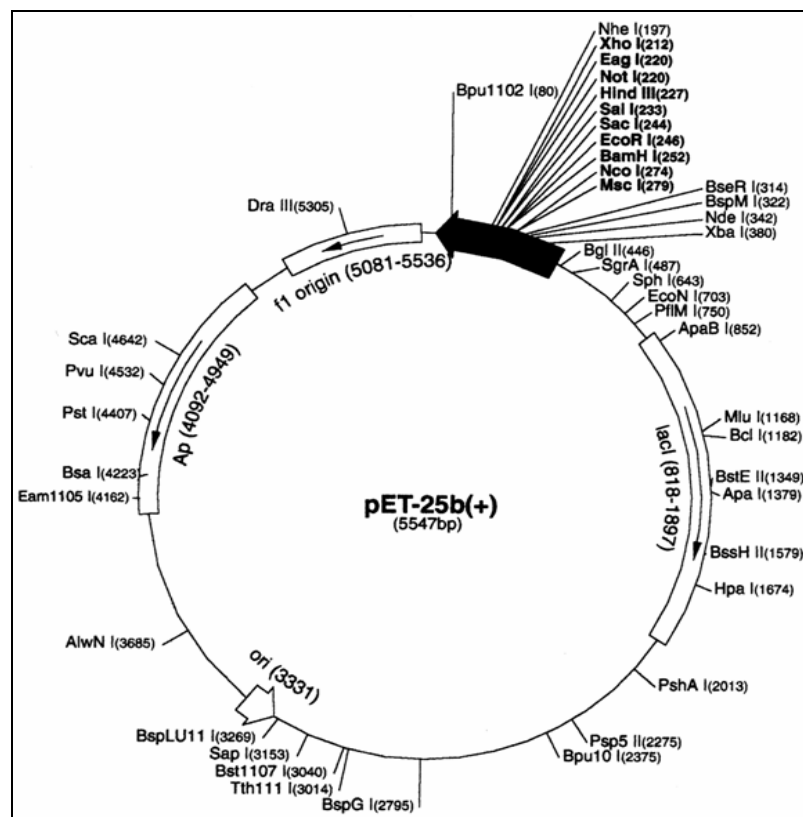


Slika 3.2.2. Plazmid pLysS (preuzeto s <http://www.merck-chemicals.com>).

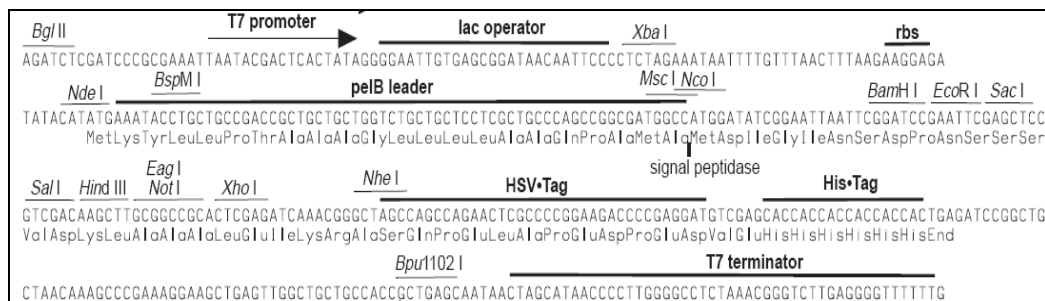
- pET-25b(+)** je translacijski ekspresijski vektor koji sadži promotor i regiju za početak translacije iz bakteriofaga T7. Ekspresija se odvija u bakterijskom soju koji ima RNA-polimerazu T7 pod kontrolom promotora lac, tako da se ekspresija inducira dodatkom IPTG. Ekspresijski vektor pET-25b(+) (Slika 3.2.3, pET System Manual, 2006) sadži gen za rezistenciju na ampicilin (Amp), ishodište replikacije bakteriofaga *f1* za dobivanje jednolančane DNA (*f1* origin), ishodište replikacije za *E. coli* iz plazmida pBR322 koje ga čini visokokopijskim vektorom (ori), T7 promotor, T7 transkripcijski start, te regiju za kloniranje i ekspresiju.

Ona uključuje višestruko mjesto za kloniranje i nekoliko odsječaka za dobivanje fuzijskih proteina koji omogućavaju pročišćavanje proteina u jednom koraku (His-Tag) ili za usmjeravanje proteina u međumembranski prostor (Slika 3.2.). Položaj mjesta koja prepoznaju restrikcijski enzimi označen je brojevima (pET System Manual, 2006).

- **pET-25b(+)-*npmA*-His:** vektor pET-25b(+) s genom *npmA* na fragmentu NdeI/EcoRI ugrađenom u višestruko mjesto za kloniranje, uz dodatak 6 kodona za histidin (His-tag) na 3'-kraju za lakše pročišćavanje proteina.
- **pET-25b(+)-*npmA*-His-D30A, pET-25b(+)-*npmA*-His-D55A, pET-25b(+)-*npmA*-His-W107A, pET-25b(+)-*npmA*-His-W177A, pET-25b(+)-*npmA*-His-W197A, pET-25b(+)-*npmA*-His-P106A:** vektor pET-25b(+) s mutiranim varijantama gena *npmA* prethodno dobivenim u laboratoriju.



Slika 3.2.3. Translacijski ekspresijski vektor pET-25b(+) (preuzeto s <http://www.merck-chemicals.com>).



Slika 3.2.4. Regija za kloniranje i ekspresiju vektora pET-25b(+), na slici 3.2.2 prikazana kao masno otisnuta strelica (preuzeto s <http://www.merck-chemicals.com>).

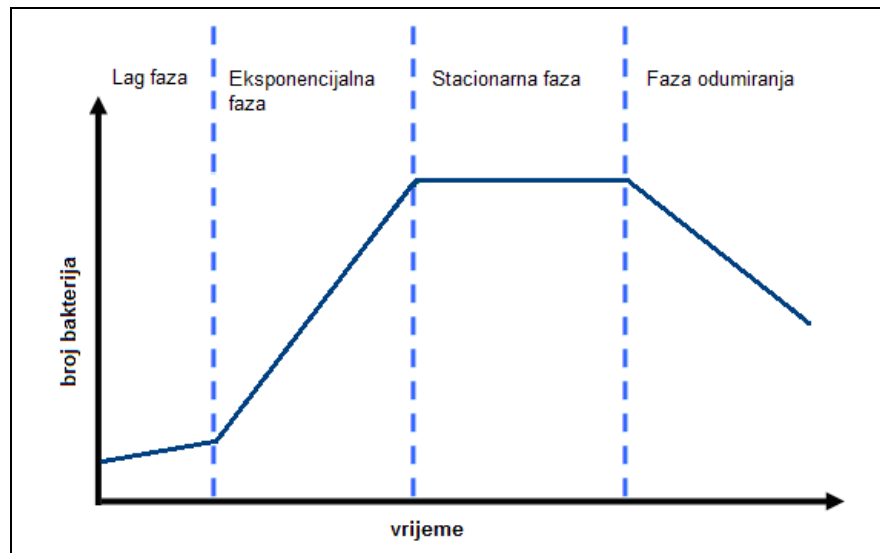
3.3 HRANJIVE PODLOGE I UZGOJ BAKTERIJA

3.3.1 Noćna kultura

Za dobivanje zasićene, stacionarne kulture, inkubacija traje preko noći (15-24 sata), prilikom čega kultura doseže apsorbanciju veću od 1, mjerenu pri 600 nm (Ambrović-Ristov i sur., 2007).

Krivulja rasta bakterijske kulture se može podijeliti na nekoliko karakterističnih faza: *lag* faza u kojoj se bakterija prilagođava svom okolišu, kada se još nije sposobna dijeliti, ali nastupa sinteza molekula RNA, enzima i sl.; *eksponencijalna* faza ili *log* faza, koja je period ubrzanog rasta bakterijske kulture, kada je stanična masa udvostručena po svakoj diobi; *stacionarna* faza kada se rast kultura drastično uspori i broj stanica je relativno konstantan, a događa se kao posljedica smanjenja količine hranjivih tvari i akumulacije toksičnih produkata u mediju; *faza odumiranja*, kao posljedica potpunog iscrpljenja nutrijenata u hranjivom mediju (Slika 3.3.1).

Cilj uzgoja noćne kulture je dobiti bakterije u stacionarnoj fazi rasta, kada je njihov broj relativno stalan, a presađivanjem na svježiu hranjivu podlogu, one imaju sposobnost daljnjeg rasta i diobe. Noćna kultura služi kao pretkultura s kojom se inokulira medij za mjerenje rasta bakterija (LB medij).



Slika 3.3.1. Faze rasta bakterijske kulture (preuzeto i prilagođeno s <http://gcserevision101.wordpress.com>).

3.3.2 Glicerolna kultura

Kako bi se kulture mogle pohraniti kroz duže vrijeme (do nekoliko godina), a da još uvijek zadrže vijabilnost, izrađuju se glicerolne kulture. Naime, glicerol je izvrstan medij za smrzavanje kultura na -80°C , jer ne stvara kristaliće koji su opasni za stanične dijelove. Bakterijske stanice u glicerolnim kulturama nisu mrtve, nego u hibernaciji. Na taj način, ako je potrebno ponovno koristiti stanice iz glicerolne kulture, dovoljno ih je zagrijati u mediju – one će izaći iz hibernacije, ubrzati svoj metabolizam i početi se dijeliti. Glicerolne kulture se izrađuju iz noćne kulture bakterija, gdje se dodaje glicerol u konačnoj koncentraciji 8% (npr. 800 μL noćna kultura, 200 μL 40% glicerol) (Ambrović-Ristov i sur., 2007).

3.3.3 Rast bakterija na tekućoj hranjivoj podlozi

Bakterije se mogu uzgajati u minimalnoj tekućoj podlozi određenog sastava (tzv. minimalni definirani medij) koja sadrži mineralne soli te izvor ugljika (šećer ili glicerol), a po potrebi se dodaju aminokiseline (40-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Za uzgoj se koriste još i bogate hranjive podloge neodređenog sastava kod kojih hranjive tvari potječu iz kvašćevih, mliječnih ili mesnih ekstrakata.

Za uzgoj bakterijskih sojeva koji sadrže plazmide s genom za otpornost na neki antibiotik, tekućoj podlozi se obavezno dodaje i pripadni antibiotik kako bi se spriječio gubitak plazmida i omogućila selekcija onih bakterija koje su primile plazmid. Kao bogata tekuća podloga koristi se **LB (Luria Bertani) medij**, koji se izrađuje iz triptona, ekstrakta kvasca i otopine natrijeva klorida otapanjem u miliQ vodi. pH se podešava otopinom natrijeva hidroksida. Medij se autoklavira (Ambrović-Ristov i sur., 2007). Postoji već gotova smjesa sastojaka, čiji je sastav prilagođen postizanju optimalnih kriterija izvedbe uzgoja i rasta bakterija. Takav medij je npr. **LB- Lennox**.

Hranjivi mediji, stakleno posuđe i plastika steriliziraju se autoklavanjem. Postupak se temelji na oslobađanju kondenzacijske topline vodene pare na hladnoj površini materijala, koji se autoklavira. Kondenzirana vodena para velikom brzinom zagrijava materijal i time ga sterilizira. Uvjeti za autoklavanje (temperatura, tlak, vrijeme): 121°C (1.1 bar ili 100 kPa), 20 min (za sve hranjive podloge, otopine, pufere).

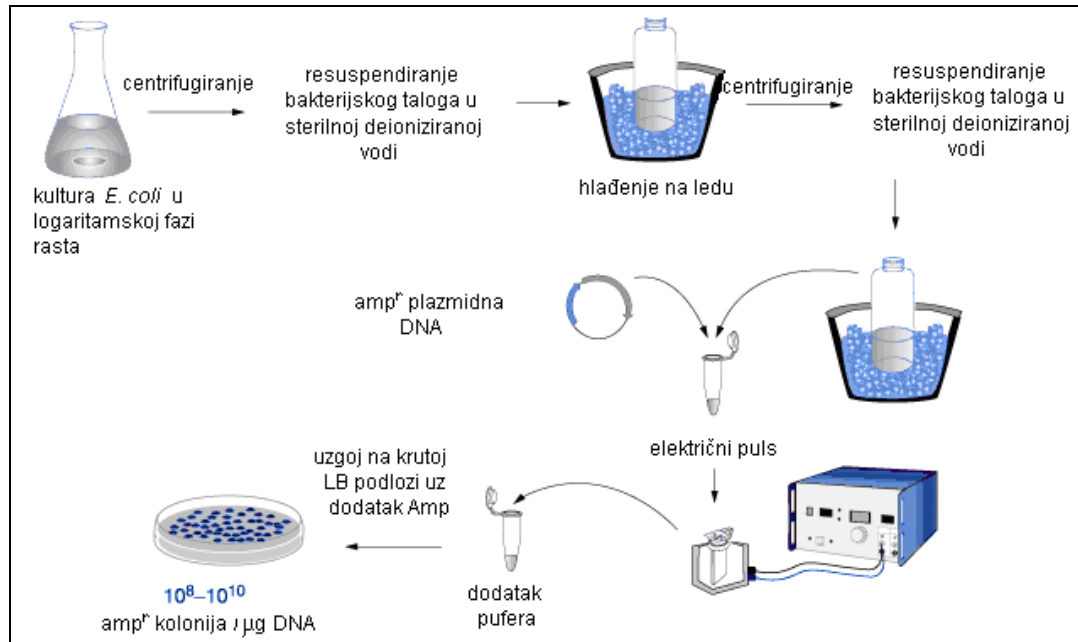
3.3.4 Rast bakterija na krutoj hranjivoj podlozi

Kruta hranjiva podloga se radi iz bogate tekuće hranjive podloge Luria Bertani i agara, koji su prethodno autoklavirani. Smjesa se ulijeva u Petrijeve zdjelice do polovice volumena te ostavlja na sobnoj temperaturi dok se ne ohladi i ne skrutne. Ploče se mogu pohraniti na 4°C. Ako su priređene s antibiotikom kao selektivnim biljegom, treba ih iskoristiti unutar 14 dana.

3.4 TRANSFORMACIJA BAKTERIJSKIH STANICA EKSPRESIJSKOG SOJA *E. coli* BL21(DE3)pLysS EKSPRESIJSKIM VEKTOROM pET-25b(+)-*npmA*-His

Bakterijske su stanice transformirane metodom elektroporacije (Slika 3.4.1). DNA kao hidrofilna molekula teško prolazi kroz membranu bakterijske stanice. Da bi bakterijska stanica primila stranu plazmidnu DNA mora se prije toga dovesti u stanje u kojem će biti omogućen prolaz stranoj DNA.

Pritom se stanice najprije ispiru sterilnom deioniziranom vodom i potom izlažu električnom puls koji se stvaraju pore u membrani stanice i omogućuje ulazak DNA u stanicu (Desmond, 2002).



Slika 3.4.1. Transformacija bakterijskih stanica metodom elektroporacije (preuzeto i prilagođeno s <http://www.biochem.arizona.edu>)

3.4.1 Priprema kompetentnih stanica

Bakterijskom kolonijom *E. coli* BL21(DE3)pLysS inokulirano je 3 mL LB medija te je predkultura inkubirana preko noći na 37 °C uz potresanje. Zatim je 2 mL noćne kulture preneseno u 200 mL LB medija te je inkubirano u istim uvjetima do rane eksponencijalne faze koja se određuje mjerenjem optičke gustoće (OD) pri 600 nm (spektrofotometar Ultrospec[®] 1000, *Amersham Biosciences*). Transformacija je najučinkovitija u ranoj ili srednjoj log fazi (OD=0.5-0.7).

Rast stanica zaustavljen je kad je OD₆₀₀ dostigla 0,4 prebacivanjem kulture u hladnu plastičnu epruvetu (1.5 mL) i držanjem na ledu 20 minuta. Stanice su zatim skupljene centrifugiranjem (4000 g, 15 min, 4 °C, centrifuga Jouan MR23i, *Thermoelectron corporation*) te resuspendirane u 4×50 mL hladne sterilne destilirane vode.

Ponavlja se postupak centrifugiranja i stanice resuspendiraju u 4×25 mL hladne destilirane vode. Nakon taloženja stanica centrifugiranjem treći puta (4000 g, 15 minuta, 4 °C) supernatant se odbacuje i talog se resuspendira u 4×2mL hladnog 10% glicerola. Posljednje centrifugiranje (4000 g, 15 min, 4 °C) provodi se u plastičnim epruветama (15 mL), a stanični talog resuspendira s 1 mL hladnog 10 % glicerola. Stanice su podijeljene u uzorke od 40 µL i pohranjene na -80 °C.

3.4.2 Elektroporacija

Prethodno pripremljene kompetentne stanice koje su čuvane na -80°C prebace se na led. U hladnim plastičnim epruветama (1.5 mL) pomiješa se 40 µL stanične suspenzije s 1 do 2 µL DNA te inkubira 1 minutu na ledu. Na uređaju za elektroporaciju (MicroPulser™ Electroporation Apparatus, BioRad) se odabere program Ec2 za uporabu s kivetama unutarnjeg promjera 0.2 cm. Smjesa stanica i DNA prenese se u hladnu kivetu i primijeni se jedan puls jačine 2.5 kV u trajanju 5 ms (BioRad).

Odmah nakon provedene transformacije u kivetu se doda 1 mL SOC medija. Vremenski period između primjene pulsa i dodatka SOC medija presudan je za oporavak transformanata *E. coli*, a odlaganje perioda prijenosa uzrokuje pad učinkovitosti transformacije. Stanična suspenzija se inkubira 1h na 37°C uz potresanje i potom nanese na selektivni medij.

3.5 EKSPRESIJA PROTEINA

3.5.1 Indukcija ekspresije proteina

Mala količina LB-medija s antibioticima kloramfenikolom i ampicilinom (u konačnoj koncentraciji 34 mg/mL, odnosno 50 mg/mL) inokulirana je transformiranim bakterijskim stanicama *E. coli* BL21(DE3)pLysS/pET25b(+)-*npmA*-His. Uzgojena noćna kultura poslužila je za inokulaciju 200 mL LB-medija s dodatkom kloramfenikola i ampicilina. Glavna kultura inkubirana je na 37°C uz potresanje do srednje logaritamske faze rasta, odnosno dok OD₆₀₀ kulture nije dosegla vrijednost 0.6-0.8. 20 µL kulture uzeto je za daljnju analizu ukupnih staničnih proteina neinducirane kulture.

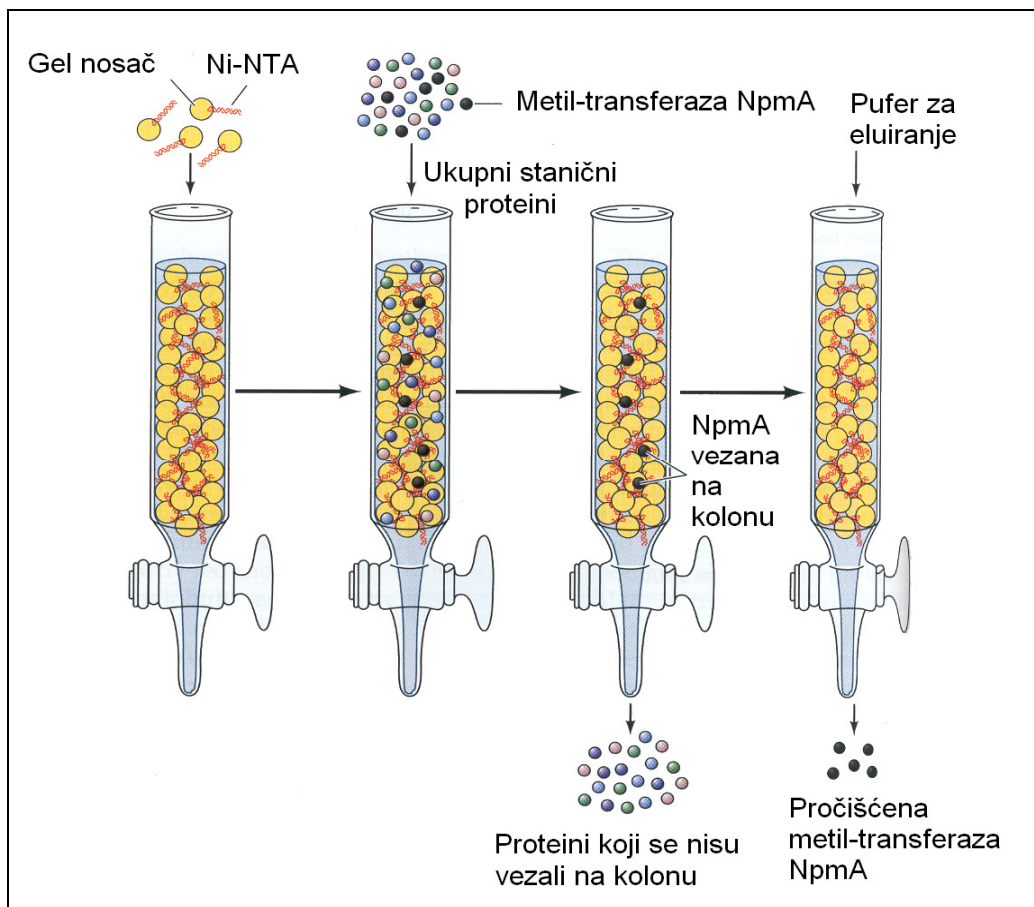
Ostataku kulture dodan je IPTG u konačnoj koncentraciji 1 mM i 3% etanol, da bi se potaknula ekspresija RNA-polimeraze T7, a time i proizvodnja proteina pod kontrolom promotora T7 (Studier i sur., 1990, Okamoto i sur., 2007). Kultura je uzgajana u istim uvjetima 3 h, nakon čega su stanice istaložene centrifugiranjem (3500 g, 10 min, 4°C, Jouan MR23i, *Thermo electron corporation*). Talog stanica smrznut je na -80 °C do uporabe. Isti je postupak ponovljen i za sve mutirane varijante metil-transferaze NpmA.

3.5.2 Priprema uzorka za pročišćavanje na koloni

Stanice su nakon odmrzavanja resuspendirane u 4 mL pufera za lizu (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol, NaOH do pH 8) s dodanim inhibitorima proteaza (matična otopina 50×) te su stanice dodatno razbijene ultrazvukom uporabom dezintegratora *Soniprep 150 MSE* (20 Hz, amplituda 36), u 6 navrata od 30 sekundi, razdvojenih stankama u trajanju od 30 sekundi (tijekom stanke bakterijski lizat drži se na ledu). Uzeto je 20 µL za analizu ukupnih staničnih proteina inducirane kulture. Netopljivi talog odvojen je centrifugiranjem (20 000 g, 20 min, 4°C, Jouan MR23i, *Thermo electron corporation*). U talogu su zaostale stanične ovojnice i inkluzijska tijela, a odvojeni supernatant predstavlja početni materijal za pročišćavanje proteina. Prethodno je uzeto 20 µL supernatanta za daljnju analizu topljive frakcije (SF).

3.6 PROČIŠĆAVANJE PROTEINA

Kao prvi korak pročišćavanja odabrana je afinitetna kromatografija na kromatografskom materijalu čija su aktivna komponenta ioni nikla u kompleksu s inertnim matriksom. Ioni nikla specifično vežu proteine s nekoliko uzastopnih izloženih histidinskih ostataka (His-tag), stoga je pretpostavljeno da će se protein NpmA vezati na kolonu, dok će većina proteina iz bakterijskog lizata ostati nevezana (Slika 3.6.1). Vezani proteini eluiraju se puferom s dodatkom imidazola u visokoj koncentraciji. Imidazol se u manjoj količini može dodati i u pufer za ispiranje kako bi se reduciralo vezanje neželjenih proteina. Za pročišćavanje je odabran komercijalno dostupan kromatografski materijal Ni-NTA Agarose (*QIAExpressionist*TM, 2003).

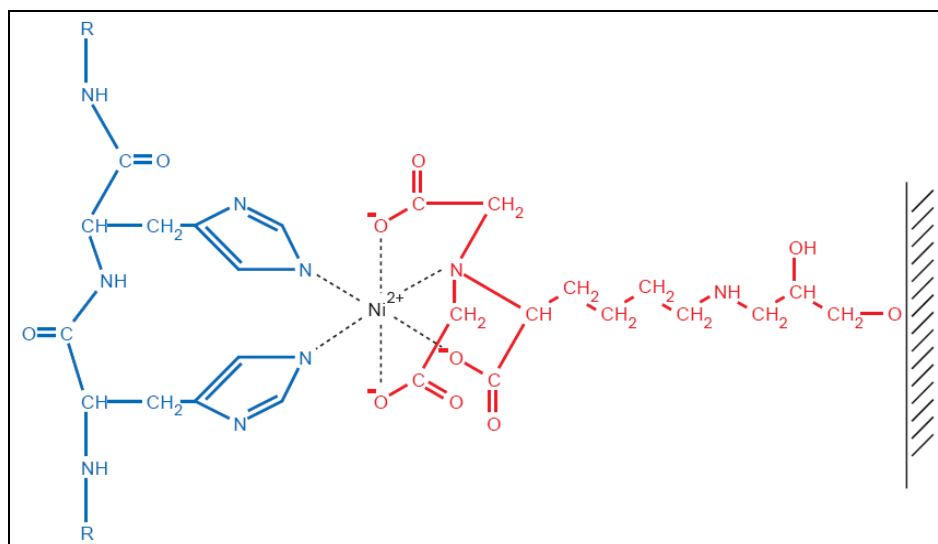


Slika 3.6.1. Shematski prikaz pročišćavanja proteina NpmA s His-tagom afinitetnom kromatografijom uz ione nikla (preuzeto i prilagođeno iz <http://www1.qiagen.com>).

3.6.1 Afinitetna kromatografija na koloni Ni-NTA Agarose

Ni-NTA Agarose je kromatografski materijal gdje je niklov ion u kompleksu s nitril-octenom kiselinom vezan na nosač Sepharose[®]CL-6B (Slika 3.6.2). 1 mL Ni-NTA Agarose veže otprilike 5-10 mg proteina s His-tagom. Komercijalno je dostupna u obliku prepakiranih kolona (korištene u ovom radu) ili kao 50% suspenzija u etanolu koja se dodaje izravno u bakterijski lizat te potom pakira u kolonu.

Supernatant dobiven u postupku 3.5.2 prenesen je na pripremljenu Ni-NTA kolonu uravnoteženu puferom za lizu te je smjesa inkubirana 1 h na 4°C uz lagano miješanje kako bi se omogućilo što bolje vezanje proteina NpmA. Sakupljena je frakcija proteina koji se nisu vezali na Ni-NTA (eng. *flow through*, FT).



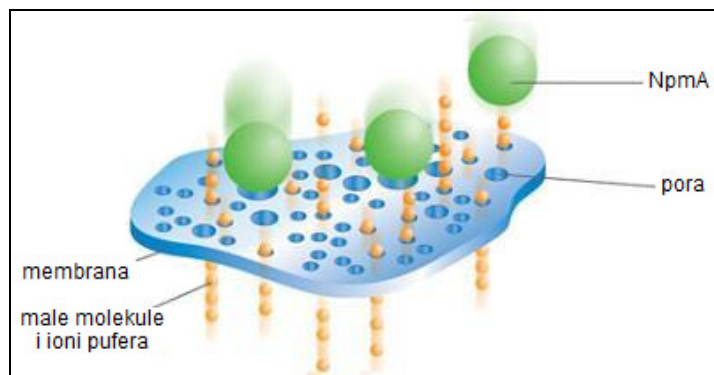
Slika 3.6.2. Interakcija između Ni-NTA matriksa i susjednih histidinskih ostataka unutar His-taga (preuzeto iz *The QIAExpressionist™*, 2003)

U kolonu je zatim dodano 15 mL pufera za ispiranje (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM imidazol, NaOH do pH 8) te je sakupljena frakcija. Na kraju je kolona isprana sa 7.5 mL pufera za eluiranje (50 mM NaH₂PO₄, pH 8, 250mM NaCl, 5% glicerol, 5 mM β - merkaptotetanol, 200 mM imidazol) u frakcijama od 0.5, 1, 1 i 5 mL. Od svake frakcije uzeto je po 10 μL za analizu denaturirajućom elektroforezom u 12% poliakrilamidnom gelu.

3.6.2 Dijaliza

Dijaliza je separacijska tehnika koja omogućava uklanjanje malih molekula i iona pufera iz otopine proteina (ili drugih makromolekula) pasivnom difuzijom kroz polupropusnu membranu (Slika 3.6.3). Otopina proteina i pufer za dijalizu nalaze se na suprotnim stranama membrane. Molekule veće od pora u membrani ostaju u otopini uzorka, dok male molekule slobodno prolaze kroz membranu, čime se smanjuje njihova koncentracija u uzorku.

Dijalizom se postiže zadržavanje proteina NpmA u uzorku, uklanjanje malih molekula (imidazol) koje bi mogle utjecati na aktivnost enzima i izmjena iona između uzorka i pufera za dijalizu (Thermo Scientific Pierce High-Performance Dialysis, Desalting and Detergent Removal Technical Handbook, 2009). U eksperimentu je korišteno crijevo za dijalizu (*cut off* ~ 5000, *Sigma*).



Slika 3.6.3. Shematski prikaz procesa dijalize (preuzeto i prilagođeno s <http://www.piercenet.com>)

Uzorak za dijalizu su uzorci proteina NpmA prikupljeni pročišćavanjem na koloni Ni – NTA Agarose uz uporabu pufera za eluiranje (frakcije 0.5, 1, 1 mL). Uzorak je smješten unutar pripremljenog crijeva koje je zatvoreno kvačicama s obje strane i stavljeno u pufer za dijalizu (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 10% glicerol, 6 mM β - merkaptoletanol, 250 mM NH₄Cl) volumena 330 mL. Dijaliza se provodi u dva navrata u trajanju od dva sata s promjenom pufera radi održavanja koncentracijskog gradijenta u otopinama te još jednom preko noći na 4°C. Tijekom dijalize pufer se miješa pomoću magnetske miješalice. Pročišćeni protein je nakon dijalize analiziran denaturirajućom elektroforezom u 12% poliakrilamidnom gelu kao što je opisano u odjeljku 3.7 i korišten je za metilacijski test *in vitro*.

3.6.3 Određivanje koncentracije proteina

Koncentracija proteina u dijaliziranim uzorcima određena je mjerenjem apsorbancije pri valnoj duljini 280 nm, uz poznati ekstinkcijski koeficijent, koji za metil-transferazu NpmA u vodi iznosi 22920 dm³/molcm. Koncentracija je izračunata prema formuli:

$$c = (A_{280} \times Mw \times l \times \text{razrjeđenje}) / \epsilon$$

gdje je c koncentracija u g/dm³, A₂₈₀ apsorbancija pri 280 nm, Mw molekulska masa u g/mol, l optički put u cm, a ε ekstinkcijski koeficijent u dm³/molcm.

3.7 ELEKTROFOREZA U DENATURIRAJUĆEM POLIAKRILAMIDNOM GELU (SDS-PAGE)

Elektroforeza je metoda razdvajanja nabijenih čestica pod utjecajem električnog polja. Putovanje nabijenih čestica ovisi o naboju, masi i obliku čestice, što znači da će različite čestice imati različite brzine kretanja. Upravo se na tim različitim brzinama putovanja temelji primjena elektroforeze kao metode za odjeljivanje sastojaka višekomponentne smjese. Kako je većina bioloških makromolekula električki nabijena, ova se tehnika može koristiti i za njihovo odjeljivanje.

Poseban tip elektroforeze je SDS-poliakrilamidna elektroforeza kojom se proteini razdvajaju na osnovi razlike u masi (Judd, 1994). Zbog karakterističnog načina pripreme uzoraka proteini se denaturiraju i na njih se veže negativno nabijeni natrijev dodecilsulfat (SDS). Kako je količina SDS vezanog po jedinici mase proteina konstantna (1 g proteina veže 1.4 g SDS-a), jedino je masa proteina ta koja određuje količinu vezanog SDS, a o njoj će ovisiti naboj molekule i elektroforetska pokretljivost.

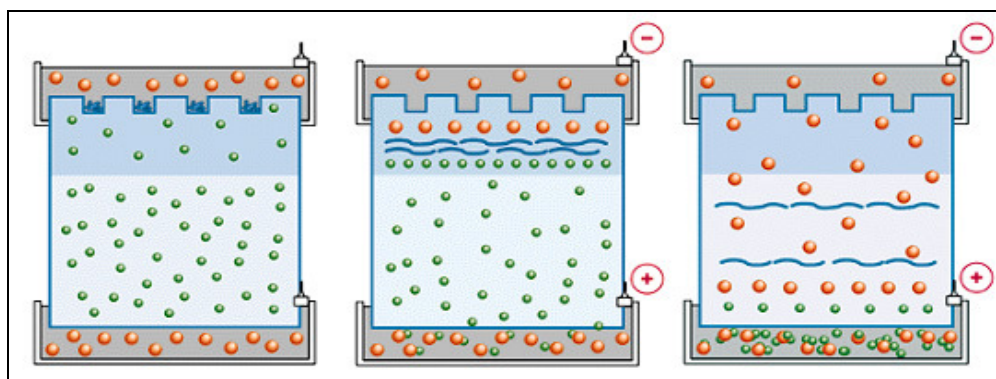
Volumen pojedinog uzorka za elektroforezu podešen je tako da količina proteina u svim uzorcima bude jednaka. Uzorci su razrijeđeni u omjeru 1:1 puferom za nanošenje uzoraka (50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 10% glicerol, 5% 2-merkaptotanol, 2.3% SDS, 0.1% bromfenolplavo) i kuhani 5 minuta pri 95°C. β-merkaptotanol iz pufera za nanošenje uzoraka uzrokovao je kidanje disulfidnih mostova što je izazvalo disocijaciju većine višejediničnih proteina. Denaturaciju dodatno potiče i povišena temperatura. Uloga glicerola je da uzorak učini težim, a boja omogućava praćenje kretanja uzoraka kroz gel. Za određivanje molekulske mase proteina komercijalno su dostupni standardi molekulskih masa, odnosno smjese proteina poznatih molekulskih masa.

SDS-poliakrilamidni gel priprema se između dvije staklene ploče. Sastoji se od gornjeg gela za sabijanje (5% poliakrilamid) i donjeg gela za razdvajanje (12% poliakrilamid), a priređen je prema sljedećem protokolu:

- Gel za sabijanje, 5%: voda, 30% akrilamid/bisakrilamid mix, 1M Tris (pH 6.8), 10% SDS, 10% APS, TEMED.

- Gel za razdvajanje, 12%: voda, 30% akrilamid/bisakrilamid mix, 1.5 M Tris (pH 8.8), 10% SDS, 10% APS, TEMED

Nakon polimerizacije gela nanose se uzorci s denaturiranim proteinima. Elektroforeza se provodi u puferu za elektroforezu koji se nalazi u gornjem i donjem spremniku. Njegov pH i pH gela za odjeljivanje je oko 9, a pH otopine uzorka i gela za zbijanje je dvije pH jedinice niži. Kada se uspostavi tok struje, ioni pufera iz gornjeg spremnika ulaze u područje nižeg pH i postaju nenabijeni. To uzrokuje povećanje jakosti električnog polja u području gela za sabijanje pa anioni proteina vrlo brzo putuju. Ova pojava uzrokuje prilaz aniona proteina gelu za odjeljivanje u obliku vrlo uskih (oko 1 mm debelih) vrpca čime se osigurava da svi proteini krenu u odjeljivanje sa iste pozicije. Kako anioni proteina ulaze u gel za odjeljivanje, učinak gel-filtracije ih usporava, što omogućava ionima pufera iz gornjeg spremnika da ih preteknu i oni, budući da su došli u područje višeg pH, ponovno postaju nabijeni (Slika 3.7.1). Od tog trena elektroforetsko razdvajanje se normalno nastavlja. Jakost polja tijekom putovanja uzoraka u gornjem gelu je 8 V/cm, a 12 V/cm u donjem gelu. Kada boja doprije do kraja donjeg gela, elektroforeza se prekida (Laemmli, 1970). Nakon elektroforeze staklene ploče su razdvojene, a gel je uronjen u otopinu boje koja specifično boji proteine (Coomassie Brilliant Blue[®] G, 10% ledena octena kiselina u metanolu) i bojan preko noći pri sobnoj temperaturi uz blago njihanje. Gel je odbojan otopinom za odbojavanje (15% ledena octena kiselina, 10% metanol).



Slika 3.7.1. Razdvajanje proteina SDS-PAGE elektroforezom (preuzeto i prilagođeno s www.sci.sdsu.edu)

3.8 METILACIJSKI TEST *IN VITRO*

Metilacijski test *in vitro* je postupak kojim se određuje aktivnost enzima iz porodice S-adenozil-metionin ovisnih metil-transferaza. Donor metilne skupine u enzimskoj reakciji je S-adenozil-metionin (SAM) koji prelazi u S-adenozil-homocistein (SAH), čija se koncentracija određuje komercijalno pribavljenim kompletom specifičnih reagensija (Axis® Homocysteine EIA, 2006).

U ovom je pokusu određena aktivnost divljeg tipa i mutiranih varijanti metil-transferaze NpmA na ribosomskim podjedinicama 30S, kao jedinom supstratu za koji je pokazana uspješna metilacija *in vitro* (Wachino i sur., 2007). Postupak se provodi na mikrotitarskim pločicama, gdje se na stijenkama bunarića nalazi prethodno imobilizirani S-adenozil-homocistein (konjugiran s BSA) poznate koncentracije. Na mikrotitarsku pločicu se nanose uzorci iz prethodno pripremljene reakcijske smjese u kojima je prisutan S-adenozil-homocistein nastao enzimskom reakcijom, čiju koncentraciju određujemo. Pokus je za divlji tip i sve mutante enzima NpmA proveden dva puta u duplikatu.

3.8.1 Priprema reakcijske smjese

Ribosomske podjedinice 30S inkubiraju se na 37°C u trajanju od 10 min neposredno prije provođenja reakcije metilacije *in vitro*.

Pripremljeni uzorci supstrata (4 pmol) prebace se u smjesu vode i pufera (20 mM Tris-Cl, pH 6.5; 100 mM NH₄Cl, 10 mM MgCl₂, 6 mM β-merkaptoetanol, 10% glicerol) koja se drži na ledu. Doda se S-adenozil-metionin (100 pmol) i uzorak pročišćenog enzima NpmA (8 pmol) te se reakcijska smjesa inkubira na 37°C, 45 min. Enzimska reakcija zaustavlja se dodatkom EDTA konačne koncentracije 10 μM koja kao kelirajući agens veže Mg²⁺ ione iz pufera potrebne za aktivnost enzima.

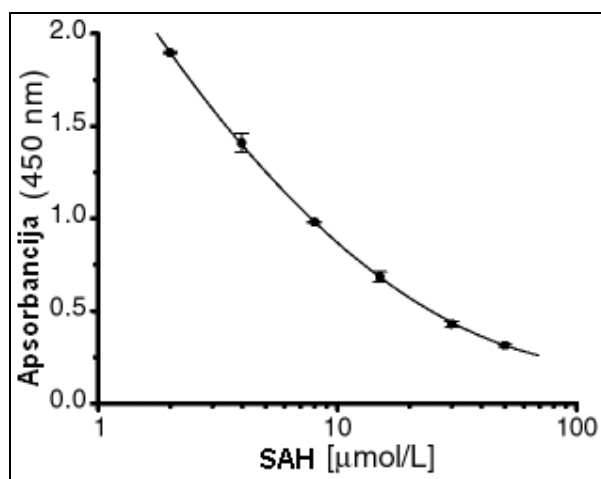
3.8.2 Postupak na mikrotitarskoj pločici

Na mikrotitarsku pločicu doda se uzorak s reakcijskom smjesom i monoklonska mišja anti-SAH protutijela.

Tijekom inkubacije od 30 min, protutijela se vežu na SAH iz uzorka i onaj na stijenkama bunarića mikrotitarske pločice. Sav SAH iz uzorka zbog veće izloženosti molekula i većeg broja sudara ulazi u kompleks s protutijelom. Dio SAH na stijenkama bunarića ostat će slobodan ovisno o koncentraciji SAH u uzorku.

Puferom za ispiranje (fosfatni pufer, mertiolat, Tween 20, BSA; razrijeđen 10× s MiliQ vodom) uklanjaju se nevezana protutijela i kompleksi protutijela sa SAH iz uzorka. Potom se dodaju sekundarna zečja protutijela razvijena naspram mišjih monoklonskih protutijela i obilježena peroksidazom iz hrena. Tijekom inkubacije od 20 min, sekundarna protutijela vežu se na anti-SAH protutijela. Dodatkom supstrata za peroksidazu počinje enzimska reakcija te se po zaustavljanju reakcije dodatkom sumporne kiseline određuje koncentracija nastalog produkta mjerenjem apsorbancije na 450 nm (čitač mikrotitarskih pločica Victor 2, *PerkinElmer*) (Axis® Homocysteine EIA, 2006).

Izmjerena apsorbancija proporcionalna je koncentraciji produkta peroksidazne reakcije, odnosno sekundarnog protutijela na kojem se nalazi peroksidaza i kompleksa SAH-anti-SAH protutijelo te obrnuto proporcionalna koncentraciji SAH u uzorku (Slika 3.8.1).



Slika 3.8.1. Ovisnost izmjerene apsorbancije o koncentraciji S-adenozil-homocisteina u uzorku (preuzeto i prilagođeno s <http://www.embeediagnostics.com>)

3.9 ODREĐIVANJE MINIMALNE INHIBITORNE KONCENTRACIJE KANAMICINA

Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) kanamicina određena je metodom razrjeđenja u tekućem mediju za soj *E. coli* BL21(DE3)pLysS transformiran plazmidom pET-25b(+)-*npmA*. MIK je najveće razrjeđenje antibiotika koje sprječava vidljivi rast (zamućenje) nakon cjelonoćne inkubacije na 37°C (Karakašević, 1987). Ovom metodom uspoređuje se MIK divljeg tipa i MIK sojeva s mutiranim varijantama metil-transferaze NpmA (D30A, D55A, W107A, W177A, W197 i P106A). Tablica 3.9.1 prikazuje shemu pokusa u mikrotitarskoj pločici. Pokus je za svaki bakterijski soj s pojednom varijantom enzima NpmA proveden dva puta u triplikatu.

Tablica 3.9.1. Shematski prikaz mikrotitarske pločice s naznačenim koncentracijama kanamicina u pojednom bunariću za divlji tip i soj s mutiranom varijantom enzima NpmA D55A. I – kontrola sterilnosti (200 μ L LB_{mix}), II – negativna kontrola (150 μ L Kan 1024 + 50 μ L LB_{mix}), III i IV – pozitivne kontrole (150 μ L LB_{mix} + 50 μ L kulture)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	wt 0.5	wt 1	wt 2	wt 4	wt 8	wt 16	wt 32	wt 64	wt 128	wt 256	wt 512	wt 1024
B	wt 0.5	wt 1	wt 2	wt 4	wt 8	wt 16	wt 32	wt 64	wt 128	wt 256	wt 512	wt 1024
C	wt 0.5	wt 1	wt 2	wt 4	wt 8	wt 16	wt 32	wt 64	wt 128	wt 256	wt 512	wt 1024
D	D55A 0.5	D55A 1	D55A 2	D55A 4	D55A 8	D55A 16	D55A 32	D55A 64	D55A 128	D55A 256	D55A 512	D55A 1024
E	D55A 0.5	D55A 1	D55A 2	D55A 4	D55A 8	D55A 16	D55A 32	D55A 64	D55A 128	D55A 256	D55A 512	D55A 1024
F	D55A 0.5	D55A 1	D55A 2	D55A 4	D55A 8	D55A 16	D55A 32	D55A 64	D55A 128	D55A 256	D55A 512	D55A 1024
G												
H	I	II	III	IV								

Ampicilin i kloramfenikol dodaju se LB mediju u stalnim koncentracijama od 50 odnosno 34 mg/mL kako bi se omogućio rast isključivo onih bakterija koje sadrže plazmid pET-25b(+)-*npmA* (LB_{mix}).

Kanamycin se dodaje u dvostrukim serijskim razrjeđenjima da se ispita rezistencija bakterijskih stanica uslijed prisutnosti gena *npmA*. Dvostruka serijska razrjeđenja Kan dobivaju se iz početne koncentracije od 1024 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$)

Noćna kultura bakterija razrijedi se svježim LB medijem 100 puta i uzgaja dok optička gustoća pri 600 nm (OD_{600}) ne dosegne vrijednost oko 1, tj. dok stanice ne budu u eksponencijalnoj fazi rasta. 1 mL kulture *E. coli* pri $\text{OD}_{600}=1$ sadrži oko 5×10^8 stanica. Koncentracija bakterijskih stanica mora biti standardizirana tako da u svakom bunariću bude oko 10^5 stanica u 200 μL hranjivog medija. Za potrebe testa uzima se odgovarajući volumen kulture u eksponencijalnoj fazi rasta koja se razrjeđuje hranjivim medijem. U uzorak LB_{mix} dodaje se Kan u različitim razrjeđenjima i bakterijske stanice tako da ukupni volumen (u pojedinom bunariću) bude 200 μL . Nakon što se uzorci nanesu na mikrotitarsku pločicu kako je naznačeno u Tablici 3.9.1, ona se inkubira uz protresanje na 37°C preko noći, nakon čega se provjerava bakterijski rast.

4 REZULTATI

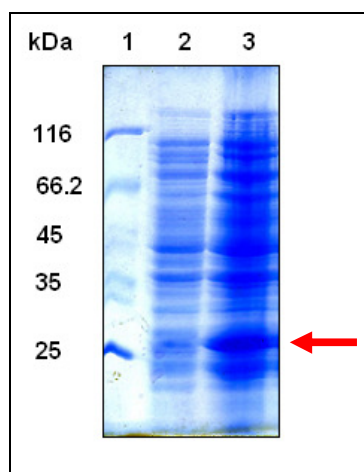
Rekombinantni ekspresijski vektori pET-25b(+) s genima za divlji tip i mutirane varijante metil-transferaze NpmA (D30A, D55A, P106A, W107A, F177A i W197A) unijeti su u ekspresijski soj *E. coli* BL21(DE3)pLysS te je ekspresija proteina potaknuta dodatkom IPTG u bakterijsku kulturu. Svi su proteini pročišćeni iz staničnog ekstrakta afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA agarozu, dijalizirani i analizirani denaturirajućom elektroforezom u poliakrilamidnom gelu.

Metilacijskim testom ispitana je enzimska aktivnost mutiranih varijanti naspram divljeg tipa NpmA te je tako dobiven uvid u ulogu pojedinih aminokiselina u vezanju kofaktora, supstrata i katalizi.

Pokusima *in vivo* određena je minimalna inhibitorna koncentracija kanamicina i time je analiziran utjecaj pojedinih mutacija na sposobnost ostvarivanja rezistencije u prirodno osjetljivoj *E. coli*.

4.1 EKSPRESIJA METIL-TRANSFERAZE NpmA

Rekombinantni vektor pET-25b(+)-*npmA*-His unijet je transformacijom u ekspresijski soj *E. coli* BL21(DE3)pLysS. Indukcija ekspresije proteina potaknuta je dodatkom IPTG u bakterijsku kulturu. Uspješnost ekspresije provjerena je analizom proteinskog ekstrakta elektroforezom u poliakrilamidnom gelu. Usporedbom obrazaca proteina inducirane i neinducirane bakterijske kulture i standarda molekulskih masa zapažena je povećana količina proteina molekulske mase 25.6 kDa u induciranom uzorku (Slika 4.1.1) Molekulska masa proteina odgovara masi metil-transferaze NpmA.

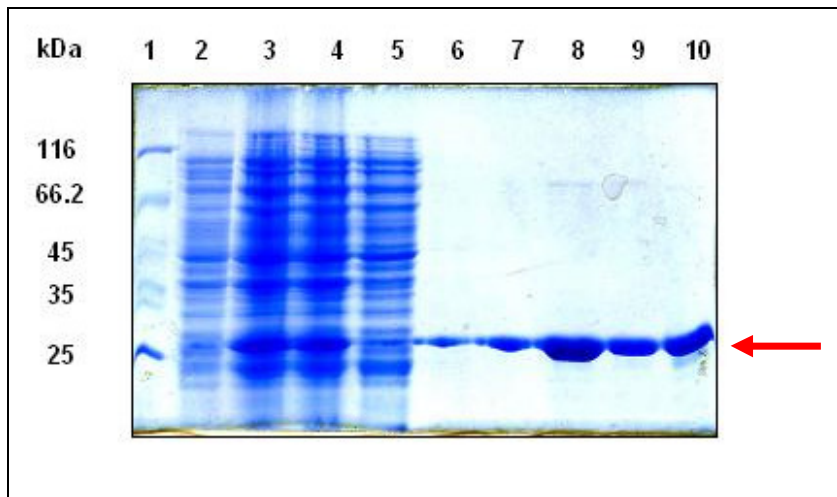


Slika 4.1.1. Analiza ukupnih staničnih proteina denaturirajućom elektroforezom u 12% poliakrilamidnom gelu. 1: standardni uzorak masa; 2: neinducirana kultura; 3: inducirana kultura. Strelicom je označen protein veličine 25.6 kDa koji odgovara metil-transferazi NpmA.

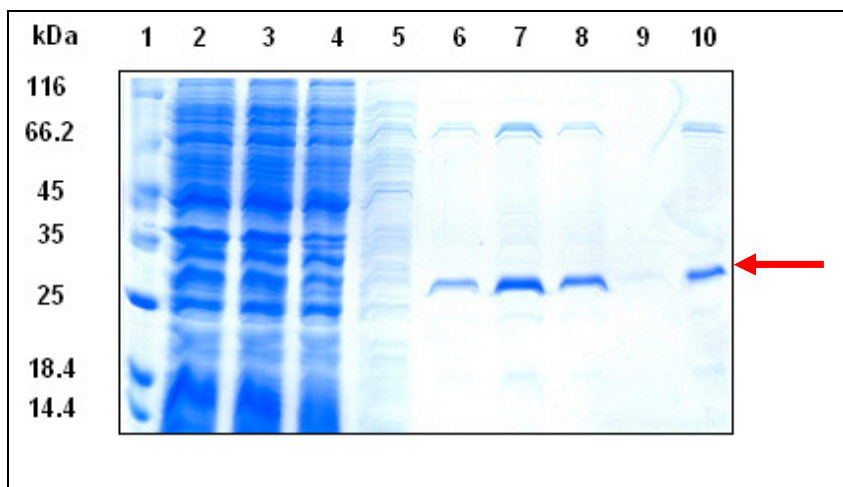
4.2 PROČIŠĆAVANJE METIL-TRANSFERAZE NpmA

Kao metoda pročišćavanja korištena je afinitetna kromatografija na koloni s nikelom koja specifično veže protein NpmA koji na C-kraju sadrži nekoliko uzastopnih histidinskih ostataka.

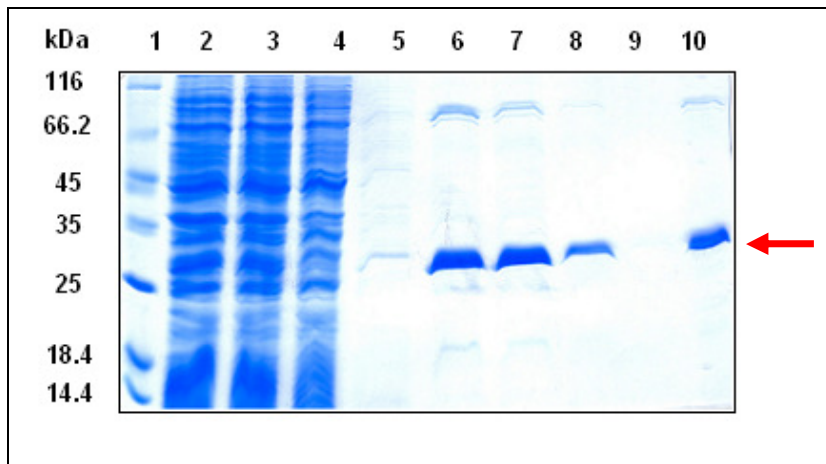
Proteinski ekstrakt pročišćen je na afinitetnoj koloni Ni-NTA Agarose kao što je opisano u odjeljku 3.6.1. Sakupljene frakcije su analizirane denaturirajućom elektroforezom u 12% poliakrilamidnom gelu kao što prikazuje Slika 4.2.1 i Slika 4.2.2.



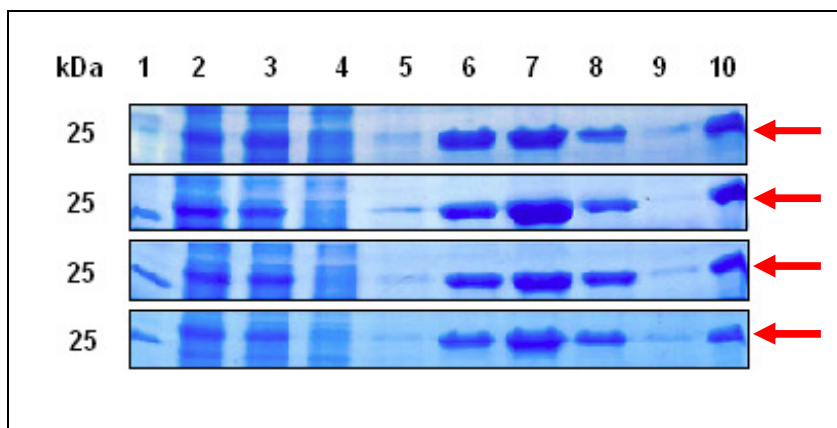
Slika 4.2.1. Analiza pročišćavanja proteinskog ekstrakta divljeg tipa na afinitetnoj koloni Ni-NTA Agarose denaturirajućom elektroforezom u 12% poliakrilamidnom gelu; strelicom je označen protein veličine 25.6 kDa koji odgovara metil-transferazi NpmA. 1: standard molekulskih masa; 2: ukupni stanični proteini neinducirane kulture; 3: ukupni stanični proteini inducirane kulture; 4: topljiva citoplazmatska frakcija inducirane kulture; 5: proteini koji se nisu vezali na kolonu; 6-9: frakcije skupljene nakon ispiranja puferom za eluiranje; 10: frakcija skupljena nakon postupka dijalize.



a)



b)



c)

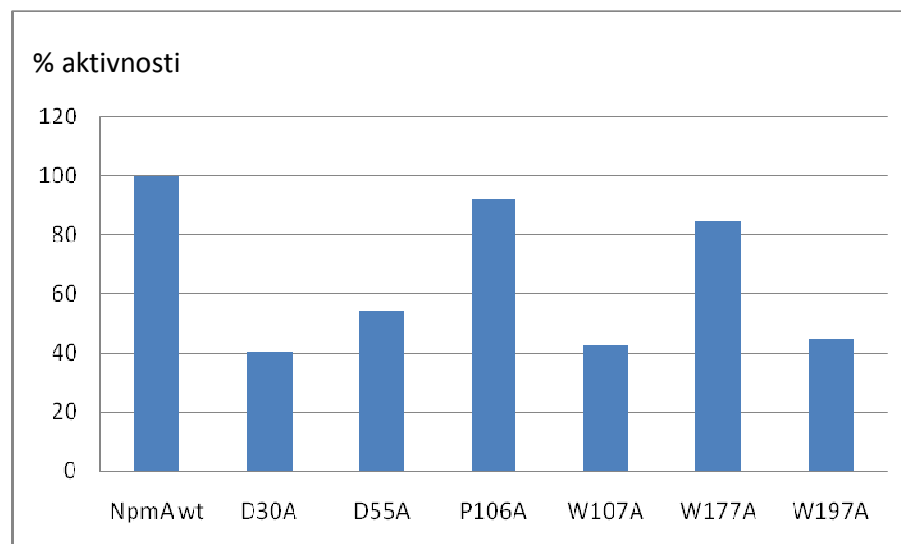
Slika 4.2.2. Analiza pročišćavanja proteinskog ekstrakta sojeva s mutiranim varijantama enzima NpmA W177A (a), P106A (b) i D30A, D55A, W107A i W197A (c) na afinitetnoj koloni Ni-NTA Agarose denaturirajućom elektroforezom u 12% poliakrilamidnom gelu; strelicom je označen protein veličine 25.6 kDa koji odgovara metil-transferazi NpmA. 1: standard molekulskih masa; 2: ukupni stanični proteini inducirane kulture; 3: topljiva citoplazmatska frakcija inducirane kulture; 4: proteini koji se nisu vezali na kolonu; 5: frakcija skupljena nakon ispiranja puferom za ispiranje; 6-9: frakcije skupljene nakon ispiranja puferom za eluiranje; 10: frakcija skupljena nakon postupka dijalize.

Pročišćavanjem na koloni Ni-NTA Agarose odstranjena je većina nepoželjnih proteina jer je, čini se, His-tag dobro izložen na površini proteina NpmA. Bakterijski proteini koji ne sadrže niz od nekoliko uzastopnih histidina kao metil-transferaza NpmA vrlo se slabo ili uopće ne vežu na kolonu te se stoga lako ispiru niskim koncentracijama imidazola.

Vidljivo je da je mutant W177A eksprimiran u nešto manjoj količini od ostalih varijanti enzima NpmA, što svjedoči o mogućoj strukturnoj nestabilnosti proteina koja je nastala kao posljedica mutacije. Proteini su nakon pročišćavanja podvrgnuti dijalizi da bi se izmijenio pufer i proteini tako pripremili za metilacijski test.

4.3 METILACIJSKI TEST *IN VITRO*

U ovom je pokusu određena aktivnost divljeg tipa i mutiranih varijanti metil-transferaze NpmA na ribosomskim podjedinicama 30S, kao jedinom supstratu za koji je pokazana uspješna metilacija *in vitro*. Da bi se usporedila učinkovitost prijenosa metilne skupine mutančnih proteina s nativnim proteinom i tako kvantitativno analizirao utjecaj pojedinih mutacija na aktivnost proteina, metilacijskim je testom određena količina prenijetih metilnih skupina unutar 45 minuta. Izmjerena apsorbancija je obrnuto proporcionalna koncentraciji SAH, odnosno koncentraciji metilirane RNA po završetku reakcije .



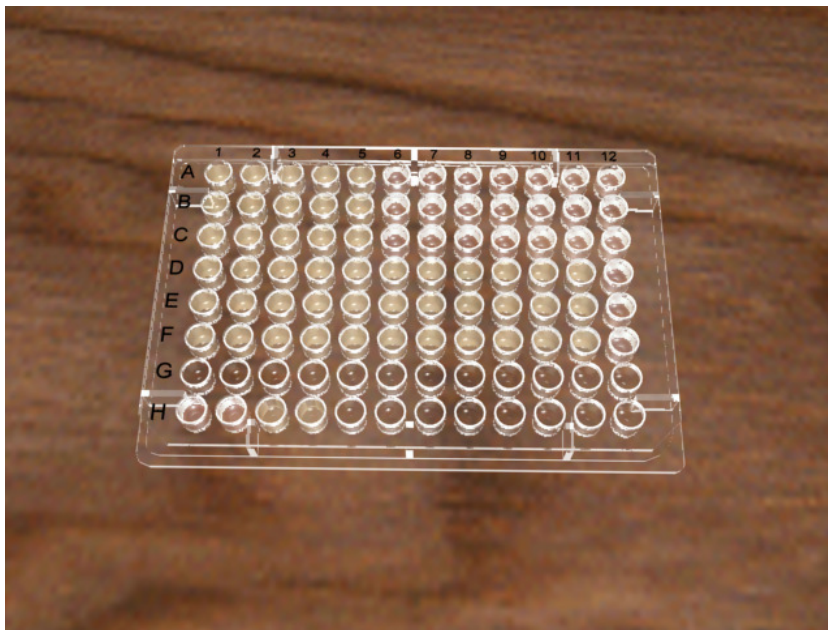
Slika 4.3.1. Relativna aktivnost mutanata metil-transferaze NpmA naspram enzima divljeg tipa.

Relativni odnosi mutanata prema enzimu divljeg tipa prikazani su na slici 4.3. Utvrđeno je da niti jedna mutacija nije u potpunosti dokinula aktivnost enzima. Mutanti P106A i F177A pokazuju aktivnost iznad 80%, što znači da mutacija nije imala značajniji učinak na aktivnost enzima.

Nasuprot tomu, aktivnost mutanata D30A, D55A i W197A smanjena je na oko 40% aktivnosti enzima divljeg tipa, što upućuje na važnost njihove uloge u provođenju enzimske reakcije.

4.4 ODREĐIVANJE MINIMALNE INHIBITORNE KONCENTRACIJE KANAMICINA

Određene su minimalne inhibitorne koncentracije kanamicina na stanicama transformiranim plazmidom pET-25b(+)-*npmA*. Uspoređen je MIK soja divljeg tipa i MIK sojeva s mutiranim varijantama metil-transferaze NpmA (D30A, D55A, W107A, W177A, W197 i P106A). Slika 4.4.1 pokazuje da je došlo do zamućenja u pojedinim bunarićima, što potvrđuje da su se bakterije razmnožile u prisutnosti kanamicina određene koncentracije, dok je bistar sadržaj dokaz da nije došlo do razmnožavanja bakterija.



Slika 4.4.1. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije kanamicina u soju *E. coli* BL21(DE3)pLysS/ pET-25b(+)-*npmA* na mikrotitarskoj pločici. Redovi A–C sadrže bakterijske stanice soja s mutiranom varijantom metil-transferaze NpmA D30A uzgajane u serijskim razrjeđenjima kanamicina od 0.5 do 1024 $\mu\text{g/mL}$; redovi D-F sadrže bakterijske stanice soja s mutiranom varijantom metil-transferaze NpmA D55A uzgajane u serijskim razrjeđenjima kanamicina od 0.5 do 1024 $\mu\text{g/mL}$; u redu H redom se nalaze kontrola sterilnosti, negativna kontrola i dvije pozitivne kontrole.

Negativna kontrola je ostala bistra što je dokaz nemogućnosti razmnožavanja kontaminirajućih bakterija u LB mediju s kombinacijom triju antibiotika (kanamicin, ampicilin, kloramfenikol). Pozitivna kontrola pokazuje bakterijski rast, a kontrola sterilnosti ostaje bistra što znači da je pokus uspješno proveden u sterilnim uvjetima te nije došlo do kontaminacije s neželjenim mikrobima.

Rezultati pokusa prikazani su u tablici. Vidljivo je da sojevi s mutiranim varijantama metil-transferaze NpmA W177A i P106A imaju jednaku MIK kao i divlji tip, tj. otpornost na kanamicin javlja se pri visokim koncentracijama antibiotika, što upućuje da mutacija nije imala veliki učinak na aktivnost enzima NpmA. Soj koji eksplicira mutant D55A pokazuje dvostruko manji MIK u odnosu na soj s divljim tipom enzima, što znači da mutacija u manjoj mjeri onemogućava potpuno djelovanje enzima NpmA. Sojevi s mutiranim varijantama metil-transferaze NpmA D30A, W107A i W197A imaju značajno smanjeni MIK, dakle otpornost se javlja pri nižim koncentracijama antibiotika, što svjedoči o važnosti ovih aminokiselina za aktivnost metil-transferaze NpmA. Dobiveni rezultati u skladu su s rezultatima metilacijskog testa.

Tablica 4.4.1. Minimalne inhibitorne koncentracije kanamicina za pojedine bakterijske sojeve *E. coli* BL21(DE3)pLysS koji ekspliciraju metil-transferazu NpmA.

Bakterijski soj <i>E. coli</i> BL21 (DE3)pLysS/ pET-25b(+)- <i>npmA</i>	Minimalna inhibitorna koncentracija kanamicina / $\mu\text{L}/\text{mL}$
wt	1024
D30A	8
D55A	512
P106A	1024
W107A	8
W177A	1024
W197A	8

Za aminokiseline D30 i D55 je na temelju usporedbe sa srodnim enzimima iz porodice Kam pretpostavljeno da sudjeluju u vezanju kofaktora S-adenozil-metionina, za evolucijski očuvane aminokiseline P106 i W107 je predviđena uloga u ostvarivanju interakcija s ciljnim adeninom te katalizi, dok je za W177 i W197 je pretpostavljeno da vežu RNA-supstrat.

Rezultati dobiveni ovim radom pokazuju da mutacija aspartata na položaju 33 uzrokuje značajno smanjenje aktivnosti enzima vjerojatno onemogućavanjem stvaranja interakcija između enzima i kofaktora. Mutacija aminokiseline D55 u manjoj mjeri utječe na aktivnost enzima NpmA, što znači da D55 nema ključnu ulogu u ostvarivanju interakcija sa supstratom. Mutacijom prolina na položaju 106 i triptofana na položaju 197 sprečava se kontakt između ciljnog adenina što je preduvjet za uspješnu katalizu. Ostale mutacije, premda provedene na evolucijski očuvanim aminokiselinama, nemaju tako izražen utjecaj na aktivnost enzima, što znači da nisu ključne za katalitički korak, odnosno ne ostvaruju ključne interakcije s kofaktorom, odnosno supstratom. Pri tome je triptofan na položaju 177 vjerojatno važan za ostvarivanje strukturne stabilnosti enzima jer se njegovom mutacijom značajno smanjuje razina ekspresije pripadnog proteina.

5 RASPRAVA

Pojava otpornosti bakterija na antibiotike uvelike ograničava naše mogućnosti liječenja zaraznih bolesti i danas predstavlja globalni problem. Iako je od početka antibiotske ere bilo jasno da se bakterije prilagođavaju okolini i stječu otpornost na antibiotike koji se široko upotrebljavaju, tijekom šezdesetih i sedamdesetih godina prošlog stoljeća vladao je optimizam i mišljenje da će problem rezistencije biti nadvladan otkrićem velikog broja antibiotika. Nažalost, danas je poznato da su mogućnosti djelovanja na bakterijsku stanicu već uvelike iskorištene i da se teško dolazi do antibiotika koji na potpuno novi način uništavaju bakterije. Problemu otpornosti bakterija na antibiotike treba pristupiti multidisciplinarno i dugoročno, prateći dinamiku mijenjanja bakterija, te saznanja o primjeni postojećih ili eventualno novih antibiotika.

Razumijevanje mehanizama koji sudjeluju u nastanku otpornosti na antibiotike je važno za njihovu razboritu primjenu u kliničkoj praksi, kao i za razvoj inhibitora ovih enzima te novih antibakterijskih lijekova koji zaobilaze te mehanizme otpornosti (Rang i sur., 2006).

Bakterije su razvile brojne načine rezistencije na djelovanje aminoglikozidnih antibiotika. Jedan od tih načina je metilacija ciljnog mjesta djelovanja - specifičnih baza u 16S rRNA, čime se onemogućava vezanje aminoglikozida na rRNA. Ta metilacija se odvija putem 16S rRNA metil-transferaza, enzima koji su prvi puta otkriveni u prirodnim proizvođačima iz rodova *Streptomyces* i *Micromonospora*. Do danas su otkrivena dva mjesta djelovanja takvih metil-transferaza: N7 gvanina na položaju 1405 i N1 adenina na položaju 1408. Metil-transferaze koje metiliraju G1405 mjesto pripadaju porodici 'Arm', dok one koje djeluju na A1408 mjesto pripadaju porodici 'Kam'. Do nedavno, sve pronađene 16S rRNA metil-transferaze u patogenim bakterijama bile su iz porodice Arm te modificirale nukleotid G1405. Tek nedavno pronađen je enzim NpmA, prva 16 rRNA metil-transferaza izolirana iz kliničkog soja koja djeluje na nukleotid A1408. Posredovana je plazmidom i pruža rezistenciju na široki spektar aminoglikozida.

Za predmet opisanog istraživanja odabrana je metil-transferaza NpmA izolirana iz soja *Escherichia coli* ARS3. Cilj istraživanja bio je odrediti kako zamjena pojedinih aminokiselina u proteinu utječe na aktivnost metil-transferaze NpmA. Analizirani su divlji tip metil-transferaze NpmA i mutirane varijante D30A, D55A, W107A, W177A, W197 i P106A.

Soj *E. coli* BL21(DE3)pLysS transformiran je ekspresijskim vektorom pET-25b(+)-*npmA*-His te je ekspresija proteina inducirana dodatkom IPTG. Ekspresijski soj *E. coli* BL21(DE3)pLysS sadrži kromosomsku kopiju gena za T7 RNA-polimerazu pod kontrolom promotora *lacUV* i plazmid pLysS koji kodira za lizozim, prirodni inhibitor T7 RNA polimeraze, te tako sprječava neželjenu ekspresiju prije indukcije.

Za povećanu ekspresiju metil-transferaze NpmA odabran je ekspresijski sustav pET, proširena i obogaćena inačica prvotnog sustava T7 (Studier i sur., 1990). pET serija vektora omogućuje regulaciju ekspresije stranih gena pomoću bakteriofagne T7 RNA-polimeraze (pET System Manual, 2006). Ciljni geni klonirani u pET plazmidima pod kontrolom su transkripcijskih i translacijskih signala bakteriofaga T7. T7 RNA-polimeraza je toliko selektivna i aktivna da kada je inducirana u potpunosti, gotovo svi stanični resursi postanu usmjereni u ekspresiju ciljnog gena. Iako je ovaj sustav jako učinkovit, moguće je sniziti razinu ekspresije jednostavnim smanjenjem koncentracije induktora. Općenito se razina ekspresije može povećati povećanjem temperature, povećanjem duljine trajanja ekspresije, dodatkom veće količine induktora, te odabirom prikladnije starosti bakterijske kulture. Smanjenje razine ekspresije može povećati topljivost produkta nekih ciljnih proteina .

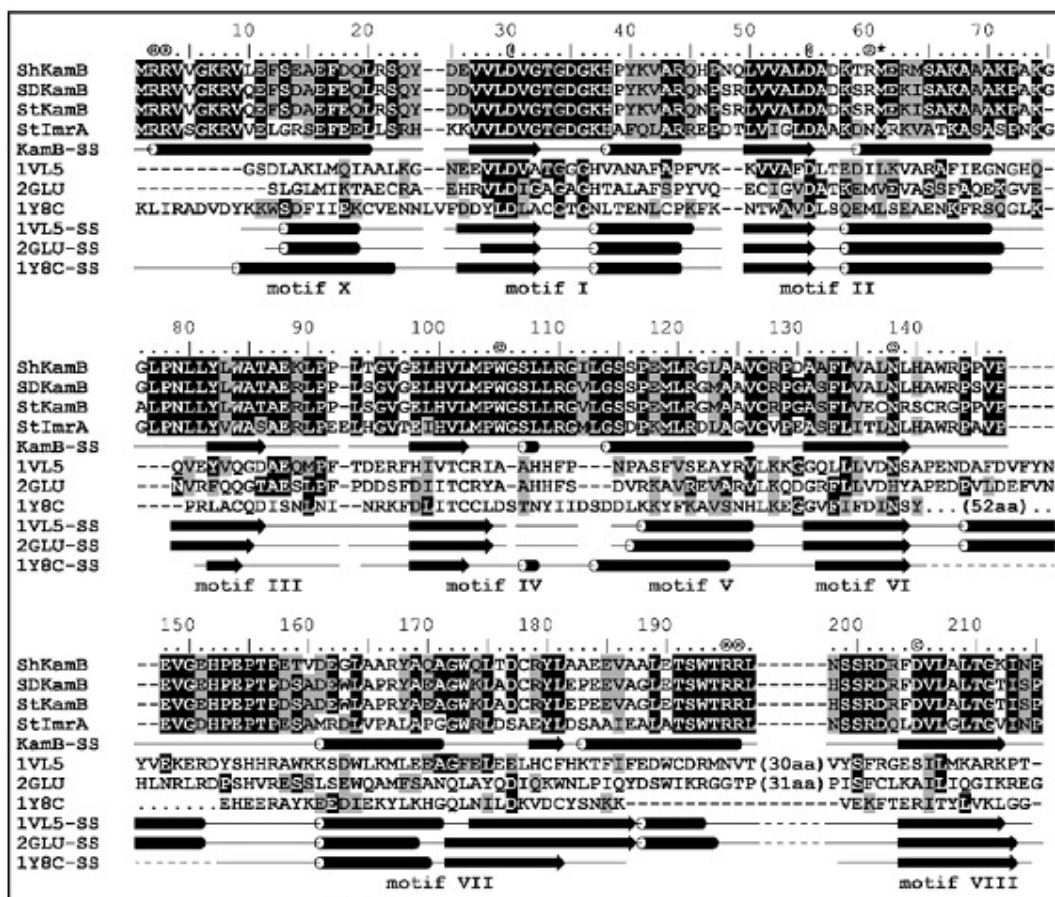
Sustav pET omogućava nakupljanje ciljnog proteina u vrlo velikim količinama, tako da strani protein čini čak do 50% ukupnih proteina stanice. Posljedica povećane ekspresije često je stvaranje inkluzijskih tijela unutar bakterijske stanice. Inkluzijska su tijela netopljivi agregati nepravilno smotanih molekula proteina i mogu sadržavati i do 95% ciljnog proteina. Uzrokom stvaranja inkluzijskih tijela može biti nedovoljna količina šaperona, proteina koji pomažu stvaranje pravilne konformacije proteina, jer se ciljni protein proizvodi prebrzo i u prevelikom količinama.

Optimalna ekspresija proteina NpmA postignuta je indukcijom na 37°C pri koncentraciji induktora IPTG od 1 mM u kulturi kojoj OD₆₀₀ iznosi 0,6 do 0,8. Tako dobiven protein NpmA nalazi se sav u topljivom obliku, a najveća količina proteina NpmA dobiva se 3 sata nakon početka indukcije.

Sljedeći korak bio je pročišćavanje proteinskog ekstrakta i izolacija čistog proteina. Rekombinantna metil-transferaza NpmA sadrži šest histidinskih oznaka na N- kraju, pa sukladno tome ima veliki afinitet vezanja na kromatografske kolone s niklom. Odabran je kromatografski materijal Ni-NTA Agarose kod kojeg nitril-octena kiselina veže ion nikla s nosačem. Protok je omogućen gravitacijskim silama i ne zahtijeva uporabu dodatne opreme. Dobiveni rezultati pokazali su da ovaj kromatografski materijal specifično i s velikim afinitetom veže protein NpmA. Detekcija proteina NpmA provedena je metodom elektroforeze na poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE). Protein se detektira kao vrpca na 25.6 kDa. Aktivnost enzima određena je metodom metilacije *in vitro*. U ovom je pokusu određena aktivnost divljeg tipa i mutiranih varijanti metil-transferaze NpmA na ribosomskim podjedinicama 30S, kao jedinom supstratu za koji je pokazana uspješna metilacija *in vitro* (Wachino i sur., 2007). Donor metilne skupine u enzimskoj reakciji je S-adenozil-metionin koji prelazi u S-adenozil-homocistein, čija se koncentracija određuje. Manja koncentracija SAH u uzorku dokaz je smanjene aktivnosti enzima metil-transferaze NpmA. Najmanju aktivnost u odnosu na divlji tip enzima pokazuju mutirane varijante D30A, W107A i W197A. Aktivnost mutiranih varijanti metil-transferaze NpmA W177A i P106A nije značajno smanjena u odnosu na divlji tip enzima. Određene su minimalne inhibitorne koncentracije kanamicina za soj divljeg tipa i sojeve s pojedinim mutiranim varijantama metil-transferaze NpmA da bi se odredila razina novostečene otpornosti. Bakterijske stanice uzgajane su pri različitim koncentracijama kanamicina, a MIK se očitava kao najmanja koncentracija antibiotika pri kojoj nije došlo do bakterijskog rasta, odnosno zamućenja. Rezultati pokazuju da se u sojevima mutiranih varijanti metil-transferaze NpmA D30A, W107A i W197A otpornost javlja pri nižim koncentracijama antibiotika, dok se u sojevima divljeg tipa i mutiranih varijanti metil-transferaze NpmA otpornost javlja pri visokim koncentracijama antibiotika.

Dobivene minimalne inhibitorne koncentracije potvrđuju rezultate metilacijskog testa *in vitro* o smanjenoj aktivnosti mutiranih varijanti metil-transferaze NpmA D30A, W107A i W197A.

NpmA je 16S rRNA metil-transferaza iz porodice Kam te po slijedu aminokiselina pokazuje značajnu sličnost s ostalim pripadnicima ove skupine enzima, koji su mahom izolirani iz bakterija koje proizvode antibiotike. Aminokiseline ispitane u ovom radu izabrane su na temelju evolucijske očuvanosti i njihove moguće uloge pretpostavljene na temelju usporedbi s ostalim enzimima iz porodice Kam.



Slika 5.1. Višestruko sravnjenje aminokiselinskih sljedova enzima iz porodice Kam. Naznačeni su evolucijski očuvani motivi karakteristični za SAM-ovisne metil-transferaze te predviđeni elementi sekundarne strukture (valjak predstavlja α -uzvojnica, a strelica β -nabranu ploču). Preuzeto iz (Koscinski i sur., 2007)

Slika 5.1. prikazuje višestruko sravnjenje aminokiselinskih sljedova različitih enzima Kam uz naznačene predviđene dijelove sekundarne strukture i očuvane motive karakteristične za SAM-ovisne metil-transferaze (Koscinski i sur., 2007). Aminokiseline D33 i D55 dio su motiva I i II koji su važni za prepoznavanje kofaktora S-adenozil-metionina. Aminokiseline P106 i W107 nalaze se unutar motiva IV te je predviđeno da zajedno s aminokiselinama W177 unutar motiva VII i W197 unutar motiva VII ostvaruju interakcije s ciljnim adeninom te sudjeluju u katalizi.

Rezultati pokazuju da niti jedna od od mutacija ne dokida potpuno aktivnost enzima, što dovodi do zaključka da ispitane aminokiseline nisu nezamjenjive. Aminokiseline D33, W107 i W197 imaju važnu ulogu za aktivnost metil-transferaze NpmA jer se njihovom mutacijom značajno smanjuje razina metilacije ribosoma i minimalna inhibitorna koncentracija kanamicina. Time potvrđujemo da mutacija aspartata na položaju 33 vjerojatno onemogućava stvaranje interakcija između enzima i kofaktora. Također možemo potvrditi predviđanje da se mutacijom triptofana na položajima 107 i 197 sprečava kontakt između ciljnog adenina što je preduvjet za uspješnu katalizu. Mutacija aminokiseline D55 u manjoj mjeri utječe na aktivnost enzima NpmA, što znači da D55 nema ključnu ulogu u ostvarivanju interakcija sa supstratom. Aminokiselina W177 vjerojatno ima ulogu u održavanju strukturne stabilnosti enzima jer se njenom mutacijom značajno smanjuje razina ekspresije pripadnog proteina. Usprkos tome mutacija W177A, kao ni mutacija P106A nisu osjetno djelovale na aktivnost enzima usprkos tome što su evolucijski visoko očuvane. To je naznaka da se kontakti sa supstratom te reakcija katalize ostvaruju međusobnom interakcijom više aminokiselinskih ostataka pa pojedinačne mutacije ne mogu sasvim spriječiti enzimsku aktivnost.

Metil-transferaza NpmA predstavlja prijetnju učinkovitim djelovanju aminoglikozidnih antibiotika jer je pronađena u kliničkom patogenu i kodirana je genom na plazmidu pa se očekuje brzo širenje horizontalnim prijenosom. O ovom se enzimu vrlo malo zna, mehanizam djelovanja nije razjašnjen, a prostorna struktura je sasvim nepoznata.

Kako bismo se uspješno borili protiv ovog tipa rezistencije i pronašli specifične molekule koje bi spriječile djelovanje ovih enzima, nužno je poznavati sve pojedinosti reakcijskog mehanizma, a i njihove strukturne značajke. Određivanjem prostorne strukture metil-transferaze NpmAu kompleksu s kofaktorom i supstratom te antibiotika vezanih na 16S rRNA u maloj ribosomskoj podjedinici, moguće je uz složenu računalnu analizu predvidjeti kakvu bi strukturu i fizikalno-kemijska svojstva trebali imati inhibitori ovih metilaza. Pronađeni inhibitori donekle bi ublažili problem rezistencije, no ne bi ga i sasvim uklonili. Bakterije pod velikim selektivnim pritiskom zbog učestale uporabe antibiotika slijede vlastitu evoluciju i neprestano nalaze nove mehanizme otpornosti. Stoga je uz istraživanja mehanizama otpornosti potrebno i drastično smanjiti uporabu antibiotika širom svijeta te na taj način stvoriti uvjete za daljnje korištenje antibiotika, bez kojih bi današnja civilizacija i tretman infektivnih bolesti bili nezamislivi.

6 ZAKLJUČAK

Na temelju provedenih pokusa, dobivenih rezultata i rasprave može se zaključiti sljedeće:

- Transformacijom ekspresijskog soja *E. coli* BL21(DE3)pLysS vektorom pET-25b(+)-*npmA*-His uz indukciju ekspresije moguće je dobiti povećane količine pripadnog proteina NpmA.
- Afinitetna kromatografija na koloni Ni-NTA agaroze osigurava pripremu dovoljno čistog proteina za daljnja ispitivanja aktivnosti enzima.
- Metilacijskim testom *in vitro* može se pouzdano odrediti aktivnost pojedinih mutiranih varijanti metil-transferaze NpmA u odnosu na divlji tip enzima.
- Određivanjem minimalne inhibitorne koncentracije kanamicina moguće je kvantitativno odrediti razinu novostečene otpornosti bakterijskih sojeva koji ekspimiraju metil-transferazu NpmA ili njene mutirane varijante.
- Nijedna od mutacija ne dokida potpuno aktivnost enzima, što dovodi do zaključka da ispitane aminokiseline nisu nezamjenjive.
- Aminokiseline D33, W107 i W197 imaju važnu ulogu za aktivnost metil-transferaze NpmA jer se njihovom mutacijom značajno smanjuje razina metilacije ribosoma i minimalna inhibitorna koncentracija kanamicina.
- Mutacija aspartata na položaju 33 vjerojatno onemogućava stvaranje interakcija između enzima i kofaktora.
- Mutacija aminokiseline D55 u manjoj mjeri utječe na aktivnost enzima NpmA, što znači da D55 nema ključnu ulogu u ostvarivanju interakcija sa supstratom.
- Mutacijom triptofana na položajima 107 i 197 sprečava se kontakt između ciljnog adenina što je preduvjet za uspješnu katalizu.

- Aminokiselina W177 vjerojatno ima ulogu u održavanju strukturne stabilnosti enzima.
- Kontakti sa supstratom te reakcija katalize vjerojatno se ostvaruju međusobnom interakcijom više aminokiselinskih ostataka pa pojedinačne mutacije evolucijski očuvanih P106 i W177 ne mogu značajno utjecati na enzimsku aktivnost.
- Rad daje prvi uvid u moguću ulogu evolucijski očuvanih aminokiselina i temelj je za daljnja istraživanja strukture i mehanizma djelovanja NpmA nužna za prepoznavanje i oblikovanje inhibitora koji bi spriječio bakterijsku otpornost prema aminoglikozidnim antibioticima.

7 ZAHVALA

Najsrdajnije zahvaljujemo mentorici doc. dr. sc. Gordani Maravić Vlahoviček što nam je omogućila rad na Zavodu za biokemiju i molekularnu biologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i time pomogla u stjecanju prave slike znanstvenog rada. Posebno zahvaljujemo na nesebičnom prenošenju teoretskog i praktičnog znanja te na motivaciji i pozitivizmu koje je prenijela na nas!

Također zahvaljujemo asistentici Sonji Čubrilo na korisnim savjetima pri eksperimentalnoj izradi rada, njenoj strpljivosti i ljubaznosti.

Zahvaljujemo i ostalim djelatnicima Zavoda za biokemiju i molekularnu biologiju na ugodnoj atmosferi i poticajnom okruženju te svima koji su nas podržavali u ostvarivanju naših ambicija.

8 LITERATURA

1. Ambrović-Ristov A, Brozović A, Bruvo Mađarić B, Četković H, Hranilović D, Herak Bosnar M, Katušić Hećimović S, Meštrović Radan N, Slade N, Vujaklija D. Eksperimentalni sustavi. In: Metode u molekularnoj biologiji. 1.izdanje. Zagreb: Institut Ruđer Bošković; 2007. p.1-138.
2. Axis® Homocysteine EIA, Instructions for use, Axis-Shield Diagnostics Ltd.; 2006.
3. BioRad, MicroPulser™ Electroporation Apparatus Operating Instructions and Applications Guide, Catalog Number 165-2100
4. Bujnicki JM, Rychlewski L. Sequence analysis and structure prediction of aminoglycoside-resistance 16S rRNA m7G. Acta Microbiol Pol 2000;50(1):7-17.
5. Bulat M, Geber J, Lacković Z. *Medicinska farmakologija*. 2. izdanje. Zagreb: Medicinska Naklada; 2001.
6. Carter AP, Clemons WM, Brodersen DE, Morgan-Warren RJ, Wimberly BT, Ramakrishnan V. Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics. Nature 2000;407(6802):340-348.
7. Craig CR, Stitzel RE. Modern Pharmacology with Clinical Application. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2003
8. Cundliffe E. How antibiotic-producing organisms avoid suicide. Annu Rev Microbiol 1989;43:207-233.
9. Cundliffe E. Recognition sites for antibiotics within rRNA. In: Hill WE, Moore PB, Dahlberg A, Schlessinger D, Garrett RA, Warner JR, editors. The ribosome: structure, function, and evolution. Washinton D.C.: American Society for Microbiology; 1990. p.47.
10. Cundliffe E. Resistance to macrolides and lincosamides in *Streptomyces lividans* and to aminoglycosides in *Micromonospora purpurea*. Gene 1992;115(1-2):75-84.
11. Dale W. Jeremy, Park F. Simon. Molecular Genetics of Bacteria, 4th edition. John Wiley and Sons Ltd. 2004.

12. Decatur WA, Fournier MJ. rRNA modifications and and ribosome function. Trends Biochem Sci 2002;27: 344-351.
13. Demydchuk J, Oliynyk Z, Fedorenko V. Analysis of a kanamycin resistance gene (kmr) from *Streptomyces kanamyceticus* and a mutant with increased aminoglycoside resistance. J Basic Microbiol 1998;38(4):231-9.
14. Desmond S. T. Nicholl. An introduction to genetic engineering, Second edition. Cambridge University Press 2002.
15. Doi Y, Arakawa Y. 16S ribosomal RNA methylation: Emerging resistance mechanism against aminoglycosides. Clin Infect Dis 2007;45(1):88-94.
16. Doi Y, Yokoyama K, Yamane K, Wachino J, Shibata N, Yagi T, et al. Plasmid-mediated 16S rRNA methylase in *Serratia marcescens* conferring high-level resistance to aminoglycosides. Antimicrob Agents Chemother 2004;48(2):491-6.
17. Felnagle EA, Rondon MR, Berti AD, Crosby HA, Thomas MG. Identification of the biosynthetic gene cluster and an additional gene for resistance to the antituberculosis drug capreomycin. Appl Environ Microbiol 2007;73(13):4162-4170.
18. Garrett RA, Douthwaite SR, Liljas A, Matheson AT, Moore PB, Noller HF. The Ribosome: Structure, Function, Antibiotics, and Cellular Interactions. Washington DC: ASM Press; 2000.
19. Greenwood D. Antimicrobial Chemotherapy. Oxford, New York, Tokio: Oxford University Press;1995.
20. Helser TL, Dahlberg JE, Davies JE. Mechanism of kasugamycin resistance in *Escherichia coli*. Nat New Biol 1972;235(53):6-9.
21. Holmes DJ, Cundliffe E. Analysis of a ribosomal-RNA methylase gene from *Streptomyces tenebrarius* which confers resistance to gentamicin. Mol Gen Genet 1991;229(2):229-237.
22. Holmes DJ, Drocourt D, Tiraby G, Cundliffe E. Cloning of an aminoglycoside-resistance-encoding gene, kamC, from *Saccharopolyspora hirsuta*: comparison with kamB from *Streptomyces tenebrarius*. Gene 1991;102(1):19-26.

23. Husain, N., Tkaczuk, K., Tulsidas, S., Kaminska, K., Čubrilo, S., Maravić Vlahoviček, G., Bujnicki, J. and Sivaraman, J. (2010) Structural basis for the methylation of G1405 in 16S rRNA by aminoglycoside resistance methyltransferase Sgm from an antibiotic producer: A diversity of active sites in m7G methyltransferases, *Nucleic Acids Res*, in press (doi:10.1093/nar/gkq122).
24. Judd RC. Electrophoresis of peptides. *Methods Mol Biol* 1994; 32:49-57.
25. Karakašević B. *Mikrobiologija i parazitologija*. Zagreb: Medicinska knjiga;1987.
26. Kojic M, Topisirovic L, Vasiljevic B. Cloning and characterization of an aminoglycoside resistance determinant from *Micromonospora zionensis*. *J Bacteriol* 1992;174(23):7868-7872.
27. Koscinski L, Feder M, Bujnicki JM. Identification of a missing sequence and functionally important residues of 16S rRNA: m(1)A1408 methyltransferase KamB that causes bacterial resistance to aminoglycoside antibiotics. *Cell Cycle* 2007;6(10):1268-1271.
28. Kotra LP, Haddad J, Mobashery S. Aminoglycosides: perspectives on mechanisms of action and resistance and strategies to counterresistance. *Antimicrob. Agents chemother.* 2000;44:3249–3256.
29. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-685.
30. Maravić Vlahoviček G, Čubrilo S, Tkaczuk KL, Bujnicki JM. Modeling and experimental analyses reveal a two-domain structure and amino acids important for the activity of aminoglycoside resistance methyltransferase Sgm. s.l. : *Biochim Biophys Acta*. 2008. Apr;1784(4):582-90.
31. Okamoto S, Tamaru A, Nakajima C, Nishimura K, Tanaka Y, Tokuyama S, et al.. Loss of a conserved 7-methylguanosine modification in 16S rRNA confers low-level streptomycin resistance in bacteria. *Mol Microbiol* 2007;63:1096-1106.
32. pET System Manual, 11th ed., 2006, Novagen Technical Literature
33. Poole K. Aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents chemother.* 2005;49:479–487.

34. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. Farmakologija. Zagreb: Golden marketing- Tehnička knjiga; 2006.
35. Rozenski J, Crain PF, McCloskey JA. The RNA Modification Database: 1999 update. *Nucleic Acids Res* 1999; 27:196-197.
36. Schmitt E, Galimand M, Panvert M, Courvalin P, Mechulam Y. (2009) Structural bases for 16 S rRNA methylation catalyzed by ArmA and RmtB methyltransferases 388(3):570-82.
37. Skeggs PA, Holmes DJ, Cundliffe E. Cloning of aminoglycoside-resistance determinants from *Streptomyces tenebrarius* and comparison with related genes from other actinomycetes. *J Gen Microbiol* 1987;133(4):915-23.
38. Skeggs PA, Thompson J, Cundliffe E. Methylation of 16S ribosomal RNA and resistance to aminoglycoside antibiotics in clones of *Streptomyces lividans* carrying DNA from *Streptomyces tenjimariensis*. *Mol Gen Genet* 1985;200(3):415-21.
39. Sparling PF. Kasugamycin resistance: 30S ribosomal mutation with an unusual location on *Escherichia coli* chromosome. *Science* 1970;167(3914):56-58.
40. Studier FW, Rosenberg AH, Dunn JJ, Dubendorff JW. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol* 1990; 185:60-84.
41. Talaro A, Talaro KP. *Foundations in microbiology*. 4th ed. Boston, Burr Ridge, Dubuque, Madison, New York, San Francisco, St. Louis, itd. : WCB McGraw-Hill; 2002.
42. Thermo Scientific Pierce High-Performance Dialysis, Desalting and Detergent Removal Technical Handbook. Thermo Fisher Scientific Inc., 2009.
43. Thompson J, Skeggs PA, Cundliffe E. Methylation of 16S ribosomal RNA and resistance to the aminoglycoside antibiotics gentamicin and kanamycin determined by DNA from the gentamicin-producer, *Micromonospora purpurea*. *Mol Gen Genet* 1985;201(2):168-73.

44. Wachino JI, Shibayama K, Kurokawa H, Kimura K, Yamane K, Suzuki S, et al. Plasmid-mediated novel m1A1408 methyltransferase, NpmA, for 16S rRNA found in clinically isolated *Escherichia coli* resistant to structurally diverse aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:4401-4409.
45. Walsh C. *Antibiotics: actions, origins, resistance*. Washington D.C.: ASM Press; 2003
46. Xu Z, O'Farrell HC, Rife JP, Culver GM. A conserved rRNA methyltransferase regulates ribosome biogenesis. *Nat Struct Mol Biol* 2008;15(5):534-536.
47. Yamane K, Doi Y, Yokoyama K, Yagi T, Kurokawa H, Shibata N, Shibayama K, Kato H, Arakawa Y. Genetic environments of the rmtA gene in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrob. Agents chemother.* 2004;48:2069–2074.
48. Yamane K, Wachino J, Doi Y, Kurokawa H, Arakawa Y. Global spread of multiple aminoglycoside resistance genes. *Emerg Infect Dis* 2005;11(6):951-3.
49. Yokoyama K, Doi Y, Yamane K, Kurokawa H, Shibata N, Shibayama K, et al. Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *Lancet* 2003;362(9399):1888-93.
50. QIAExpressionist™, 5th Ed., 2003, Qiagen Tehnical Literature

9 SAŽETAK

Ana Jurić i Eva Kukulj

UTJECAJ MUTACIJA METIL-TRANSFERAZE NpmA NA BAKTERIJSKU REZISTENCIJU NA ANTIBIOTIKE

Aminoglikozidni antibiotici su među najkorištenijim antibioticima danas te se zbog njihove široke upotrebe sve češće javlja otpornost bakterija na njihovo djelovanje. Jedan od mehanizama otpornosti jest modifikacija ciljnog mjesta djelovanja putem 16S rRNA metil-transferaza. Taj mehanizam razvio se najprije u bakterijama koje su prirodni proizvođači antibiotika, a nedavno je nađen i u patogenim sojevima. Poznata su dva mjesta djelovanja takvih enzima: N7 gvanina na položaju 1405 i N1 adenina na položaju 1408. NpmA prva je m¹A 16S rRNA metil-transferaza izolirana iz patogenog soja *Escherichia coli* ARS3 koja metilira adenin na položaju 1408 te pruža rezistenciju na široki spektar aminoglikozidnih antibiotika.

Cilj rada je odrediti kako mutacije evolucijski očuvanih aminokiselina (D30A, D55A, P106A, W107A, F177A i W197A) utječu na aktivnost metil-transferaze NpmA i bakterijsku rezistenciju na aminoglikozidne antibiotike. Divlji tip i mutirane varijante gena za metil-transferazu NpmA prethodno su u laboratoriju klonirani u ekspresijski vektor pET-25b(+) za dobivanje dovoljne količine pripadnih proteina. Proteini su eksprimirani u soju *E. coli* BL21(DE3)pLysS uz dodatak IPTG. Pročišćavanjem bakterijskog lizata na koloni Ni-NTA agaroze dobiveni su čisti mutirani proteini za ispitivanje enzimske aktivnosti. Čistoća proteina je provjerena denaturirajućom elektroforezom u poliakrilamidnom gelu, a koncentracija utvrđena spektrofotometrijski uz pripadni ekstinkcijski koeficijent. Metilacijskim testom utvrđena je aktivnost mutanata *in vitro*, dok je u pokusima *in vivo* ispitana sposobnost ostvarivanja rezistencije u stanicama *E. coli*, koja je prirodno neotporna na kanamicin.

Rezultati pokazuju da aminokiseline D33, W107 i W197 imaju važnu ulogu za aktivnost metil-transferaze NpmA jer se njihovom mutacijom značajno smanjuje razina metilacije ribosoma i minimalna inhibitorna koncentracija

kanamicina. Mutacija aspartata na položaju 33 vjerojatno onemogućava stvaranje interakcija između enzima i kofaktora. Mutacija aminokiseline D55 u manjoj mjeri utječe na aktivnost enzima NpmA, što znači da D55 nema ključnu ulogu u ostvarivanju interakcija sa supstratom. Mutacijom triptofana na položajima 107 i 197 sprečava se kontakt između ciljnog adenina što je preduvjet za uspješnu katalizu. Aminokiselina W177 vjerojatno ima ulogu u održavanju strukturne stabilnosti enzima. Kontakti sa supstratom te reakcija katalize vjerojatno se ostvaruju međusobnom interakcijom više aminokiselinskih ostataka pa pojedinačne mutacije evolucijski očuvanih P106 i W177 ne mogu značajno utjecati na enzimsku aktivnost.

Rad daje prvi uvid u moguću ulogu evolucijski očuvanih aminokiselina i temelj je za daljnja istraživanja strukture i mehanizma djelovanja NpmA nužna za prepoznavanje i oblikovanje inhibitora koji bi spriječio bakterijsku otpornost prema aminoglikozidnim antibioticima.

Ključne riječi: aminoglikozidni antibiotici, otpornost, metil-transferaza NpmA, mutacija

10 SUMMARY

Ana Jurić i Eva Kukulj

THE EFFECT OF NpmA METHYLTRANSFERASE MUTATIONS ON BACTERIAL RESISTANCE TO ANTIBIOTICS

Aminoglycoside antibiotics are among the most frequently used antibiotics today, which inevitably leads to frequent occurrence and spread of aminoglycoside resistance. Methylation of the 30S ribosomal subunit RNA (16S rRNA) is a significant mechanism of resistance to aminoglycoside antibiotics found in both antibiotic producers and recently in pathogenic bacteria. There are two groups of methyltransferases that modify either N7 of guanine G1405 or N1 of adenine A1408. NpmA is a first reported m^1A 16S rRNA methyltransferase identified in clinically isolated *Escherichia coli* strain ARS3 and was found to confer a broad spectrum pan-aminoglycoside resistance.

The aim was to determine how mutations of evolutionary conserved amino acids (D30A, D55A, P106, W107A, F177A, and W197A) affect the activity of methyltransferase NpmA and bacterial resistance to aminoglycoside antibiotics. The wild type and mutant variants of the *npmA* gene were previously cloned into expression vector PET-25b(+). In this work proteins were expressed in *E. coli* strain BL21(DE3)pLysS with the addition of IPTG. Pure mutant proteins necessary for the enzyme activity test were obtained by purification of bacterial lysate on a Ni-NTA agarose column. Protein purity was analysed by denaturing polyacrylamide gel electrophoresis and the concentration was determined spectrophotometrically using the NpmA extinction coefficient. The activity of mutants *in vitro* was determined by methylation assay and their ability to rescue bacterial growth in the presence of kanamycin was tested *in vivo*.

The results show that amino acids D33, W107 and W197 have an important role in the activity of methyltransferase NpmA because their mutations significantly reduce both the level of ribosome methylation and the minimum inhibitory concentration of kanamycin. Mutation of aspartate at position 33 probably disables interactions between the enzyme and the cofactor. Mutation

of amino acid D55 affects the NpmA activity to a lesser extent, which suggests that D55 does not have a key role in maintaining interaction with the substrate. Mutation of tryptophan at positions 107 and 197 prevents contact between the target adenine, which is a prerequisite for successful catalysis. Amino acid W177 probably plays a role in maintaining the structural stability of the enzyme. Contacts with the substrate and the catalysis reaction are likely to be achieved by mutual interaction of multiple amino acid residues, therefore a single mutation of evolutionary conserved P106 and W177 was not sufficient to significantly affect the enzyme activity.

This work gives a first insight into possible roles of evolutionary conserved amino acids and sets the basis for further studies of the NpmA structure and mechanism of action necessary to identify and design inhibitors that would prevent bacterial resistance to aminoglycoside antibiotics.

Key words: aminoglycoside antibiotics, resistance, methyltransferase NpmA, mutation