

PRD1-viruksen vaikutus bakteerisoluihin,
jotka sisältävät antibioottivastustuskyvyn
antavan plasmidin

Pro gradu –tutkielma

Anne Nieminen

Jyväskylän yliopisto

Bio- ja ympäristötieteiden laitos

2.12.2010

Alkusanat

*Pro gradu*uni liittyvän tutkimukseni suoritin Jyväskylän yliopiston Bio- ja ympäristötieteiden laitoksella Virustutkimuksen huippuyksikössä. Ohjaajanani minua avusti tohtori Matti Jalasvuori, jonka väitöstutkimuksen osana työni oli. Olenkin kiitollinen Matille tästä mahdollisuudesta kasvaa ja oppia hänen tukemanaan.

Kiitos kuuluu myös huippuyksikön vetäjälle professori Jaana Bamfordille.

Tutkimuksena tämä on ollut suuritöisin opintojeni aikana, kuten lopputyön kuuluukin olla. Olen oppinut valtavasti tätä tehdessäni ja toteuttanut sanontaa *tekemällä oppii*. Ilman taustavoimiani, jotka ovat kirjaimellisesti antaneet voimia saada tulokset paperille, olisin jäänyt ilman sitä turhautumisen purkamiskanavaa, jona olen lähimpiäni käyttänyt ilman moitteen sanaa. Kiitoksen sanat kuuluvat siis monelle. Kiittää haluan ystävääni Martti Halmetta, jonka tuen ja avun koin hyvin tärkeäksi. Sanat eivät riitä kuvaamaan kiitollisuutta vanhemmilleni, joiden jatkuva kannustus on siivittänyt koko elämäni. Suurena osana elämäni kuuluu puolisoni Joonas Pennanen, jonka rakkaus luo kodin kaikkialle, missä yhdessä kuljemme.

Koska yliopistossa on vuosia jo vierähtänyt, olen vanhetessani oppinut läksyn, jonka uskoisin monen oppineen. Parhaiten sitä kuvaa sitaatti Orson Wellesiltä:

I am not young enough to know everything

Uteliaisuutta ja tiedonhalua vuodet eivät ole kuitenkaan vieneet, ja lopputyöni tehtyäni jatkankin oppimista nöyränä.

Tekijä: Anne Nieminen
Tutkielman nimi: PRD1-viruksen vaikutus bakteerisoluihin, jotka sisältävät antibioottivastustuskyvyn antavan plasmidin
English title: The effects of PRD1 virus on bacterial cells with plasmid-borne antibiotic resistance
Päivämäärä: 17.11.2010 **Sivumäärä:** 42+4
Laitos: Bio- ja ympäristötieteiden laitos
Oppiaine: Solubiologia
Tutkielman ohjaaja(t): Jaana Bamford ja Matti Jalasvuori

Tiivistelmä:

Antibioottiresistenssi luokitellaan ihmisen terveyden suurimmaksi uhaksi. Antibioottiresistenssi lisääntyy bakteeripopulaatiossa konjugatiivisen plasmidin sisältävien bakteerien välityksellä jopa eri bakteerilajien välillä. PRD1-virus infektoi N-, P- ja W-tyypin konjugatiivisia plasmideja kantavia bakteereja. Tämän työn tarkoituksena oli selvittää, voisiko PRD1-viruksen avulla poistaa bakteeripopulaation vastustuskyky antibiooteille. Tätä testattiin kasvattamalla antibiooteille vastustuskykyisiä bakteereja ilman virusta ja viruksen läsnä ollessa. Bakteerien kasvukäyrät mitattiin lisäksi eri kasvuolosuhteissa. Tulosten mukaan virus pudottaa populaation antibioottiresistenssin 100 %:sta jopa alle prosenttiin kymmenessä päivässä. Bakteerien kasvattaminen sekä antibiootti- että virusympäristössä muokkaa osasta bakteereja vastustuskykyisiä molemmille. Tulosten perusteella voidaan siis ehdottaa PRD1-virusta avuksi taistelussa antibioottiresistenttejä bakteereja vastaan. Viruksella voi olla potentiaalia tehostaa terveydenhoitoa ensiksi vaikuttavana hoitona, joka tuhoaa vastustuskykyisiä bakteereja, jonka jälkeen antibioottikuurilla taltutettaisiin jäljelle jääneet antibiooteille herkät bakteerit. Mahdollisuutena on myös käyttää viruksia tartuntojen ehkäisyssä.

Avainsanat: konjugaatio, plasmidi, antibioottiresistenssi, PRD1

Author: Anne Nieminen
Title of thesis: The effects of PRD1 virus on bacterial cells with plasmid-borne antibiotic resistance
Finnish title: PRD1-viruksen vaikutus bakteerisoluihin, jotka sisältävät antibioottivastustuskyvyn antavan plasmidin
Date: 17.11.2010 **Pages:** 42+4
Department: Department of Biological and Environmental science
Chair: Cell Biology
Supervisor(s): Jaana Bamford and Matti Jalasvuori

Abstract:

Bacterial resistance to antibiotics is considered to be the biggest threat to human health. Antibiotic resistance spreads among bacterial species via conjugative plasmids. Virus PRD1 infects bacteria harboring conjugative plasmids of Inc-type N, P and W. The aim of the study was to determine whether we can use PRD1 to eradicate antibiotic resistance from bacterial populations. This was done by growing plasmid-containing bacteria with or without the virus. We also measured growth curves of bacteria in different environments. As a result, the antibiotic resistance of bacterial population decreased during 10 days from 100 % to as low as below 1 % when affected by the virus. Also, selecting bacteria with both antibiotics and the virus modified some bacteria to be resistant to both of them. As a conclusion, PRD1 may be a way to fight against the spread of antibiotic resistance. This is a potential way to enhance the treatment of patients by using PRD1 first and then killing the remaining bacteria susceptible to antibiotics with antibiotics. We might have means to prevent infections, too.

Keywords: bacterial conjugation, plasmid, antibiotic resistance, PRD1

Sisällysluettelo

| | |
|--|-----------|
| ALKUSANAT | 2 |
| LYHENTEET | 6 |
| 1. JOHDANTO..... | 7 |
| 1.1. Plasmideista | 7 |
| 1.2. PRD1..... | 13 |
| 1.3. Bakteerivirukset hoitomuotona..... | 15 |
| 1.4. Tutkimuksen tarkoitus | 16 |
| 2. MATERIAALIT JA MENETELMÄT..... | 19 |
| 2.1. Bakteerikannat ja plasmidit sekä virus | 19 |
| 2.2. Viruskannan elvytys..... | 19 |
| 2.3. Evoluutiokokeet | 20 |
| 2.4. Antibioottivastustuskyvyn tarkistaminen | 21 |
| 2.5. Viivakokeet..... | 22 |
| 2.6. PCR-koe | 22 |
| 2.7. Kasvukäyrät | 23 |
| 3. TULOKSET | 24 |
| 4. TULOSTEN TARKASTELU | 33 |
| 4.1. Evoluutiokokeet | 33 |
| 4.2. Kasvukäyrät..... | 37 |
| 5. LÄHDELUETTELO..... | 42 |

Lyhenteet

AGE – agarosigeelielektroforeesi

Km – kanamysiini

LB – Luria Bertani

OriT – konjugaation aloituskohta DNA:ssa (engl. origin of transfer)

OriV – kahdentumisen aloituskohta DNA:ssa (engl. origin of vegetative replication)

PCR – polymeraasiketjureaktio (engl. polymerase chain reaction)

Tc – tetrasykliini

tDNA – siirrettävä, konjugoituva DNA

1. Johdanto

1.1. Plasmideista

Plasmidi on itsenäiseen monistumiseen kykenevä, yleensä pyöreä DNA-pätkä. Konjugoiva plasmidi pystyy lisäksi kopioimaan itseänsä toisiin bakteereihin muodostaen luovuttavan ja vastaanottavan plasmidin välille putken eli piluksen. Tämä rakenne löydettiin jo vuonna 1953 ja on ollut tutkijoiden mielenkiinnon kohde siitä lähtien (ks. yleiskatsaus de la Cruz ym., 2010). Plasmidien ominaisuudet vaihtelevat hyvin paljon; osa plasmideista voi siirtyä piluksen välityksellä jopa eukaryoottisoluihin (Bates ym., 1998), joidenkin kopiomäärä on satoja (pMS73, Meyer ym., 1982) ja toisten vain vajaa 10 (RP4, ks. yleiskatsaus Adamczyk ja Jagura-Burdzy, 2003).

Plasmidit luokitellaan usein ryhmiin sen mukaan, pystyvätkö ne lisääntymään samassa solussa samanaikaisesti. Tässä työssä käytetyt plasmidit esimerkiksi kuuluvat IncP (RP4 (Kuva 1), pLM2) ja IncN (RN3) -ryhmiin, jossa *inc* tarkoittaa yhteensopimattomuutta (engl. incompatibility) eli kaksi plasmidia, joilla on sama kahdentumisen aloituskohta *oriV* (engl. origin of vegetative replication), eivät selviä samassa solussa (ks. yleiskatsaus Novick, 1987). Tosin uudemman tutkimuksen mukaan tämä pitkään vallinnut käsitys ei olekaan aivan paikkansapitävä - Velappan ym. (2007) transfektoivat soluihin eri plasmideja, jotka kuuluivat samaan Inc-ryhmään, ja seurasivat niiden selviytymistä viiden syklin ajan valikoimalla tiettyjä plasmideja eri antibiooteilla. Kokeet osoittivat, että kilpailevien plasmidien katoaminen ei tapahtunutkaan niin voimakkaasti usean bakteerisukupolven aikana kuin olisi odotettu aiemman tiedon mukaisesti.

Koska plasmidit ovat myös rasitteeksi solulle (ks. yleiskatsaus Kües ja Stahl, 1989), on plasmidin säädeltävä kopiomääräänsä, jotta rasite ei vaikuttaisi solun selviytymiseen populaatiossa. Yleisesti tähän on kaksi tapaa - iteronin sisältävä plasmidi P1 pystyy säätelemään kahdentumisessa (engl. replication) tarvittavan proteiinin (Rep) vaikuttavuutta solussa muuttamalla sen muotoa monomeerin ja dimeerin välillä (ks. yleiskatsaus Chatteraj, 2000) tai plasmidin säätely tapahtuu antisense-RNA:n avulla (Brantl, 2004).

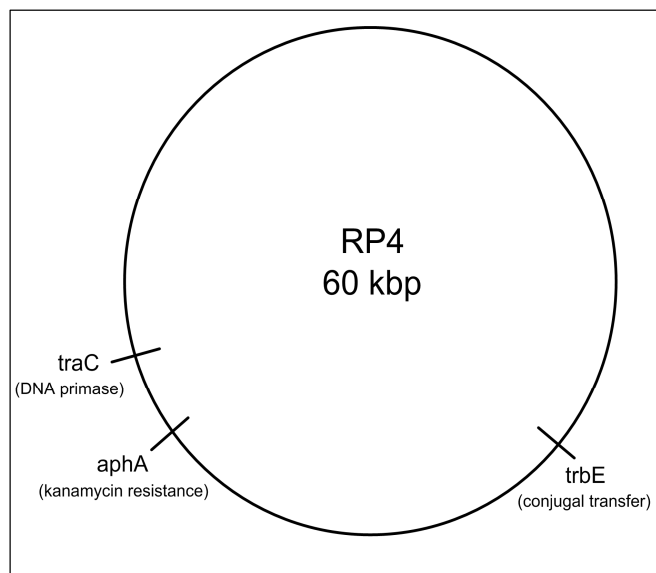
Monomeerinen Rep-proteiini aktivoi plasmidin kopioitumista, mutta dimeerinä se ei pysty sitoutumaan iteroniin, mikä vaaditaan kahdentumisen alkamiseksi. Kuitenkin dimeerimuodon kykenemättömyys aloittaa monistuminen ei ole sääteltyä niin suurella osalla kuin mitä monomeerimuodon aikaansaama sidos kahden Rep-iteroniliittymän välillä. Kun kaksi Rep-iteronidosta liittyy toisiinsa, estää se näiden plasmidien kopioimisen. Rep-proteiinia on ehdotettu sekä kahdentumisen lisääjäksi että estäjäksi, koska sillä on todettu kahdenlaista roolia DNA:n kopioinnissa (ks. yleiskatsaus Chattoraj, 2000).

Plasmideilla esiintyy myös toisenlaista säätelyä. Mm. Brantlin (2004) kuvaama antisense-RNA-säätely tapahtuu plasmidin tuottaman RNA:n avulla; antisense-RNA on täydellinen vastine jollekin plasmidin kahdentumisessa tarvittavan proteiinin lähetti-RNA:lle ehkäisten tämän lukemista proteiiniksi sitoutumalla lähetti-RNA:han. Säätely perustuu antisense-RNA:n lyhytikäisyyteen. Mitä enemmän plasmideja on, sitä enemmän on myös antisense-RNA:ta, jolloin se ehkäisee kahdentumista. Kuitenkin esim. solujakautumisen yhteydessä plasmidien lukumäärän täytyy kasvaa, jotta tuleviin tytärsoluihin saadaan kopioluvin mukainen määrä plasmideja. Antisense-RNA ei toimi pitkään, koska se hajotetaan solussa taas uudelleen käytettäväksi rakennusmateriaaliksi, kun sillä ei ole enää lähetti-RNA:a, johon tarttua. Mitoosin aikana plasmidi alkaa taas tuottaa Rep-proteiinia monistumista varten, ja plasmidi ehtii lisääntyä ennen kuin antisense-RNA estää kahdentumisen.

Dahlberg ja Chao (2003) huomasivat, että bakteerisolu ei pääse eroon konjugatiivisesta plasmidistaan, vaikka ympäristöolosuhteet eivät enää antaisikaan plasmidin sisältävälle bakteerille etua, kuten esim. antibioottiresistenttiyttä antibiootin läsnä ollessa. Sen sijaan ympäristön paineen helpottaessa sekä bakteeri että plasmidi pienensivät plasmidin aiheuttamaa haittaa bakteerille, jotta plasmidi ei heikentäisi bakteerin selviämistä populaatiossa.

RK2-plasmidin (tunnetaan myös plasmidina RP4 (Burkardt ym., 1979)) lisääntymiseen tarvittavat kompleksit on selvitetty tarkasti mm. Konieczny ja Helinskin (1997a) avulla. Nämä todensivat RK2:n tarvitsevan kahdentumisen aloittamisessa plasmidin tuottaman TrfA-proteiinin ja *E. coli*n DnaA-proteiinin liitosta. Tätä yhteistyötä tarvitaan helikaasitoiminnan sisältämän DnaB:n toimittamiseen DNA:n lähelle, jotta helikaasi pystyy erottamaan juosteet toisistaan kopioimista varten. TrfA:n kohde DNA:ssa

on kahdentumisen aloituskohdan oriV:n iteronit, joihin se sitoutuu. Sitoutuminen vaikuttaa läheisen A+T-alueen juosteiden eroamiseen tältä alueelta. DNA:n sisältämiin DnaA-laatikoihin (engl. DnaA boxes) kiinnittynyt DnaA sitoo siihen tarttuvan DnaB:n plasmidin lähelle, jolloin TrfA:n avustuksella DnaB kykenee reagoimaan yksijuosteisen DNA:n kanssa jatkaakseen kaksoisjuosteiden erottamista, jotta polymeeraasit pääsevät työhönsä plasmidin monistamisessa. Myöhemmin Konieczny ja Helinski (1997b) kirjoittivat havainnostaan, että TrfA:n ollessa yleisimmin dimeerimuodossa ClpX-kaperonia eli avustajaproteiinia tarvitaan sen aktivoimiseen iteroniin sitoutuvaan aktiiviseen monomeerimuotoon. TrfA:n yhteys *E. coli*n DnaABC-kompleksiin varmennettiin vielä mm. kromatografisin keinoin ja elektronimikroskopian avulla (Pacek ym., 2001).



Kuva 1. RP4-plasmidin riisuttu kaavakuva, josta ilmenee tutkimuksessa käytettyjen geenien sijainti.

Plasmidien selviytymistavoissa on eroja. Siddique ja Figurski (2002) todensivat mutaatiokokeiden avulla RK2-plasmidin tarvitsevan IncC-proteiinia säilyäkseen bakteeripopulaatioissa. IncC toimii solussa auttaen plasmidin jakautumisessa mitoosin aikana. IncC:llä on havaittu olevan rooli jakautumisessa tarvittavan KorB-DNA-sidoksen stabiloinnissa (Kostelidou ja Thomas, 2000). KorB toimii lisäksi *kilB*:n säätelijänä. *kilB* osallistuu plasmidin säilyttämiseen populaatioissa tappamalla solut, jotka eivät tuota plasmidin koodaamaa KorB-proteiinia (Thomson ym., 1993). Jensen ym. (1998) selvittivät

plasmidien käyttävän normaalin mitoosin kaltaista menetelmää plasmidien jakautumisessa; R1-plasmidi jakautuu käyttäen apunaan ParR- ja ParM-proteiineja, jotka sitovat kaksi plasmidi-DNA:a toisiinsa, kuten sisarkromatidit mitoosin aikana, jolloin plasmidien eriytyminen omiin tytärsoluihinsa tehostuu. RP4-plasmidin ehdotettiin käyttävän samaa menetelmää (Gerlitz ym., 1990). Soluissa DNA:n jakautumisessa muodostuvien tytärsolujen välille käytetään hyvin konservoitunutta mekanismia, jota plasmidien on ehdotettu kehittyneen hyödyntämään (Siddique ja Figurski, 2002).

Paterson ym. (1999) selvittivät IncN-plasmidien pKM101 ja pCU1 toimintaa. He todensivat, että IncN-plasmidit sisältävät konjugaatiolle välttämättömien geenien *traI*, *traJ* ja *traK* vieressä Stb-proteiineja koodittavan alueen, ja näiden huomattiin vakauttavan plasmidien läsnäolon populaatiossa erottamalla multimeerin muodostaneita plasmideja toisistaan. Stb-proteiinit toimivat vain, jos isäntäsolu kykeni yhdistämään rekombinaatiolla kaksi erilaista plasmidia, mikä ehkäisisi plasmidien jakautumista populaatiossa. Mielenkiintoista näiden IncN-plasmidien DNA:ssa on myös *fip*-geeni (*fertility inhibitor of IncP*), joka estää IncP-plasmidien lisääntymisen samassa isäntäsolussa.

IncP-plasmidin RP4 on todettu sisältävän *par*-geenialueen, jonka *parCBA*-operoni toimisi vastaavanlaisessa erottelussa kuin *stb*-proteiinit. Kyseinen operoni erottelee nimenomaan RP4-dimeerejä ja eroaa *stb*-proteiineista, jotka erottelivat heterogeenisiä plasmididimeerejä (Gerlitz ym., 1990).

Plasmideilla on siis suojana sellaisia proteiineja, jotka stabiloivat plasmidin kopiomäärää ja eriytymistä toisistaan, jos ne muodostavat multimeerejä. Toisaalta plasmideilla on myös erinäisiä keinoja varmistaa, että sellaiset solut, jotka eivät sisällä plasmidia, eivät lisäänty populaatiossa normaalisti. Gerdes ym. (1986) havaitsivat, että R1-plasmidin sisältämä *parB*-geenialue tuottaa kahta geenituotetta hok (*host killing*) ja sok (*suppressor of killing*). Jos plasmidi jostain syystä katoaa solusta, hok-toksiini tappaa solun. Plasmidin läsnä ollessa sok pelastaa solun estämällä hokin toimintaa, mutta näin ei tapahdu, jos solu on päässyt plasmidista eroon. Mini-F-plasmidi huolehtii omasta selviytymisestään *ccdA*:n ja *ccdB*:n avulla. *ccdB* estää solujakautumista väliaikaisesti, kun solun plasmidilukumäärä tippuu yhteen. Kun plasmideja on enemmän, *ccdA* ehkäisee *ccdB*:n toimintaa (Ogura ja Hiraga, 1983). Konjugatiiviset plasmidit voivat lisääntyä sekä vertikaalisesti eli solujakautumisen yhteydessä että horisontaalisesti eli siirtämällä plasmidikopion toiseen soluun. Horisontaalinen lisääntyminen tapahtuu alussa mainittujen

piluksien välityksellä. Osalla plasmideista on hyvin laaja-alainen isäntäryhmä, ja horisontaalinen geeninsiirto voikin tapahtua eri lajien välillä (ks. yleiskatsaus Saunders ym., 1999). Esimerkiksi RK2 voi käyttää isäntänä yli 30:ä bakteeria. Mielenkiintoista on, että RK2:n on todettu käyttävän eri kahdentumismekanismeja eri isännissä (Caspi ym., 2001). Kyseisessä tutkimuksessa tosin selvitettiin vain kolmessa eri isännässä tapahtuvaa lisääntymistä.

Piluksen muodostaminen luovuttavan ja vastaanottavan bakteerisolun välille vaatii sopivan vastaanottajan rekisteröinnin luovuttavassa solussa. Siirron vastaanottavaan soluun aloittaa nukleoproteiini-kompleksi relaksosomi, joka sisältää TraI- (relaksaasi), TraJ- ja TraH-proteiinit kiinnittyneinä siirrettävän plasmidi-DNA:n siirron aloituskohtaan (OriT, engl. *Origin of Transfer*) (Pansegrau ym., 1990b). TraJ:n kiinnittyminen OriT:hen mahdollistaa TraI:n sitoutumisen kompleksiin, koska TraI ei kykene sitoutumaan DNA:han yksinään. TraH:n tehtävänä vaikuttaisi olevan kompleksin stabiloiminen (Pansegrau ym., 1990a). TraI toimii endonukleaasina eli katkaisee DNA:n kaksoisjuosteen tietyistä katkaisukohtasta (engl. *nic*) OriT-alueella (*nic*-kohdan nukleotidisekvenssi RP4-plasmidilla on täysin selvitetty (Pansegrau ym., 1990b)). Tosin relaksosomin kohdalla juosteessa tapahtuu jatkuvaa katkomista ja liittämistä toisiinsa, kunnes DNA:n siirto oikeasti tapahtuu (Pansegrau ym., 1993). Tämän jälkeen TraI sitoutuu kovalenttisesti yksijuosteisen siirrettävän tDNA:n 5'-päähen (Pansegrau ym., 1990b) Tyr²²-kohdastaan eli yhdestä aminohappoketjun tyrosiinitähteestä. Relaksaasi seuraa tDNA:n siirtymistä vastaanottavaan soluun ja tunnistaessaan jälleen katkaisukohdan katalysoi fosfodiesterisidoksen muodostumista juosteen alku- ja loppupään välille todennäköisesti käyttäen TraI-tDNA-sidoksen energiaa uuden sidoksen muodostamiseen. Siirron oletetaan tapahtuvan pyörivän renkaan –mekanismilla (engl. *rolling circle*), jolloin yksijuosteinen siirrettävä DNA tehdään kaksijuosteiseksi vastaanottavassa solussa (Pansegrau ym., 1993).

Nash ym. (2010) selvittivät IncN-plasmidin pCU1 tarvitsevan relaksaasin avuksi Mn²⁺-ionien DNA:n katkaisussa ja juosteiden uudelleenliittämisessä. Myös pCU1-plasmidia tutkittaessa huomattiin, ettei relaksaasientsyymi sitoutunut spesifisti oriT:hen, vaan tarvitsee sitoutumiseen TraK-proteiinia, mikä vastaa RP4:n TraJ-proteiinia.

Tutkittaessa piluksien rakennetta eri plasmidien muodostamina huomattiin, että ne eroavat toisistaan. RP4 muodostaa jäykkiä piluskasoja poiketen näin esim. F-plasmidin erillään olevista ja taipuisista piluksista. Tämän rakenteellisen eron lisäksi Eisenbrandt ym.

(1999) havaitsivat piluksien koostuvan syklistä osista, ja että piluksen geenialue on hyvin konservoitunut. Olennaiseksi piluksen muodostamiseen osoitettiin olevan *trbC*, joka tuottaa rakennusaineena tarvittavan proteiinin esimuotoa. TraF-peptidaasi osallistuu piluksen rakennukseen pilkkomalla *trbC*-proteiinia tarvittavaan muotoon.

Välttämättömiksi parittelun (engl. mating pair formation, mpf) kannalta RP4-plasmidilla on todettu 12 proteiinia (Haase ym., 1995), mikä lisäsi määrää kuudella aikaisemmin tutkitusta (Lessl ym., 1993). Näitä koodittavat Tra1- ja Tra2-alueet. Tra1-alueesta tarvitaan edellä mainittua TraF-proteiinia, ja tämän lisäksi piluksen muodostumisessa tarvitaan 11 Tra2-alueen proteiinia TrbB, TrbC, TrbD, TrbE, TrbF, TrbG, TrbH, TrbI, TrbJ, TrbK ja TrbL. Tosin Haase ym. (1995) toteavat samassa tutkimuksessa myös, että fenotyypiltään *trbK* oli plasmidin siirrossa yhtä tehokas verrattuna villi tyyppiin, joten TrbK ei ole välttämätön siirrossa toisin kuin kaikki muut Tra2-alueen proteiinit. TrbK:n selvitettiin toimivan pilusrakenteessa eex-proteiinina (engl. entry exclusion) eli se estää muiden IncP-proteiinien pääsyn soluun vastaanottavasta solusta.

Näitä samoja proteiineja tarvitaan sekä piluksen muodostamiseen että DNA:n siirtoon. Tra1 sisältää yllämainitun relaksaasiominaisuuden lisäksi myös OriT-kohdan ja primaasigeenin. Lessl ym. (1992) olivat jo aiemmin ehdottaneet, että siirtoon tarvitaan molempia alueita, koska pelkän Tra2-alueen sisältämä plasmidi vältti siirron vastaanottavaan soluun. He selvittivät, että plasmidin siirto voidaan toteuttaa myös *trans*-tyyppisesti eli nämä kaksi siirtoaluetta voidaan kloonata kahteen eri plasmidiin säilyttäen toiminta. *kilB*-operonin on ehdotettu ulottuvan Tra2-alueelle ja sen säätelijä toimisi siis sekä kahdentumisessa (ks. yllä) että konjugaatiossa. Samassa yhteydessä tutkijat raportoivat operonin ensimmäisen geenin *kilA*:n olevan myös tarpeellinen plasmidin siirtämisessä (Thomson ym., 1993).

Kiinnostaviksi lääketieteenkin kannalta plasmidit tekee niiden kyky tehdä nopeasti bakteeripopulaatiosta antibiooteille vastustuskykyinen. Plasmidi voi muuttaa antibioottia siten, että se ei vaikuta enää bakteerisoluun, mm. tuottamalla beta-laktamaasia, joka hajottaa esim. penisilliinin sisältämän beta-laktaamirenkaan. Toiseksi se saattaa pystyä estämään lääkkeen pääsyn soluun tekemään tuhojaan, josta esimerkkinä voidaan mainita tetrasykliinivastustuskyky sekä gram-negatiivisissa että -positiivisissa soluissa. Tämän plasmidi saa aikaiseksi tuottamalla solukalvolle pumppuja, jotka siirtävät antibiootin solun ulkopuolelle. Bakteeri voi saavuttaa vastustuskyvyn myös, koska plasmidi muodostaa

lääkkeen kohteesta sellaisen, ettei lääke kykene enää siihen sitoutumaan, jolloin plasmidi voi tarjota resistenssin mm. tetrasykliiniä, kinoloneja ja trimetopriimiä vastaan (ks. yleiskatsaus Taylor ym., 2004)

1.2. PRD1

PRD1 on tyyppiesimerkki *Tectiviridae*-perheeseen kuuluvasta viruksesta (Fauquet ym., 2005). Se on bakteerivirus eli bakteerigaagi. Rakenteeltaan PRD1 on siis ikosahedraalinen membraanin sisältävä kaksijuosteinen-DNA-virus (engl. double-stranded, dsDNA), jolla on laaja-alainen isäntäryhmä. Se vaatii solulta joko P-, W- tai N-tyyppisen plasmidin, jotta se kykenisi infektoimaan solun (Olsen ym., 1974). Viruksen proteiinikuori muodostuu pseudo T=25 symmetriahiloista, joissa pääasiallisena proteiinina on trimeerinen P3-proteiini. Viruksen membraanin ja kapsidin välillä on vuorovaikutusta ja membraani osallistuu kapsidin kokoamiseen (Butcher ym., 1995).

Kokonaisuudessaan PRD1 koostuu DNA:n lisäksi 17 proteiinista ja lipidikalvosta (Mindich ym., 1982b). Näistä viruksen lisääntymisen kannalta olennaisia proteiineja on useita. P2-proteiini on välttämätön, jotta virus voisi tarttua soluun. P9-, P20- ja P22-proteiinimutanttien kohdalla havaittiin puutteellista DNA:n pakkaamista, koska virionit jäivät tyhjiksi (Mindich ym., 1982b; Strömsten ym., 2003). Saman huomasi Karhu ym. (2007) proteiinin P6 kohdalla, koska P6-puute tuotti virioneja, joista vain 5 %:a sisälsi DNA:a. Gowen ym. (2003) havaitsivat, että yksi proteiinin piikkikomplekseista on ainutlaatuinen (engl. unique vertex), koska se oli ainoa, joka sisälsi proteiinit P6, P11 ja P20. Viruspartikkeleita ei syntynyt lainkaan, jos virus kärsi mutaatiosta P1-, P3-, P8-, P10- ja P17-proteiineja koodittavissa geneeissä. P11-proteiinin puutteen huomattiin aiheuttavan virionimäärän pienenemistä sekä osaksi tyhjiä virioneja (Mindich ym., 1982b). Mindich ym. (1982a) luokittelivat myös viruksen lisääntymissyklin vaiheita viruksen proteiinien osalta hyvin aikaisten, keskiaikaisten ja myöhäisten ryhmiin (engl. classes of very early, middle early, late), jolloin esim. DNA-synteesiin vaikuttava P1-proteiini määritettiin hyvin aikaiset -luokkaan kuuluvaksi. Yllä mainittujen lisäksi piikkiproteiinit P5 ja P2 ovat kiinnittyneenä P31-proteiinista muodostuneeseen jalustaan, joka kytkeytyy P3-proteiiniin sekä membraanin P16-proteiiniin (ks. yleiskatsaus Abrescia, 2004). PRD1 käyttääkin membraaniaan työntäessään genominsa isäntäsoluun. Pieni kapsidiproteiini P30 vakauttaa

kapsidin muodostumista ja on täten tarpeellinen virionin muodostuksessa (Rydman ym., 2001).

Kuten edellä on kerrottu, P2-proteiini on välttämätön viruksen adsorptioon. Grahn ym. (1999) selvittivät P2:n roolia kiinnittymisessä. Yhteen solun reseptoriin liittyy keskimäärin yksi P2-molekyyli, joka on myös kiinnittyneenä membraaniin, ja tämä sidos reseptorin kanssa on peruuttamaton. Tosin peruuttamaton sitoutuminen reseptoriin ei välttämättä johdu juuri P2:n kiinnittymisestä, vaan jostain vielä selvittämättömästä vuorovaikutuksesta (Grahn ym. 2002). Kiinnittyminen todennäköisesti aktivoi DNA:n siirron soluun, ja P2:n on huomattu stabiloivan DNA:n siirtoa, koska P2-puutteelliset virionit saattavat vapauttaa DNA:n ilman reseptoria (Grahn ym. 1999). Kiinnittymisen jälkeen P11 läpäisee isäntäsolun ulkoisen membraanin ja mahdollistaa siten P7-proteiinin vuorovaikutuksen soluseinän peptidoglykaanikerroksen kanssa (Grahn ym., 2002). Rydman ja Bamford (2000) raportoivat P7 proteiinin soluseinää hajottavan lyyttisen ominaisuuden ja ehdottivat geenin olevan peräisin jostain aikaisemmasta isäntäsolusta. Selvittämättä jäi kuitenkin, kuinka virus läpäisee bakteerisolun solukalvon. DNA työntyy soluun P14-, P18- ja P32-proteiinien avustuksella, ja tähän on arvioitu käytettävän viruksen pakkauksessa syntyntä energiaa (Grahn ym., 2002). Rydman ym. (1999) havaitsivat muista viruksista poikkeavan ominaisuuden PRD1:ssa, mikä ansiosta viruksen jokaisella piikkikompleksilla on infektiokyky yhden siihen tarkoitettun reseptoriin kiinnittyvän kompleksin sijasta. Tosin Gowen ym. (2003) totesivat elektronimikroskopian avulla yhden piikkikomplekseista olevan erilainen ja ehdottivat ainoastaan tämän toimivan DNA:n siirrossa soluun, kuten myös DNA:n pakkaamisessa kapsidin sisään. Muut 11 piikkikompleksia toimisivat siis reseptorin tunnistuksessa, mutta PRD1 pyörähtäisi siten, että ainutlaatuinen kompleksi kohtaisi reseptorin, jonka jälkeen virus pystyisi aloittamaan DNA:n siirron bakteerisoluun (myös Strömsten ym., 2003).

Isäntäbakteerilta PRD1 vaatii sopivan plasmidin. Lessl ym. (1993) raportoivat viruksen tarpeet infektoidakseen RP4-plasmidin sisältävän bakteerin – välttämättömiä plasmidin geenejä ovat hyvin useat plasmidin siirrossakin käytettävät geenit (ks. yllä) eli TraF Tra1-alueelta (myös Waters ym., 1992) ja kaikki Tra2-alueen geenituotteet. Tarkennuksena tähän Haase ym. (1995) havaitsivat *trbK*:n olevan välttämätön viruksen lisääntymiselle, mutta PRD1:n reseptorikompleksiin sitä ei tarvittu, koska virus kykeni tarttumaan soluun, vaikka plasmidi sisälsi mutaation *trbK*:ssa. Tämä on luontevaa, koska

sama mutaatio ei vaikuta plasmidin konjugatiiviseen siirtoon eikä siis plasmidin parittelukompleksin (viruksen reseptorikompleksi) muodostamiseen. Grahn ym. (1997) totesivat, että PRD1-vastustuskykyiset bakteerit ovat myös kykenemättömiä konjugaatioon, ja että tämä johtuu DNA-poistoista ja –lisäyksistä 11 kompleksigeenin alueella.

IncN-ryhmän tyyppiplasmidissa pCU1 (Iyer, 1989) vastaavanlaista fenotyyppiä kuin *TrbK* edustaa *kikA*⁻ (*killing of Klebsiella*) (Holčik ja Iyer, 1996). Tutkimuksessaan he huomasivat *kikA*:n olevan olennainen PRD1:n siirtymiseen solun sisälle, kun taas kyseisellä proteiinilla ei ollut merkitystä toisen bakteeriviruksen viruksen IKE infektiioon (myös Thatte ym., 1985). Tämä mutaatio geenissä ei kuitenkaan vaikuttanut plasmidin konjugaatioon eli tämä plasmidi voi olla PRD1-resistentti, mutta pystyy muodostamaan toimivan siirtokompleksin, jota IKE hyväksikäyttää soluun siirtymiseen (Holčik ja Iyer, 1996). Kuitenkin viruksen tarttumiseen vaikuttaa myös isäntäsolu plasmidin lisäksi. *Salmonella typhimurium* (RP1) tuottaa pintarakenteisiinsa n. 50 PRD1-reseptoria, kun taas *E. coli*lla (RP1) vastaavasti esiintyy vain 20 reseptoria (Kotilainen ym., 1993).

Bamford (2003) tekee yhteenvetoa artikkelissaan virusten evoluutiosta. Tässä hän alleviivaa yhtäläisyyksiä eri biologisten kuntien virusten välillä, kuten bakteerien PRD1-viruksen ja ihmisen adenoviruksen välillä. Virusten vaikutus solujen evoluutioon saa yhä vankempaa tutkimustietoa taakseen, minkä vuoksi solujen ja virusten rinnakkainen evoluutio aiheuttaa mielenkiinnon heräämistä.

1.3. Bakteerivirukset hoitomuotona

Bakteerivirukset eli faagit on tunnettu jo 1800-luvun lopulta, jolloin Ernest Hankin ensimmäistä kertaa raportoi tuntemattoman aineen rajoittavan Intian *Vibrio cholerae* -bakteerin aiheuttamaa koleraepidemiaa. Vaikuttava aine löydettiin jokivedestä, jonka huomattiin tappavan bakteerisoluja. Frederick Twort ehdotti bakteerien tappajan olevan virus vuonna 1915, mutta varsinaisesti virusten nimeämisen bakteerifaageiksi ja ensimmäisten kliinisten kokeiden takana oli Felix D'Herelle, joka tutki jo vuonna 1919 suun kautta otettavan virusvalmisteen vaikutusta punatautiin (ks. yleiskatsaukset Sulakvelidze ym., 2001; O'Flaherty ym., 2009). Hoidettu potilas, 12-vuotias poika, parani taudistaan jo muutamassa päivässä, ja seuraavat hoidetut potilaat tervehtyivät huomattavasti jo vuorokauden aikana. Faageilla parannettiin myös bakteerien aiheuttamia

ihotauteja, jolloin tulehtuneelle iholle ja suoraan avohaavoille laitettiin virusliuosta. Nämäkin kokeet antoivat hyviä tuloksia. Tuloksia kuitenkin kyseenalaistettiin ja epäilijät eivät uskoneet aineen virusmuotoa, vaan ehdottivat entsyymiä, jolloin antibioottien löytymisen jälkeen kiinnostus bakteeriviruksiin lopahti varsinkin länsimaissa (ks. yleiskatsaus Sulakvelidze ym., 2001).

Etenkin Puolassa faagien vaikutusten tutkiminen jatkui ja viruksia annettiin potilaille suun kautta, suoraan haavoille tai elimiin, kuten silmiin ja korviin. Varsinaisesti faageilla hoidettiin potilaita, joita antibiootit eivät auttaneet. Tutkimuksissa havaittiin bakteerien muuttumista vastustuskykyisiksi bakteeriviruksia kohtaan, mutta tällöin hoidoksi vaihdettiin toinen faagi. Varsinkin antibioottiresistenttien sairauksien hoidossa huomattiin faagien vaikutus (ks. yleiskatsaus O'Flaherty ym., 2009), ja uusimpien tutkimusten joukossa on Weber-Dabrowskan ym. (2001) suorittama koe, jossa antibiooteille vastustuskykyiseen tulehdukseen sairastuneille syöpäpotilaille annettiin useita kertoja päivässä faageja, jolloin kaikki potilaat paranivat tulehduksesta seuraavien viikkojen aikana.

Ongelmana tässä syöpätutkimuksessa, kuten muissakin, oli kontrollin puute. Jo D'Herelle laiminlöi kontrollien käytön, jopa eläinkokeissa (ks. yleiskatsaus O'Flaherty, 2009). Katsantoartikkelissaan Sulakvelidze ym. (2001) kuvailevat neuvostoliittolaista koetta, jossa tutkittavana oli reilu 30000 lasta. Näistä lapsista noin puolet, jotka asuivat toisella puolella katua, saivat faageja kerran viikossa ja vastakkaisella puolella katua kasvaneille lapsille ei annettu mitään. Ulostenäytteet tutkittiin viikoittain. Kontrolliryhmässä punatauti oli 380 %:a yleisempää kuin faagiryhmässä. Molempien yleiskatsauksien kirjoittajat kuitenkin kaipasivat raportoinneista kriittistä tarkastelua sen sijaan, että tulokset hyväksyttiin ilman suurempaa analyysiä. Yksimielisyyttä oli myös siitä, että bakteerivirusten käytössä on mahdollisuuksia, joita täytyy tutkia laajojen ihmiskokeiden avulla.

1.4. Tutkimuksen tarkoitus

Jos pohditaan tilannetta, että jopa 70-78 %:a *Salmonella enterica* serovar typhi – bakteereista Keniassa on useille antibiooteille vastustuskykyisiä (engl. multidrug resistant) (Kariuki ym., 2004), olisi keinosta, jolla vastustuskykyä saataisiin heikennettyä, paljon

inhimillistä hyötyä. Koska lääkkeet ovat kalliita, laajakirjoisten antibioottien käyttö voi olla kustannuskysymys etenkin köyhemmissä maissa.

PRD1 on bakteerivirus eikä siis kykene infektoimaan eläinsolua. Viruksen kasvattaminen soluviljelyissä olisi huomattavan edullista – tosin vaatisi puhtaita laboratorio-olosuhteita. Halpuuden ja helppouden vuoksi mahdollisuus käyttää virusta paremman hygienian puolesta sairaaloissa ym. olisi ihanteellista. Virus tappaisi vain bakteereja eikä vaikuttaisi ihmisen soluihin. Kuitenkin tässä tutkimuksessa selvitettiin viruksen vaikutusta mikrotasolla, joten viruksen vaikutus ihmiskehossa saattaisi aiheuttaa arvaamattomia seurauksia. Lääkekäytössä viruksella olisi valtava potentiaali, mutta vaikutus elimistöä suojaavaan suoliston bakteeriflooraan olisi tutkittava. Tosin ihmiskokeitakin on jo bakteeriviruksilla tehty (ks. yllä) eikä näissä ole raportoitu haittoja. Mahdollisuus antaa toivoa. Muutamia muita käytänteitä on kehitetty antibioottiresistenssin poistamiseen (ks. 4.2), joten näiden menetelmien yhdistäminen voisi tehdä hoidoista parempia ja lisätä antibioottien käyttöikä.

Sovellettavia aloja on huomattavasti. Mahdollisuuksia saattaa olla hoitomuotona tauteja aiheuttavia antibioottiresistenttejä bakteereja vastaan, mutta myös tartuntojen ehkäisyssä. Oscar ym. (2010) tutkivat kanojen ruhoista salmonellaa aiheuttavien bakteerien esiintyvyyttä ja totesivat, että reilussa puolessa ruhoista löytyi bakteeria ja näistä kolmannes oli resistenttejä ainakin yhdelle antibiootille. Myös luonnonmukaisesti kasvatetusta siipikarjasta on löydetty antibioottiresistenttejä *Salmonella*-kantoja (Melendez ym., 2010). Faagien vaikutusta siipikarjan bakteeriflooraan onkin tutkittu ja niiden on todettu vähentävän ainakin *E. coli*, *S. enterica* serovar Typhimurium ja *C. jejuni* – bakteerien määrää (ks. yleiskatsaus O’Flaherty ym., 2009).

Suomen kalankasvattamoilla käytetyistä antibiooteista arvioidaan pääsevän suoraan vesistöön jopa 75-90 %:a. Tämän seurauksena antibiooteille vastustuskykyisiä bakteereja on löydetty luonnonkaloista ja simpukoista. Allergisille ihmisille näistä luontoon päätyvistä antibiooteista ei arvioida olevan haittaa, vaikkakin pieniä pitoisuuksia antibiootteja löydetään esim. kaloista (Seppälä ym., 2001). Mahdollisuudet käyttää faageja antibioottien sijasta olisi määritettävä, jotta päästöt luontoon pienenisivät.

Antibioottiresistenssin leviäminen konjugaation avulla on pääasiallisesti ympäristön bakteereiden vastustuskyvyn lisääntymisen takana, mutta konjugaation kautta leviää myös bakteerien patogeenisii ominaisuuksia (ks. yleiskatsaus de la Cruz ja Davies, 2000).

Tällöin hyvin merkittäväksi ilmiöksi tulee Smithin ja Hugginsin (1983) huomio, että vastustuskyky bakteeriviruksia vastaan heikensi bakteerin virulenssia eli haitallisuutta. Antibiootteja käytettäessä on vaarana, että resistenttiyttä levittävä plasmidi sisältää myös isäntäsolulle haitallisempia ominaisuuksia, jolloin antibioottien laajamuotoisesta käytöstä voi seurata suurempia ongelmia. Samat herrat totesivat faagien eduksi myös sen, että faagit ovat tehokkaita vain yhdellä lisäyksellä, kun taas antibioottikuurin aikana antibioottien määrän tulisi pysytellä koko ajan korkealla, jolloin antibiootteja tulee antaa säännöllisesti. Muutama vuosi myöhemmin Smith ym. (1987) huomasivat faagien estävän sairauksia jo siten, että niitä suihkutetaan aerosolina ympäristöön tai jopa vain siirtämällä hoitamaton karjaa huoneeseen, jossa aiemmin olleiden nautojen tartuntoja oli hoidettu bakteeriviruksilla.

Jo yksinään soluviljelylaboratorioissa olisi tarve antibioottiresistenttien bakteerikantojen hävittämiseen. Resistenttien bakteerikantojen pilaamasta viljelmästä voi olla hyvinkin hankala valita vain halutut bakteerit – varsinkin, jos resistentit bakteerit pystyvät siirtämään haluttuihin bakteereihin ei-haluttuja ominaisuuksia. Työssä tutkittu PRD1-virus vähentäisi huomattavan helposti resistenttien bakteerien määrää. Virukselle vastustuskykyiset bakteerit eivät kykene konjugaatioon, kuten yllä huomattiin vastustuskykyisiä kantoja tutkittaessa, joten kenties viruksella olisi mahdollista poistaa ainakin antibioottiresistenssin leviäminen horisontaalisen kahdentumisen välityksellä.

Työssä tarkoituksena olikin selvittää, kuinka kyseinen faagi vaikuttaa antibioottiresistentissä bakteeripopulaatiossa, ja voitaisiinko virusta jatkossa käyttää taistelussa antibioottivastustuskykyä vastaan. Tämä on entistä tärkeämpää, koska jatkuva antibioottien käyttö on suorittanut valintaa ympäristössä, ja yhdysvaltalainen Centers for Disease Control and Prevention onkin esittänyt antibioottiresistenttiyden lisääntymisen suurimmaksi uhaksi ihmisten terveyttä kohtaan (Nash ym., 2010).

2. Materiaalit ja menetelmät

2.1. Bakterikannat ja plasmidit sekä virus

Käytetyt bakterikannat ovat lueteltuna Taulukossa 1, kuten myös käytössä olleet plasmidit. Tutkimuksessa käytettävä PRD1-viruskanta elvytettiin vanhasta viruskannasta, jonka virustiheys oli $4,4 * 10^{12}$ virusta millilitrassa.

Taulukko 1. Käytetyt bakterikannat ja plasmidit.

| Bakteeri | Kanta |
|---|--------|
| <i>Escherichia coli</i> K12 | HMS174 |
| <i>Escherichia coli</i> K12 | JE2571 |
| <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium | DS88 |
| <i>Serratia marcescens</i> | DB11 |

| Plasmidi | Inc-ryhmä (Lähde) |
|----------|---|
| RN3 | IncN (Datta N. ja Hedges R. W. 1971. Compatibility groups among fi-R-factors. Nature. 234: 222-223) |
| RP4 | IncP (Datta, N., R. W. Hedges, E. J. Shaw, R. B. Sykes ja M. H. Richmond. 1971. Properties of an R factor from <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . J Bacteriol. 108: 1244-1249) |
| pLM2 | IncP (Mindich, L., J. Cohen ja M. Weisburd. 1976. Isolation of nonsense suppressor mutants in <i>Pseudomonas</i> . J Bacteriol. 126: 177-182) |

2.2. Viruskannan elvytys

Viruskanta elvytettiin säilötystä viruskannasta maljaamalla ravinnemaljoille 100 µl:a eri viruslaimennoksia (käytettiin laimennoksia 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , $10^{-9,5}$, 10^{-10}) sekä 200 µl:a isäntäbakteerin (tässä DS88(pLM2)) yli yön -kasvatusta ja 3 ml:a Luria Bertani –ravinneliuosta (LB), joka sisälsi 0,8 %:a agaria (soft-agar) (Sambrook ym., 1989).

Viljelmää kasvatettiin +37 °C:ssa yön yli. Jokaisesta laimennoksesta maljattiin kaksi rinnakkaista viljelmää.

Puoliksiyötyjen maljojen soft-agar-kerros siirrettiin kasvatuspulloon ja lisättiin 5 ml:a ravinneliuosta maljaa kohden. Näitä virus-bakteeriviljelmiä kasvatettiin kolme tuntia +37 °C:ssa, jonka jälkeen bakteerit tiivistettiin astian pohjalle liuoksesta sentrifugoimalla (Sorvall SS34 -roottorilla 9000 rpm 15 min +4 °C:ssa; Sorvall Instruments, RC5C). Virukset sisältävä nestefaasi otettiin talteen.

Virusliuoksen tarttuvien virusten määrä mitattiin maljaamalla 100 µl:a virusliuosta laimennoksilla 10^{-8} , 10^{-9} ja 10^{-10} sekä 200 µl:a DS88(pLM2):n yli yön -kasvatusta ja 3 ml:a LB-soft-agarliuosta. Virusten aiheuttamien plakkien määrä laskettiin maljoilta ja tuloksista pääteltiin virusliuoksen virusten lukumääräksi $5 \cdot 10^{11}$ virusta millilitrassa.

Viruskanta suodatettiin PALL Acrodisc 32 mm -suodattimella (0,8/0,2 µm Supor-membraani, lot 08-1148) bakteerien poistamiseksi. Suodatuksen jälkeen virusten lukumäärä tarkistettiin, kuten yllä. Viruskantaa säilytettiin +4 °C:ssa. Liuoksen bakteerittomuus tarkistettiin tasaisin väliajoin maljaamalla 100 µl virusliuosta LB-agar-maljalle.

2.3. Evoluutiokokeet

Evoluutiokokeessa 1 kanamysiinille (km) vastustuskykyisiä bakteereja (*Salmonella Typhimurium* DS88(pLM2) ja *Escherichia. coli* K12 JE2571(RP4)) kasvatettiin 5 ml:ssa LB-liuosta ja yön jälkeen kasvatuksesta siirrostettiin 5 µl:a uuteen LB-liuokseen. Koetta jatkettiin kymmenen päivän ajan. Kokeen aikana maljattiin viitenä päivänä kasvatuksia sekä tavalliselle LB-agarmaljalle että antibioottia sisältävälle LB-maljalle. Maljojen antibioottipitoisuudet olivat 25µg/ml (km) tai 20µg/ml (tetrasykliini, tc). Kontrollina käytettiin edellä mainittuja kasvatuksia ja bakteereista tehtiin viisi rinnakkaiskasvatusta. Kokeen viiteen rinnakkaiskasvatukseen lisättiin ensimmäisenä päivänä 5 µl:a PRD1-virusta. Kasvatuksia pidettiin ravistelussa (220 rpm) yön yli +37 °C:ssa. Maljat jätettiin vuorokaudeksi +37 °C:een.

E. coli HMS174(RN3) on vastustuskykyinen tetrasykliinille, joten vastaavat kokeet kyseisen bakteerin kanssa tehtiin käyttäen antibioottina tetrasykliiniä.

Kontrollin antibioottivastustuskyky testattiin ravinnemaljoilla kasvaneista pesäkkeistä vetämällä niistä viiva antibioottimaljalle (ks. 2.4.).

Evoluutiokoe 2 oli vastaava koe kuin evoluutiokoe 1, mutta viruslisäys tapahtuu päivittäin kymmenen päivän ajan. Käytettiin viittä rinnakkaista kontrollia ja viittä maljauspäivää.

Kolmannessa evoluutiokokeessa käytettiin kahta rinnakkaista bakteerikasvatusta (DS88(pLM2) sekä JE2571(RP4)). Antibioottiresistenttiä kasvatusta lisättiin 5 µl 5 ml:aan LB-liuosta, joka sisälsi 25 µg/ml kanamysiiniä. Kokeen kymmenenä päivänä liuksesta siirrostettiin 5 µl uuteen LB-liemeen, jonka antibioottipitoisuus oli 25 µg/ml (km). Nämä toimivat kokeessa kontrolleina ja varsinaisiin näytteisiin lisättiin myös PRD1-virusta päivittäin 5 µl:a. Maljattiin vain syklin 10 kasvatukset LB_{antibiootti}-agarmaljalle.

2.4. Antibioottivastustuskyvyn tarkistaminen

Tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää, vaikuttaako viruksen läsnäolo bakteeripopulaation antibioottivastustuskykyyn. Tätä tutkittiin vertaamalla sekä näyte- että kontrollikasvatusten bakteeripesäkkeiden lukumäärää, kun kasvatusta maljattiin sekä LB-agarmaljalle että LB_{antibiootti}-agarmaljalle. Kontrollissa laimennosta muutettiin harvemmin, koska kasvu oli tasaista, mutta virusta sisältävien näytteiden laimennokset arvioitiin valistuneella arvauksella ja näytteestä maljattiin useampia laimennoksia. Viljelmiä kasvatettiin yön yli +37 °C:ssa. Seuraavana päivänä bakteeripesäkkeiden lukumäärä laskettiin, jolloin saatiin määritettyä alkuperäisen kasvatuksen bakteeritiheys millilitrassa. Kontrollin testaamisessa käytettiin kahdenlaista menetelmää. Kaikissa kokeissa, joissa mitattiin sekä kertalisäystä että päivittäistä lisäystä, kontrollin LB-agarmaljalla kasvaneista pesäkkeistä vedettiin viiva LB_{antibiootti}-agarmaljalle. *Serratia marcescens*in sekä *E. coli* JE2571(pLM2):n kohdalla samasta laimennoksesta pipetoitiin saman verran bakteeriviljelmää molemmille maljoille.

2.5. Viivakokeet

Tutkimuksessa käytettiin kahdenlaisia viivakokeita. Ensiksi viivakokeella mitattiin viruksen tartuntakykyä bakteeriin. Tällöin ravinnemaljalle vedettiin ensin PRD1-virusliemeen kastetulla siirrostussauvalla viiva. Tämän jälkeen bakteeripesäkkeestä vedettiin poikittain viiva viruksen viivan yli, jolloin virus sai mahdollisuuden tarttua bakteeriin, jolloin bakteeri ei kasvaisi viruksen vaikutuksesta virusviivan kohdalla. Yön yli kasvattamisen jälkeen (+37 °C) tarkistettiin tartuntakyky. Tällä tavalla testattiin jokainen bakteeri, jotta ne ovat varmasti viruksen isäntäsoluja.

Toisessa viivakokeessa tarkistettiin bakteerin vastustuskyky antibiootille vetämällä bakteeripesäkkeestä viiva antibioottimaljalle. Antibioottiresistentti bakteeri aiheuttaisi bakteerikasvuston viivan kohdalle, mutta muuten kasvustoa ei tulisi lainkaan.

2.6. PCR-koe

Polymeraasiketjureaktiolla (engl. polymerase chain reaction, PCR) haluttiin testata, muuttuuko plasmidien läsnäolo bakteeripopulaatiossa. Kokeessa käytettiin JE2571(RP4):n evoluutiokoe 1:n kymmenennen päivän maljoja, jotka joko sisälsivät tai eivät sisältäneet kanamysiinia, sekä DS88(pLM2):n ja JE2571(RP4):n viimeisen tutkimuspäivän maljoja evoluutiokokeesta 3. Näytteinä tutkittiin maljojen yksittäisiä pesäkkeitä, jotka siirrettiin yöksi nestekasvatukseen (+37 °C, ravistelu 220 rpm). Kontrollina oli lisäksi yksi JE2571(RP4):n tai DS88(pLM2):n normaali yön yli –kasvatus antibioottia sisältävässä (25 µg/ml) ravintoliuoksessa, jotta varmistettiin bakteerien olevan vastustuskykyisiä. 24-kuoppalevyyn pipetoitiin 10 µl/kuoppa reaktioseosta, joka sisälsi 50 % (v/v) Phusion Master Mix Flash -reagenssia (2x, lot 7), 10 % (v/v) sekä eteenpäin-aluketta että takaperin-aluketta ja 30 % steriiliä vettä. Reaktioseokseen lisättiin näyte- ja kontrolliliemestä steriilillä siirrostussauvalla tutkittavaa bakteeria.

Alukkeina käytettiin primaasientsyymi-, *trbE*- ja kanamysiiniresistenssigeeniin suunniteltuja alukkeita (Biomers.net). (Taulukko 2)

Taulukko 2. PCR-kokeessa käytetyt alukkeet sekvensseineen.

| <i>Aluke</i> | <i>Sekvenssi</i> |
|--------------------------|--|
| primaasi eteenpäin-alue | 5'-gca tcc ttc ctt gcg gct gtcc-3' |
| primaasi taaksepäin-alue | 5'-tgc acg acg agg acc tac agcg-3' |
| trbE eteenpäin | 5'-cct gga cgc ctt cct tgg tag ttt cggc-3' |
| trbE taaksepäin | 5'-ggt cag gcc cat gcg gcg gta cagg-3' |
| kanamysiini eteenpäin | 5'-cgg tct atc ggc tgc ata gca agtc-3' |
| kanamysiini taaksepäin | 5'-caa gcc tet cct gaa gcg aag gttg-3' |

PCR suoritettiin Finnzymes Piko Thermal Cycler -laitteella. PCR-ohjelmassa juosteiden erottaminen tapahtui 98 °C:ssa, jonka jälkeen monistusreaktiota toistettiin 35 kertaa siten, että reaktiota pidettiin, 15 s 60 °C:ssa, 20 s 72 °C:ssa, 10 s 98 °C:ssa.

Ajettiin PCR-tuotteet 1 % agarosigeelielektroforeesilla (AGE): 120 V 40 min. DNA-juosteiden pituus arvioitiin vertaamalla vyöhykkeitä Fermentas GeneRuler 1 kb Plus DNAladderin vyöhykkeisiin (lot 00033159).

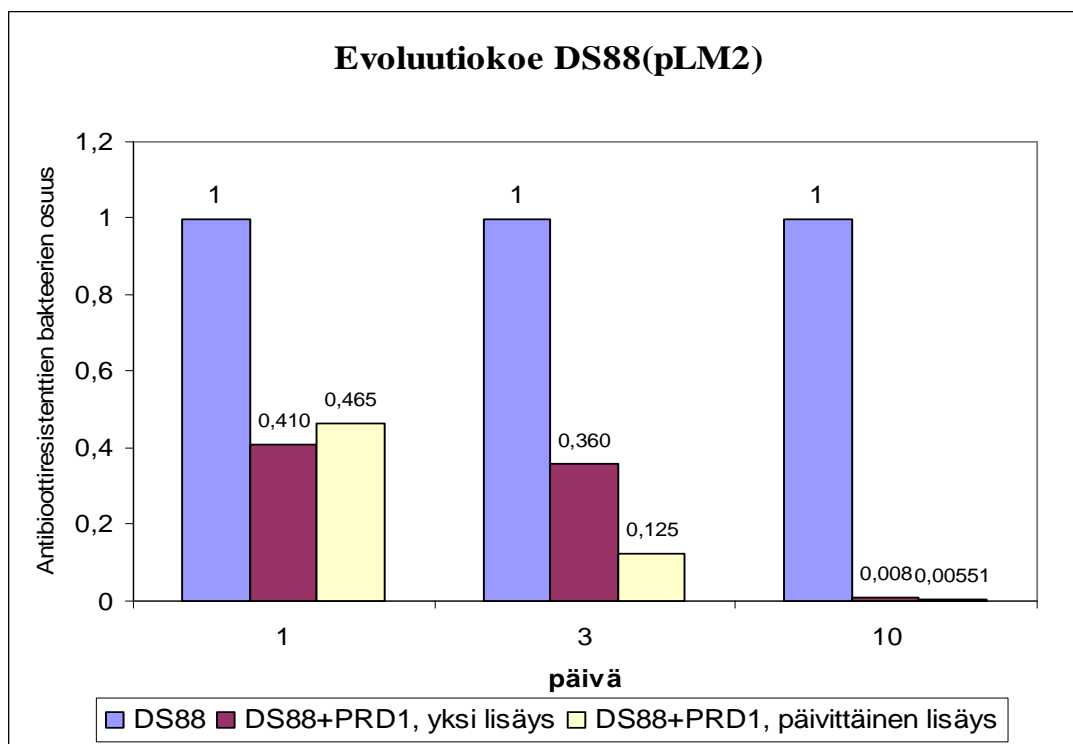
2.7. Kasvukäyrät

Bakteerikasvustoista mitattiin myös kasvukäyrät laitteella HY-Growthcurves, Bioscreen C-MBR. Bakteerien yön yli -kasvatuksista pipetoitiin 5 µl 5 ml:aan LB-liuosta kolmeen putkeen. Yhteen putkista lisättiin 5 µl virusta ja yhteen sekä virusta että antibioottia 25 µg/ml (km)/20 µg/ml (tc). Näytteitä pipetoitiin kuoppamaljalle 200 µl. Laite ravisteli jatkuvasti näytteitä ja mittasi absorbanssia välillä 405-600 nm viiden minuutin välein (kymmenen rinnakkaisnäytettä).

Samalla tavalla mitattiin myös HMS174(RN3):n kasvukäyrät, mutta tätä bakteeria testattiin useammassa ympäristössä eli myös kilpailutilanteessa plasmidittomien bakteerien kanssa, jolloin molempia bakteereja lisättiin 5 µl 5 ml:aan LB-liuosta ja seoksesta pipetoitiin kuoppamaljalle 200 µl:a.

3. Tulokset

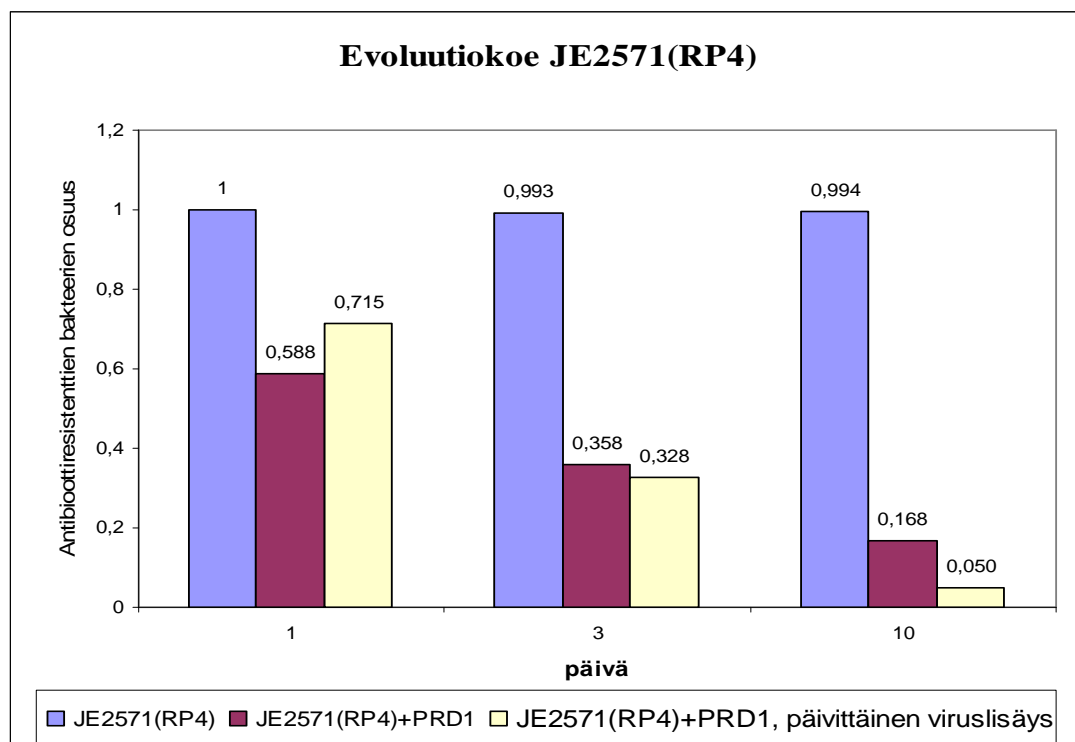
Viruksen vaikutusta soluihin testattiin, jotta saataisiin selville, laskeeko antibioottiresistenttien bakteerien joukko bakteeripopulaatiossa. Antibioottiresistenssi laski kaikissa tutkituissa bakteerikannoissa. Kontrollissa vastustuskyky säilyi lähellä 100 %:a. Sen sijaan riippumatta siitä, lisättiinkö virusta kerran vai päivittäin, vastustuskykyisten bakteerien määrä romahti jo kolmantena päivänä. Bakteerien määrä laski kymmenenteen päivään asti.



Kuva 2. PRD1-viruksen vaikutus *Salmonella enterica* DS88(pLM2) -bakteeriin.

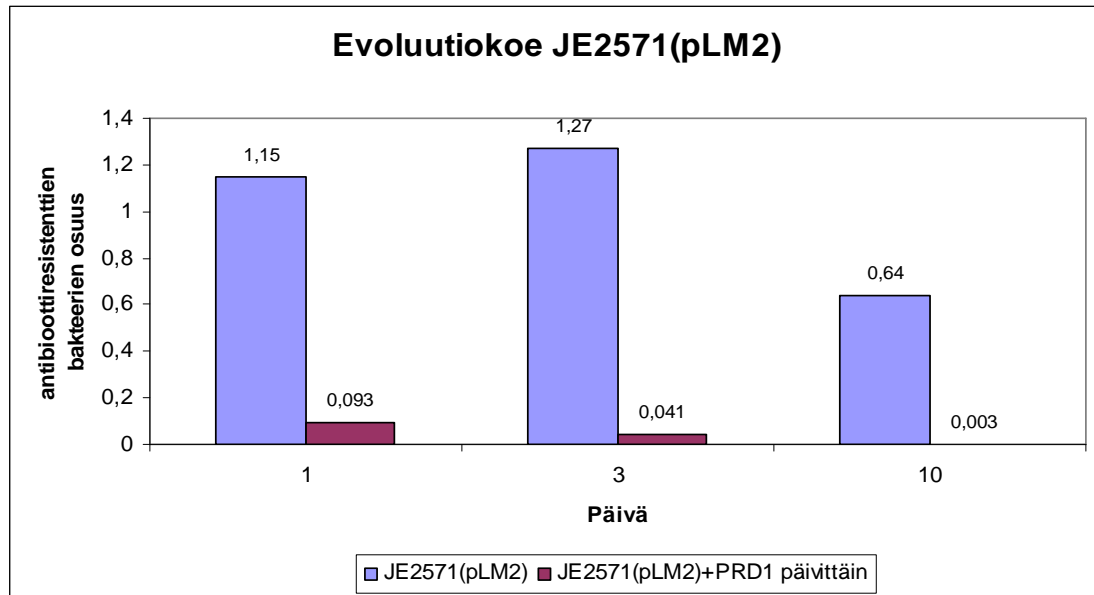
Salmonella enterica, joka sisälsi pLM2-plasmidin, reagoi PRD1-viruksen läsnäoloon siten, että resistenttiys oli lopulta viimeisenä mittauspäivänä vain 0,551 %:a (Kuva 2). Tällöinhän vain noin kuusi bakteeria tuhannesta kykeni kasvamaan antibiootin

läsnä ollessa. Vastustuskykyisiä bakteereja populaatiosta oli vajaa puolet heti ensimmäisen päivän jälkeen verrattuna kontrolliin.



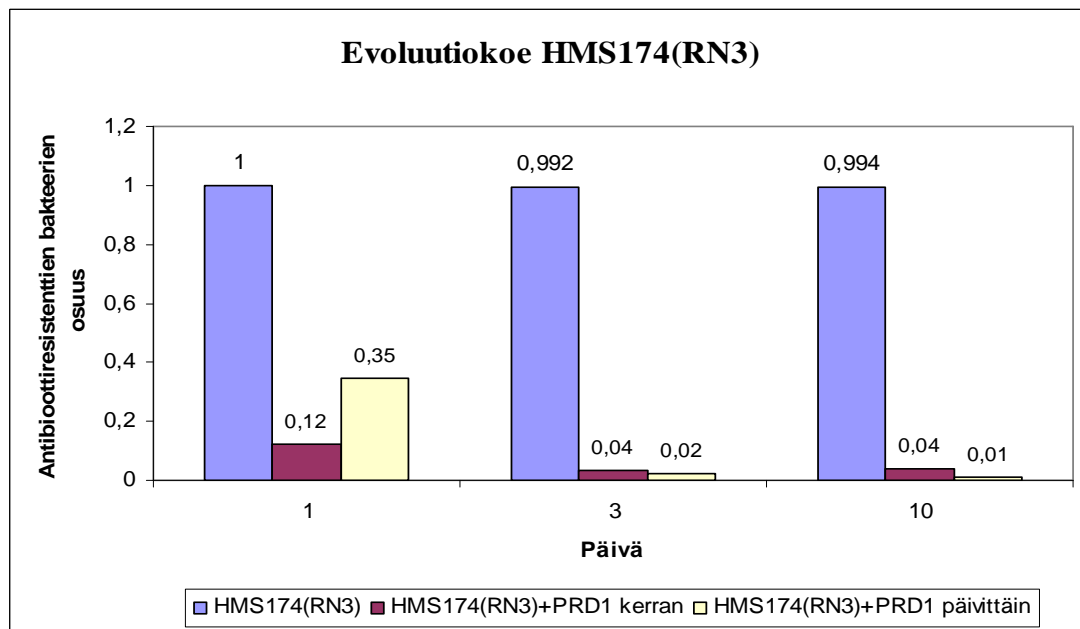
Kuva 3. *E. coli* K12:n (JE2571(RP4)) reaktio viruksen (PRD1) läsnäoloon kahden eri kokeen aikana.

Erojakin löytyi bakteerien ja plasmidien välillä. Yleensä vastustuskyky tippui heti ensimmäisen päivän jälkeen, mutta *Serratia marcescens*illa (Kuva 6) ensimmäisessä mittauksessa ei viruksella näyttäisi olevan mitään vaikutusta. *E. coli* JE2571(RP4) reagoi virukseen siten, että populaation vastustuskyky väheni yhden päivän aikana 58,8 %:iin ja kymmenentenä mittauspäivänä 16,8 %:iin, kun virusta oli lisätty ensimmäisenä päivänä (Kuva 3). Vastaavasti päivittäisen viruslisäyksen yhteydessä vastustuskyky laski päivässä 71,5 %:iin ja lopulta viimeisenä mittauspäivänä 5 %:iin. pLM2-plasmidin sisältänyt JE2571 ei kyennyt pitämään antibioottiresistensistään kiinni, koska resistenttien bakteerien määrä tippui kymmenen päivän jälkeen jopa 0,3 %:iin ja jo yhden päivän aikana vastustuskyky vajoa 9,3 %:iin. Tosin kontrollinkin vastustuskyky vaihteli voimakkaasti (Kuva 4).



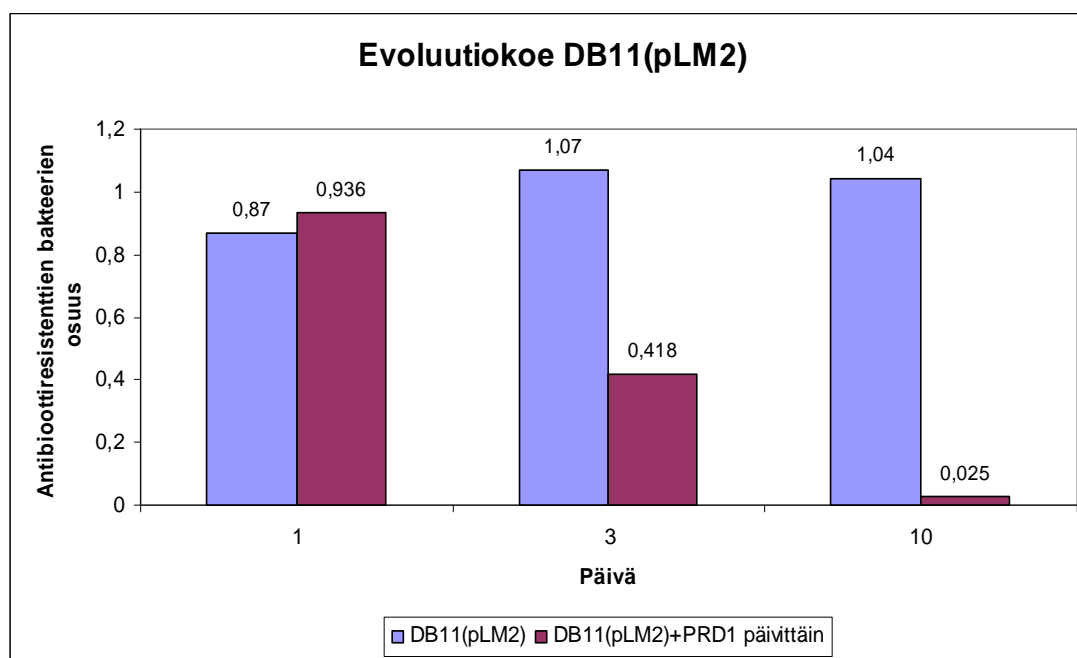
Kuva 4. *E. coli* kantaa JE2571 tutkittiin viruksen kanssa myös, kun bakteeri sisälsi pLM2-plasmidin.

Virus vaikuttaa myös *E. coli* HMS174(RN3) -bakteeriin (Kuva 5). Jo ensimmäisen päivän jälkeen resistenttiys putoaa 12-35 %:iin ja kolmantena päivänä resistenttiys on tippunut kymmenennen päivän lukemiin. Vastustuskykyisten määrä on hyvin lähellä toisiaan riippumatta siitä, lisättiinkö virusta kerran vai joka päivä (4 %:a verrattuna 1 %:a).



Kuva 5. PRD1:n vaikutus *E. coli* K12:n HMS174(RN3)-kantaan.

Kolmannessa evoluutiokokeessa kasvatettiin bakteereja DS88(pLM2) ja JE2571(RP4) sekä PRD1:n että kanamysiinin seurassa. Kasvatuksia jatkettiin kymmenen päivää, joista seitsemäntenä kasvatuksista mitattiin kasvukäyrä, ja kymmenentenä siirrostettiin soluja LB_{km}-agarmaljoille. Maljoilta laskettiin pesäkkeiden lukumäärä, jonka perusteella arvioitiin laimennossuhteen mukaan bakteerien määrä millilitrassa (Taulukko 3). *Salmonella enterica* -bakteerien määrä oli lähes viisi miljardia millilitrassa bakteeriviljelmää, kun taas *E. coli*n populaatiokooksi arvioitiin reilu yksi miljardi millilitrassa.



Kuva 6. Serratia marcescens DB11 -bakteerin reaktio PRD1-virukseen.

PCR-kokeiden avulla selvitettiin plasmidin säilymistä solussa PRD1:n vaikutuksen jälkeen kolmen eri plasmidigeenin avulla - *trbE* (osallistuu paritteluun, ks. Johdanto), *traC* (primaasi) ja *aphA* (kanamysiiniresistenssi). Ensimmäisestä PCR-kokeesta (Kuva 7) nähdään selvästi PRD1:n vaikutus - kun testattiin soluja, jotka kasvoivat kanamysiiniä sisältävillä maljoilla, saatiin tulokseksi, että kaikki solut olivat kanamysiiniresistenttejä, kun taas tavallisella ravinnemaljalla kasvavat solut eivät olleet vastustuskykyisiä antibiootille. Kuvasta 8 voidaan tulkita plasmidin tai sen geenien läsnäoloa virukselle ja antibiootille altistetuissa soluissa. Kun solut olivat kasvaneet kymmenen päivää PRD1:n ja kanamysiinin kanssa, JE2571(RP4)-pesäkkeitä kasvoi kanamysiinimaljoilla, mutta PCR

antoi negatiivisia tuloksia: primaasigeeniä ei ollut kuin kontrollissa, *trbE* esiintyi vain ensimmäisessä näytteessä, mutta kanamysiiniresistenttisuuden antava geeni oli neljässä näytteessä kuudesta. DS88(pLM2):n kohdalla kontrollit jäivät lähes tyhjiksi.

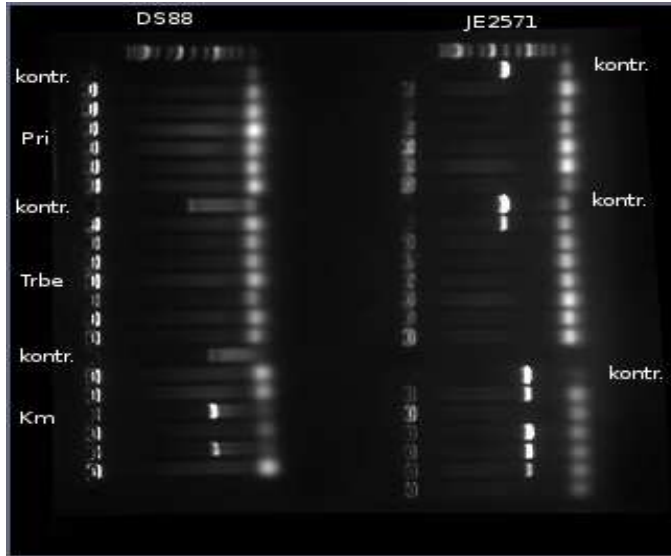
Taulukko 3. Pesäkkeiden lukumäärästä antibioottimaljalla määritettiin bakteerien määrä millilitrassa, kun bakteereja oli kasvatettu kymmenen päivää antibiootin ja viruksen kanssa sekä vertailuna ilman kumpaakaan valintaa.

| Bakteeri | Bakteerien lukumäärä millilitrassa (cfu/ml) (virus- ja antibioottivalinta) | Bakteerien lukumäärä millilitrassa (cfu/ml) (ilman valintaa) |
|-------------|--|--|
| DS88(pLM2) | $4,8 \cdot 10^9$ | $4,5 \cdot 10^9$ |
| JE2571(RP4) | $1,2 \cdot 10^9$ | $1,2 \cdot 10^9$ |



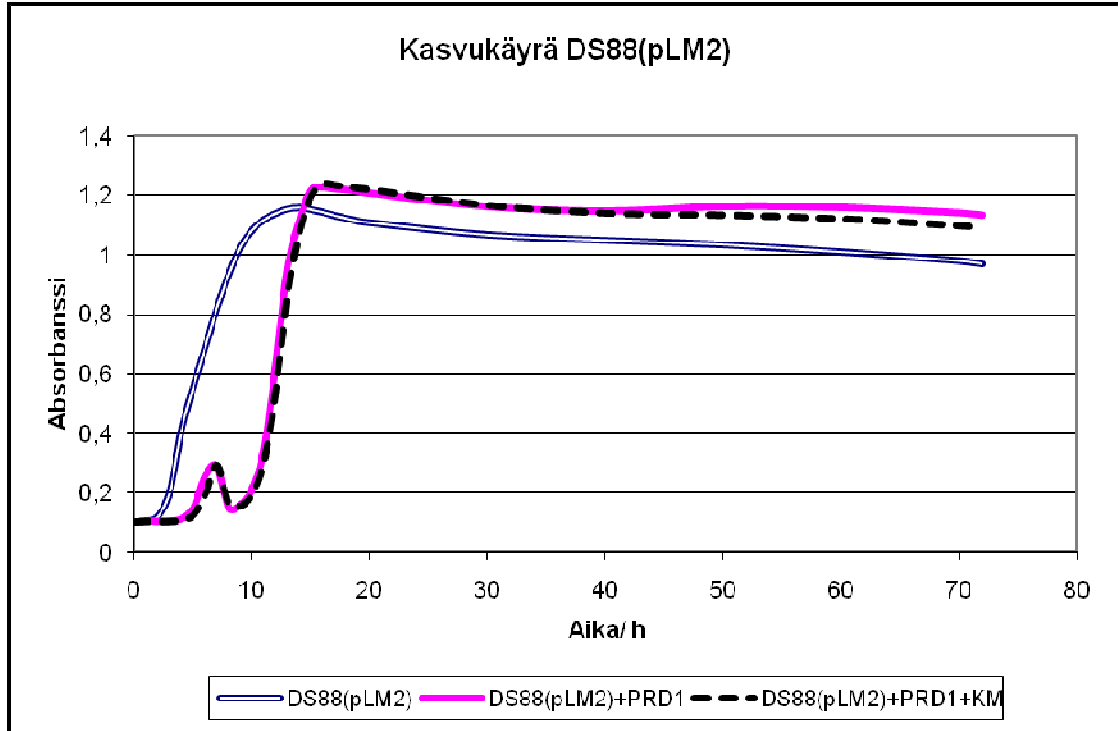
Kuva 7. AGE-kuva PCR-reaktioista. Kaivoissa 1, 10 ja 18 1 kb mittaseos erikokoisista DNA-pätkistä kokovertailuksi, kaivoissa 2-9 pesäkkeet JE2571(RP4)+PRD1 -näytteiden LB_{km}-maljalta, kaivossa 11 kontrolli, kaivoissa 13-26 pesäkkeet JE2571(RP4)+PRD1:n LB-maljoilta.

PCR-näytteiden tuloksia voidaan vielä verrata geenien sijoittumiseen plasmidissa (Kuva 1). Tutkittavista geneistä *TraC* ja *aphA* sijaitsevat hyvin lähekkäin toisiaan, kun taas *trbE* sijoittuu hieman kauemmaksi.



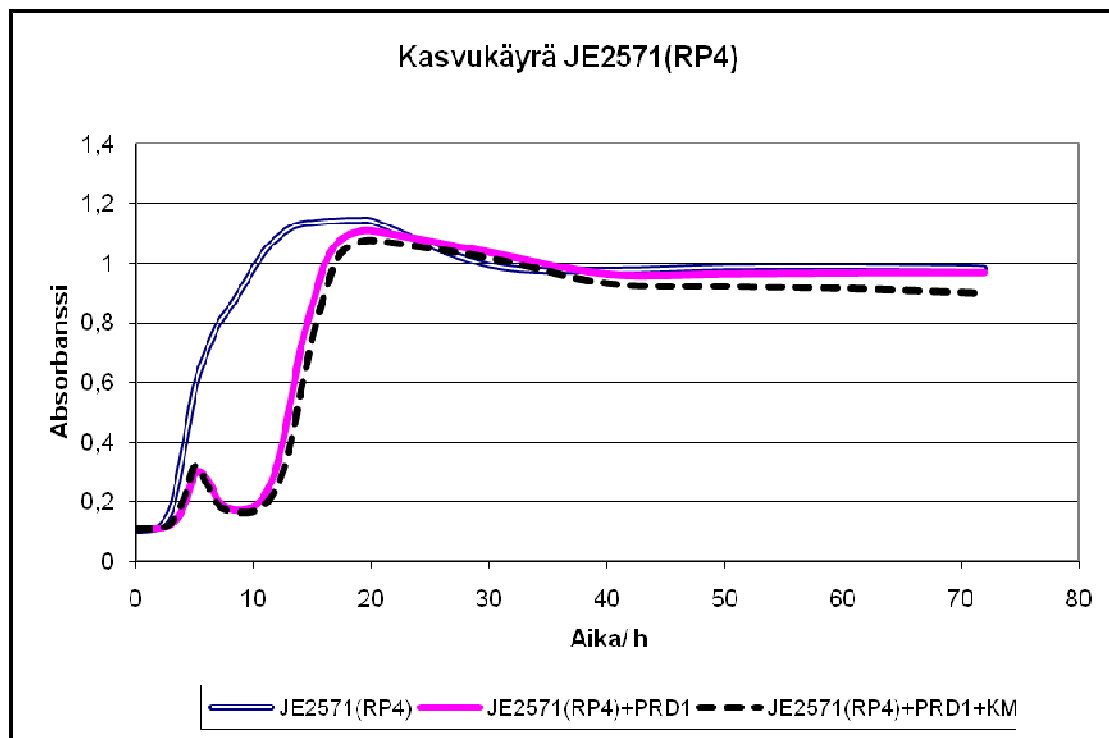
Kuva 8. AGE-kuva PCR-reaktiosta. Molemmilla bakteereilla tehdyistä näytteistä (+PRD1+KM) kanamysiinimaljalta ylimpänä on testattu primaasia, keskellä *trbE*-geeniä ja alimpana kanamysiinigeeniä.

Viruksen populaatiovaikutusta selvitettiin bakteerien kasvukäyrän avulla (Kuvat 9-11). DS88(pLM2):n kuvaajasta näkyy (Kuva 9), kuinka PRD1 hidasti populaation kasvua ja antibiootti myöhästytti kasvuun lähtöä vielä hieman lisää. Käyrässä huomataan selvä piikki, eli populaatio romahtaa ensimmäisen kasvuyrityksen jälkeen. Kuitenkin lopulta kasvu ulottuu normaalipopulaation yläpuolelle ja noudattaa aika hyvin normaalipopulaation kasvukäyrän muotoa (mm. Zwietering ym., 1990), jossa on eksponentiaalista kasvua, jonka jälkeen bakteerien määrä alkaa pudota. Kanamysiinin vaikutus näkyy selvemmin vasta lopussa, jossa ero bakteerien määrässä on jo huomattava, kun vertaa molempia viruksen kanssa kasvaneiden populaatioiden kasvukäyriä. Kuvasta nähdään myös se kummallisuus, että antibiootin ja/tai viruksen kanssa kasvaneet populaatiot saavuttivat suuremman kasvuhuipun kuin normaalipopulaatio.



Kuva 9. *Salmonella enterican* (DS88(pLM2)) kasvukäyrät viruksen (PRD1) ja antibiootin (kanamysiini, km) läsnä ollessa.

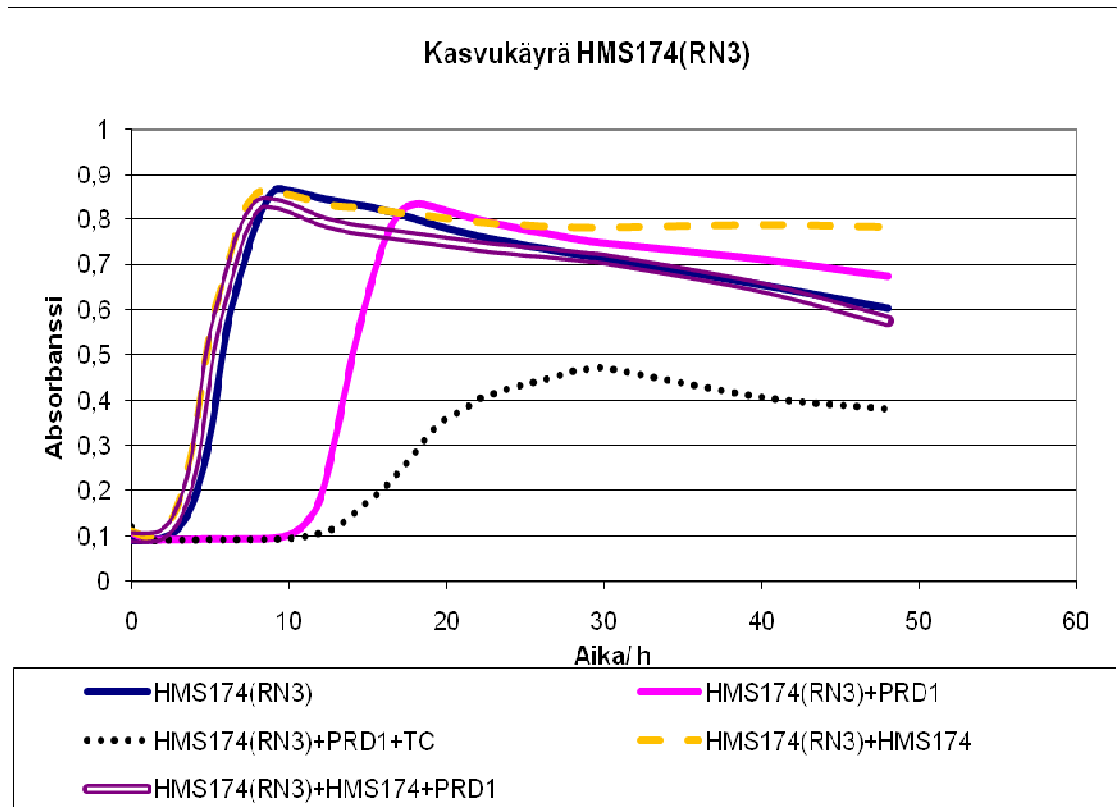
Verrattaessa DS88(pLM2):n kasvukäyriä JE2571(RP4):n kasvukäyriin (Kuva 10) havaitaan samankaltaisuutta kuvaajissa. Myös *E. coli*n virus vaikutti siten, että eksponentiaalinen kasvu alkoi kontrollia myöhemmin ja käyrässä esiintyi alussa piikki. Lisäksi tässäkin huomataan antibiootin merkitys kasvulle, koska antibioottia sisältäneessä näytteessä kasvu oli lähes koko ajan heikompaa ja mittauksen loppupisteessä ero oli jo huomattava. Tosin bakteerien välillä oli erojakin - virusta sisältäneet näytteet eivät kasvaneet paremmin kuin kontrollikasvatus.



Kuva 20. E coli JE2571(RP4) -bakteerin kasvukäyrät eri kasvuympäristöissä. PRD1-viruksen ja antibiootin (kanamysiini, km) vaikutus populaatioon.

Käyrämorfologioihin saatiin suurempia eroja testattaessa, kuinka populaation kasvuun vaikuttaa esim. kilpailutilanne (Kuva 11). IncN-plasmidin RN3 sisältävän HMS174:n toimiessa verrokkina pienempiä eroja sen kuvaajaan saatiin käytettäessä puhdasta kilpailutilannetta eli HMS174+HMS174(RN3) tai lisättäessä seokseen vielä PRD1. Nopeimmin kasvamaan lähti HMS174+HMS174(RN3)-populaatio ja heti perässä tuli populaatio, jossa vaikutti näiden lisäksi vielä virus. Kuitenkin kaikkein suurimpaan kasvuun ylsi kontrolli - tosin ero viruksettomaan kilpailutilanteeseen oli hyvin pieni. Valtava muutos kasvussa tapahtuu, kun lisätään virusta ei-kilpailevaan bakteeripopulaatioon ja varsinkin, jos samaista pakkaa sekoitetaan vielä tetrasykliinilla. Muihin kasvukäyriin verrattaessa ilman antibioottia kasvaneet virukselliset populaatiot vastaavat toisiaan siinä, että kasvun aloitus hidastuu, mutta saavuttaa kuitenkin lopulta miltei normaalin lakipisteen. Loppupisteessä tosin viruksellinen näyte sisältää jälleen suuremman populaation myös virukselliseen kilpailutilanteeseen verrattuna. Odotettua sen sijaan oli, että heikoiten kasvaneen populaation takana oli näyte, joka sisälsi plasmidillisen bakteerin lisäksi sekä virusta että antibioottia. Sen lisäksi, että kasvaminen viivästyi, se oli

myös selkeästi hidasta kasvukäyrän muistuttaen lähemmin tasaisesti kasvavaa kuin eksponentiaalisesti kasvavaa. Lakipiste jäi reiluun puoleen väliin tarkastellessa sen eroja muihin kasvukäyriin.



Kuva 11. E coli K12 HMS174(RN3) kasvukäyrät viruksen (PRD1) ja antibiootin (tetrasykliini, tc) vaikuttaessa.

4. Tulosten tarkastelu

4.1. Evoluutiokokeet

Työssä tarkoituksena oli tutkia viruksen evolutiivista vaikutusta bakteereihin, jotka kantavat antibiooteille vastustuskyvyn antavaa plasmidia. Tässä käytettiin PRD1-virusta, joka käyttää soluun tunkeutuessaan hyväkseen plasmidin muodostamaa pilusta, jonka välityksellä plasmidi siirtää kopiotaan toisiin soluihin. Viruksen vaikutus tulosten pohjalta kaikkiin tutkittaviin bakteereihin on kiistaton. Voidaankin sanoa PRD1:n muuttavan bakteerien DNA-sisältöä vaikuttaen populaation vastustuskykyyn. PCR-kokeilla ilmennettiin muutoksia plasmidigeeneissä (Kuvat 7 ja 8), joten lisätutkimusta kaivataan, tapahtuvatko muutokset rekombinaatiolla vai mutaation vaikutuksesta. Koska resistenttiys ei hävinnyt kokonaan, ovat populaation resistentit solut sekä antibiootille että virukselle vastustuskykyisiä. Olisikin tarpeellista selvittää, kuinka kyseiset solut pärjäisivät kilpailutilanteessa, koska se kertoisi, onko tällaisesta muutoksesta, jossa bakteeri on resistentti myös virusta vastaan, haittaa kasvun kannalta.

Tarkastellessa *Salmonellakannan* DS88(pLM2) tuloksia sen kasvetta PRD1:n kanssa huomataan, että vastustuskyky antibiootteja kohtaan pienenee huomattavasti jo ensimmäisen päivän jälkeen (Kuva 2). Luonnollisesti bakteerimäärässä on jonkin verran heittelyä, mikä näkyy esimerkiksi ensimmäisen päivän jälkeen mitatusta antibioottiresistenttiydestä. Kuvasta 2 näkyy, kuinka ensimmäisen päivän jälkeen vastustuskyvyssä on viiden prosenttiyksikön ero kahden kokeen välillä, vaikka tällöin virusta on molemmissa kokeissa lisätty vain kerran.

Vaikka vastustuskyky heikkenikin hieman enemmän päivittäisellä viruslisäyksellä, ainoastaan ensimmäisenä päivänä virusta lisättäessä bakteereista kuolee antibioottimallalla 99,2 %:a kymmenen päivän kuluttua. Päivittäin virusmäärää kasvatettaessa antibioottiresistenttiys pienenee lopulta vain 0,6 %:iin. Se, johtuuko resistenttiys sitten rekombinaatiosta bakteerin genomiin vai jostakin muusta, onkin eri kysymys ja vaatii lisää tutkimusta. Joka tapauksessahan bakteerien on oltava resistenttejä, koska ne kasvoivat antibiootin läsnä ollessa, joten vastustuskyvyn antava geeni ei ole soluista hävinnyt. Koska PRD1 käyttää samaa kompleksia soluun tunkeutumisessa kuin plasmidi horisontaaliseen lisääntymiseen, ei ole yllättävää, että populaation vastustuskyky pienenee lähelle 0 %:a.

Tilastollisesti ero kertalisäyksen ja päivittäisen viruslisäyksen välillä ei ole merkittävä eli virus menestyi bakteeripopulaatiossa niin hyvin, että uusien virusten lisääminen populaation joukkoon ei tehostanut resistenttiyden poistamista. Kun PRD1-virus kerran vapautettiin bakteeripopulaatioon, vaikutus oli huomattava eli suurin osa soluista pääsi eroon plasmideista ja täten eivät olleet vastustuskykyisiä kanamysiinille, mutta vajaa prosentti bakteereista pystyi vastustamaan sekä viruksen että antibiootin vaikutusta.

Vastaavasti *Escherichia coli* -kannoilla JE2571 ja HMS174 tapahtui antibioottiresistenttien solujen väheneminen (Kuvat 3, 4 ja 5). Tosin HMS174(RN3):n kohdalla ensimmäisenä mittauspäivänä ero kertalisäyksen ja päivittäisen lisäyksen välillä oli reilun 20 prosenttiyksikön ero, mikä osoittaa sen, että ollaan tekemisissä elävien olentojen kanssa. Ei voida olettaa, vaikka bakteerit samanlaisia ovatkin, että jokainen kasvatus käyttäytyy täsmälleen samalla tavalla. Antibioottiresistenttiyden pieneneminen on kuitenkin selvä myös näillä kannoilla. HMS174(RN3):n kohdalla viruksen lisäämiskertojen määrällä ei ole paljoa vaikutusta antibioottiresistenttiyteen, koska kertalisäyksen ja päivittäisen lisäyksen aiheuttama ero on tilastollisesti pieni (kolme prosenttiyksikköä). JE2571(RP4)-kannalla ero oli huomattavampi, kun vertasi kertalisäystä ja päivittäistä: eroa kymmenentenä kasvatuspäivänä oli lähes 12 prosenttiyksikköä. Mutta jos vertaa kokeiden ensimmäiseen päivään, jolloin eroa oli 13 prosenttiyksikköä, ei tuotakaan eroa voi pitää tilastollisesti merkittävänä. Tilastollisesti varmaksi voi sanoa vain sen, että PRD1:n vaikutus on ilmeinen, koska resistenttien bakteerien osuus populaatiosta vajoaa alle 17 %:iin.

Ilmeisesti RP4-plasmidi onnistuu vaikeuttamaan viruksen tarttumista pLM2-plasmidia enemmän *E. colissa*, koska verrattaessa JE2571(RP4):n ja JE2571(pLM2):n kuvaajia (Kuvat 3 ja 4) on nähtävissä selkeä ero. pLM2-plasmidin sisältävä JE2571 menettää antibioottiresistenttiytään ensimmäisestä päivästä lähtien huomattavan paljon nopeammin ja kymmenen päivän jälkeen eroa on 4,7 prosenttiyksikköä. Tosin kontrollin kohdalla tapahtui JE2571(pLM2):n kohdalla jotakin viimeisen päivän osalta. Vaikea sanoa miksi, mutta tulosten mukaan kontrollistakin olisi pienentynyt antibioottiresistenttiys 64 %:iin kymmenen päivän jälkeen. Tämä todennettiin vielä erikseen viivakokeilla pakkaseen säilötyistä kyseisistä näytteistä. Resistenttiys tippui aivan kuin kontrollin sekaan olisi päässyt virusta, mutta vaikka inhimillinen erehdys on aina mahdollinen, tällainen virhe on epäuskottava tarkkojen laboratoriotöiden vuoksi. Toisaalta

pipetointivirhe voisi aiheuttaa myös eron, jos toiselle maljalle on erehdyksessä pipetoitu enemmän. Joka tapauksessa bakteerit eivät luovu plasmideistaan, vaikka alkuperäinen antibiootti- tai muu selektio ympäristöstä häviäisi (Dahlberg ja Chao, 2003).

Eron pLM2- ja RP4-plasmidin välillä voi tulkita tarkoittavan myös sitä, että solun on paljon helpompi päästä eroon pLM2-plasmidista kuin RP4:stä. Plasmidien pLM2 ja RP4 ero resistenttiyden tippumisessa on hankala selittää, koska plasmidien pitäisi olla käytännössä samoja - plasmidit eroavat ainoastaan antibioottiresistenttiydessään siten, että pLM2 ei ole vastustuskykyinen ampicilliinille ja tetrasykliinille (Mindich ym., 1976). Kanamysiiniselektiossa tällä ei olettaisi olevan mitään merkitystä.

PCR-kokeilla vielä varmistettiin evoluutiokokeista muutos RP4-plasmidin kohdalla (Kuva 7). PCR-kokeissa tutkittiin kolmen geenin läsnäoloa: *pri* koodittaa proteiinia primaasi, jonka on todettu vaikuttavan plasmidin vakauteen ja jota käytetään siirrossa vastaanottavaan soluun, koska vastaanottava solu käyttää primaasia tehdäkseen siirretystä yksijuosteisesta DNA:sta kaksijuosteista (Lanka ja Barth, 1981); *trbE* toimii piluksen rakenteessa ATPaasina (ks. yleiskatsaus de la Cruz ym., 2010); *aphA* antaa vastustuskyvyn kanamysiinille. Selkeästi nähdään, että LB_{km}-agarmaljalla kasvavat vain antibioottiresistentit bakteerit, jotka sisältävät plasmidin kanamysiinigeenin. Jos satunnaisesti valittiin LB-agarmaljoilta pesäkkeet ja testattiin näitä kanamysiinigeenin osalta, saadaan jokaisesta pesäkkeestä negatiivinen tulos. PRD1:n vaikutus bakteeripopulaatioon on selkeä: populaatiossa on antibioottiresistentejä bakteereja, mutta myös paljon bakteereja, jotka eivät enää sisällä plasmidin antibioottigeeniä, jolloin bakteeri on todennäköisesti päässyt eroon koko plasmidistaan. PCR-kokeissa vain positiivisesta tuloksesta voi päätellä, että todennäköisesti haluttu DNA-pätkä on monistunut, koska negatiivinen tulos voi johtua jostakin virheestä reaktioseoksessa tai pipetoinnissa yleensä. Tässä kuitenkin kontrolli toimi ja odotetusti antibioottia sisältävällä ravintomaljalla olevat pesäkkeet antoivat positiivisen tuloksen antibioottigeenin osalta. Negatiiviset tulokset antoivat vain pesäkkeet, jotka kasvoivat ilman antibioottiselektiota.

Koska viljelmät tehtiin samoista kasvatuksista, sisälsi luonnollisesti LB-agarmalja myös antibioottiresistentejä bakteereja, mutta satunnaisesti pesäkkeitä valittaessa ei 14 pesäkkeestä yksikään sisältänyt PCR-kokeen mukaan vastustuskyvyn antavaa geeniä, jolloin johtopäätöksenä voidaan sanoa PCR-kokeiden tukevan evoluutiokokeiden tuloksia antibioottiresistenssin vähenemisestä bakteeripopulaatiossa.

Serratia marcescens erosi muista bakteereista siten, että ensimmäisen päivän jälkeen DB11(pLM2):n resistenttiydelle ei vaikuttaisi tapahtuneen juuri mitään. Lasku on huomattavan paljon pienempi kuin *Salmonella* ja *E. coli*lla. Virusta lisättäessä päivittäin huomataan resistenttiyden kuitenkin pienenevän ja lopulta kymmenen päivän jälkeen päätyvän 2,5 %:n antibioottiresistenttiyteen. Voisiko bakteeri kyetä hidastamaan joko viruksen siirtymistä soluun tai solun lisääntymiskoneiston valjastamista viruksen käyttöön paremmin kuin muut bakteerit? Jollain tavalla kyseinen bakteeri vastustaa viruksen vaikutusta pitempään kuin muut. Pilusrakenne, johon virus tarttuu, on joka tapauksessa lähtöisin plasmidigeeneistä. Kuitenkin myös bakteeri vaikuttaa piluksiin, kuten johdannossa todettiin. *E coli* muodostaa 20 pilusrakennetta verrattuna *Salmonella typhimuriumin* 50:een pilukseen.

Molempien bakteerien, joiden reaktioita tutkittiin vain jatkuvaan viruslisäykseen, kontrollin testaus tehtiin maljaamalla samaa kontrollin laimennosta sekä LB-agarmaljalle, että LB_{km}-agarmaljalle, minkä vuoksi antibioottiresistenssi nousi yli 100 %:iin. Kyseiset bakteerit olivat siis DB11(pLM2) sekä JE2571(pLM2). Pipetoimalla ei kuitenkaan voi saada täsmälleen samaa määrää bakteereja molemmille maljoille, vaikka hyvin lähelle samaa päästäisiinkin. Viivakokeet koettiin luotettavammiksi, koska kaikki LB-agarmaljalla kasvaneet pesäkkeet testattiin vetämällä niistä viiva LB_{antibiootti}-agarmaljoille. Tämä oli työläämpää ja vaati hyvin tarkkaa ennakointia, kuinka paljon resistenttiys oli tippunut, jotta pystyttiin tekemään oikeanlainen laimennos. Aikaa kului myös enemmän, koska varmuuden vuoksi maljattiin useampi laimennos. Ajankäyttö koettiin kuitenkin tarpeelliseksi tulosten uskottavuuden kannalta. Ongelmaksi antibioottiresistenssin tutkimisen maljaamalla koettiin nimenomaan tulokset, joissa resistenttiys nousi yli 100 %:n, koska tämän ei pitäisi olla millään muulla tavalla mahdollista kuin, että antibioottimaljalle on pipetoitu enemmän bakteeria. Koska kuitenkin molemmille maljoille pipetoitiin automaattipipeteillä sama määrä samaa laimennosta, isoja eroja ei pitäisi olla. Jotta voitaisiin testata jokaisen bakteerin resistenttiys, siirryttiinkin antibioottivastustuskyvyn tutkimisessa viivakokeisiin.

4.2. Kasvukäyrät

Jokaista käytettyä plasmidia tutkittiin myös plasmidin sisältävän bakteerin kasvukäyrän avulla. *Salmonella enterica* DS88(pLM2) ja *Escherichia coli* JE2571(RP4) kasvoivat joko yksinään, viruksen kanssa tai viruksen ja antibiootin läsnä ollessa. Ilman virusta ja kanamysiiniä kasvanut DS88(pLM2) noudatti totutunnäköistä eksponentiaalista kasvukäyrää, jossa bakteerien määrä kasvaa ensiksi nopeasti, minkä jälkeen määrä alkaa pudota, kun ravinteiden ja tilan määrä pienenee. Kanamysiinin lisäämisen samanaikaisesti viruksen kanssa olisi olettanut vaikuttavan bakteerien määrään merkittävästi. Vain viruksen kanssa sekä antibiootin ja viruksen kanssa bakteereja kasvatettaessa kasvukäyrät ovat lähes identtiset; eroja on hieman ensimmäisen piikin jyrkkyydessä ja enemmän mittauksen loppupuolella. Ero kasvukäyrässä lisättäessä viruksen lisäksi myös antibioottia on yllättävän pieni (absorbanssieron 0,2391; julkaisematon numeerinen data) 72 h:n jälkeen.

Erona normaaliin kasvukäyrään on myös piikki n. 7 h:n kohdalla. Vaikuttaisi, että virus olisi ensiksi tappanut suuren osan bakteereista, mikä näkyy alun hitaana kasvuna, minkä jälkeinen piikki johtuisi mahdollisesti viruksen monistumisesta bakteerin sisällä ennen kuin se tappaa taas uudemman kerran bakteereja hajottaessaan isäntäsolunsa. Antibiootin lisääminen virusta sisältävään bakteeriliemeen vaikuttaisi lopulta bakteerien selviämiseen heikentävästi, vaikka ero ei tosiaan ole suuri. Erikoinen piirre kuvaajassa on myös se, kuinka viruksellisten näytteiden käyrät nousevat korkeammalle kuin ilman virusta kasvaneiden bakteerinäytteiden käyrä ja jäävät myös korkeammalle. Tapahtuuko bakteereille jokin mutaatio virus- ja antibioottiselektiolla, mikä saa aikaan paremman kasvun? Pelkän viruksen kanssa kasvatettaessa bakteeri on ehkä onnistunut pääsemään eroon plasmidista, mikä saattaisi antaa pienen kasvuedun plasmidilliseen bakteeriin verrattuna. Mutaatio, joka on säilyttänyt bakteerin vastustuskyvyn antibiootille ilman, että bakteeri on enää PRD1:lle altis, onkin vaikeammin todennettavissa eikä ollut tämän tutkimuksen rajoissa mahdollista selvittää.

Jos miettitään, että PRD1-vastustuskykyiset konjugatiiviset bakteerit ovat kykenemättömiä plasmidin horisontaaliseen siirtoon (Grahn ym., 1997), voidaan pohtia, onko tutkittavissa plasmideissa tapahtunut mutaatio, jolloin bakteeri ei ole enää kyennyt muodostamaan parittelukompleksia (mpf) ja on täten saanut suojan myös virusta vastaan.

Mpf on voinut muokkaantua sellaiseksi, ettei se enää toimi viruksen reseptorina. Tämä ei tosin selitä, miksi sekä virukselle että antibiootille vastustuskykyinen bakteeripopulaatio kasvoi lopulta paremmin kuin kontrolli, minkä voisi spekuloida johtuvan plasmidin poistamisesta johtuvasta kasvuedusta.

JE2571(RP4) reagoi odotetummin virukseen ja antibioottiin – viruksettomien näytteiden kasvukäyrä kiipeää korkeammalle ja mittauksen lopulla jääkin korkeimmalle. *Salmonellan* kasvukäyrän lailla tämän *E. coli* –kannan kuvaajassa on nähtävissä ensin pieni piikki, kunnes kasvukäyrä nousee normaalin mallisesti myös virus- ja antibiootikasvatuksissa. JE2571(RP4)+PRD1+kanamysiini-kasvatuksen kasvukäyrä jää kuitenkin tällä kertaa alemmalle kuin muut, joten populaatiossa tapahtunut muutos ei ole täysin kumonnut viruksen vaikutusta.

PCR-kokeiden olettaisi tällöin antavan tulokseksi, että kaikki sisältäisivät ainakin antibiootille vastustuskyvyn antavan geenin. Kuitenkin kyseinen PCR antoi negatiivisen tuloksen kahden näytteen kohdalle, mikä oli odottamatonta. Tosin on aiheellista kysyä, onko kyseessä oikea negatiivinen vai virhe. Kontrollit antoivat hyvin selkeän positiivisen kaikista testatuista markkereista. Ensimmäinen näyte oli ainoa, joka antoi kaksi positiivista eli *trbE*-geenistä sekä kanamysiinista. Kuitenkin kuvasta 1 ilmenee, että nämä eivät ole niin vierekkäin kuin *pri* ja *trbE*, joten olisi yllättävää, jos primaasi olisi hävinnyt esimerkiksi rekombinaation vuoksi. Tosin Merryweather ym. (1986) selvittivät, että primaasin puute ei vaikuttanut kahden *E. coli* –kannan väliseen siirtoon niin voimakkaasti kuin, jos vastaanottajana oli *Salmonella*. Mutaatio primaasissa heikensi *E. colien* välistä plasmidisiirtoa, mutta ei kuitenkaan lopettanut sitä kokonaan. Tämän vuoksi plasmidin luopuminen primaasista ei ole mahdotonta, koska se ei ole täysin välttämätön plasmidin horisontaaliseen siirtoon. Lähes varmaksi voi PCR:n tulosten puolesta todeta, että ainakin suurin osa kanamysiinille vastustuskykyisistä pesäkkeistä sisälsi kanamysiiniresistenttiyden antavan geenin.

Salmonellan ja *E. colin* kasvatuksista virus- ja kanamysiiniympäristössä laskettiin myös bakteerien lukumäärä (Taulukko 3). Maljalle tehdyistä viljelmistä laskettiin pesäkkeiden lukumäärä ja todettiin, että kaksoisvalinnan jälkeen pesäkkeitä kasvoi normaalin populaation verran. Tulos on yhdenmukainen kasvukäyrien kanssa, koska populaatiot kasvoivat viiveen jälkeen lähes samalla tavalla kuin kontrolli.

E. coli HMS174(RN3):n kuvaaja poikkeaa muista, koska kyseisen bakteerin kanssa tutkittiin myös kilpailutilannetta. HMS174(RN3)-bakteeria kasvatettiin viruksen sekä viruksen ja antibiootin kanssa, kuten aiempiakin. Poikkeuksena oli kilpailutilanne, jossa bakteeria kasvatettiin plasmidittomien bakteerien kanssa. HMS174(RN3)+HMS174-seoksen kasvukäyrä nousi täsmälleen samalla tavalla kuin HMS174(RN3)+HMS174+PRD1:n kuvaaja. Tämä voi johtua siitä, että viruksen vaikutuksesta antibioottiresistenssiä ei siirtynyt plasmidittomille bakteereille, jotka kasvoivat normaalisti, ja mahdollisesti osa soluista pystyi vapautumaan plasmidista virusselektion vuoksi. Huomattavaa on, että puhtaassa kilpailutilanteessa kasvukäyrä jää kontrollia merkittävän paljon korkeammalle kokeen loppuksi 48 h:n jälkeen. Jollain tavalla plasmidin läsnäolo on auttanut populaation koon kasvamisessa, mutta lisäksi plasmidittomat bakteerit ovat vaikuttaneet kasvuun. HMS174(RN3)+HMS174+PRD1-seoksen kasvu päättyy lopulta lähes samaan pisteeseen kontrollikuvaajan kanssa. Virus näyttäisi aiheuttavan eksponentiaalisen kasvun loppuvan hieman aiemmin, ja nousun jälkeen käyrässä tapahtuu pieni notkahdus alaspäin.

PRD1 ei saanut samanlaista erillistä piikkiä aikaiseksi HMS174(RN3):n kanssa kuin mitä sai DS88:n ja JE2571:n yhteydessä, mutta viivästytti bakteerikasvua huomattavan pitkään – kasvu alkoi vasta 10 h:n jälkeen, kun kyseessä olivat HMS174(RN3)+PRD1 ja HMS174(RN3)+PRD1+TC. HMS174(RN3)+PRD1:n kuvaaja herättää mielenkiinnon, koska kun kuvaaja viivästyksen jälkeen alkaa nousta, se noudattaa hyvin paljon kontrollikuvaajaa. PRD1:n kanssa kasvaneet bakteerit olivat antibioottiresistenttejä, koska ne oli valittu antibioottiselektiolla kasvattamalla niitä yön yli antibiootin kanssa. Tämä mielessä pitäen kuvaajan alku on hyvinkin johdonmukainen, koska virus tuhoaa bakteereja koko ajan eikä kasvu pääse vauhtiin. Kuitenkin jotakin tapahtuu 10 h:n jälkeen, mikä antaa bakteereille mahdollisuuden kasvuun. Plasmidien poistaminen soluista ei ole tutkimuksissa onnistunut (ks. yleiskatsaus de la Cruz ym., 2010; Dahlberg ja Chao, 2003), joten on kiinnostavaa, kuinka bakteeri onnistui joko luopumaan plasmidista poistaen viruksen reitin soluun tai muuttamaan pilusrakennettaan siten, ettei virus kykene enää bakteeria infektoimaan. *Neisseria Gonorrhoeaen* on todistettu vapauttavan DNA:ta solun ulkopuolelle käyttäen myös plasmidien hyödyntämää T4SS-proteiinikompleksia (ks. yleiskatsaus Hamilton ym., 2006; ks. yleiskatsaus de la Cruz ym., 2010). Voisiko saman kompleksin sisältämä bakteeri siirtää sisältämäänsä DNA:ta eli

plasmidin myös solun ulkopuolelle, jos ympäristön paine sitä edellyttää? Varsinkin, kun kyseinen kompleksi on plasmidin geenien varassa. Tällöin solun tulee kuitenkin selviytyä myös plasmidin mahdollisesta tuhoamiskoneistosta, jolla plasmidi pyrkii estämään plasmidittomien solujen hengissä säilymisen.

Koska antibioottivastustuskyky on suuri ongelma, on sen leviämisen estäminen tärkeää. Tässä työssä esitetään yksi tapa, jolla tehokkaasti voidaan vähentää antibioottiresistenttien bakteerien määrää populaatiossa. Koska konjugatiiviset bakteerit voivat lisätä tehokkaasti myös muiden bakteerikantojen resistenttiyttä, on plasmidin horisontaalisen kahdentumisen estäminen merkittävä muutos rinnakkain eläviin bakteeripopulaatioihin. Konjugaation ehkäisyyn on löydetty myös muita tapoja, kuten DeNapin ym. (2004) selvittämä plasmidin poistaminen populaatiosta kemiallisella yhdisteellä. He huomasivat apramysiinin sitoutuvan plasmidi-RNA:han, jolloin plasmidin kopioituminen estyi. Williams ja Hergenrother (ks. yleiskatsaus, 2008) kokosivat listaa, kuinka poistaa antibioottiresistenttiys bakteerista. Vastustuskykyisten bakteerien plasmidien hävittämisessä on käytetty plasmidin omia mekanismeja. Kuten johdannossa esiteltiin, plasmidi varmistaa säilymisensä populaatiossa tappamalla plasmidittomat bakteerit solujakautumisessa. Tämä menetelmä valjastettiin plasmidia vastaan joko estämällä vastamolekyylin vaikutusta solun tappajamolekyyliin ehkäisemällä vastamolekyylin muodostumista solussa tai puuttumalla vastamolekyylin ja tappajamolekyylin väliseen vuorovaikutukseen siten, että tappajamolekyylin toiminta ei estynyt. Molemmat tavat johtavat solukuolemaan. Listalta löytyi myös menetelmä, jossa resistenssin leviämiseen populaatiossa vaikutettiin estämällä relaksaasin toimintaa (Lujan ym., 2007). Relaksaasin ollessa välttämätön plasmidin siirrossa vastaanottavaan soluun vähensi sen toiminnan blokkaminen antibioottiresistenssin välittymistä muihin soluihin. Tosin metodin huomattiin myös tappavan osan plasmidin sisältävistä soluista.

Erilaisia menetelmiä on siis muutamia, ja näistä useimmat mahdollisesti käytettävissä rinnakkain, jotta vaikutus antibioottiresistenssiin olisi mahdollisimman tehokas. Varsinkin kokonaiskuvaa ajatellaan on otettava huomioon, että antibiootti- ja virusresistentit bakteerit, jotka eivät kykene enää siirtämään vastustuskyvyn antavaa geeniä, saattavat hävitä taistelun populaatiossa plasmidittomia bakteereja vastaan. Eksponentiaalisesti kasvaessaan pienikin etu, jonka plasmidittomuus voi antaa, vaikuttaa nopeasti populaatiossa. Dahlbergin ja Chaon (2003) tutkimukset antoivat lisäksi viitteen,

että antibioottiresistenttien bakteerien leviämistä ei voida estää vähentämällä antibioottien käyttöä. Plasmidi ei katoa populaatiosta, vaan valinnan hävitessä erilaiset mutaatiot kompensoivat plasmidin aiheuttamaa kasvuhaittaa siten, että plasmidittomat bakteerit eivät ehdi kilpailutilanteessa hyödyntämään etuaan. Onko näillä tutkimuksessa saaduilla sekä antibiootille että virukselle vastustuskykyisillä kannoilla sama tilanne kompensaation kanssa? Kysymys vaatii lisätutkimusta. Tärkeintä olisi kuitenkin saada pidennettyä antibioottien käyttöikää, koska antibioottiresistenttiys ilmenee nopeasti uusien antibioottien löytymisen jälkeen (ks. yleiskatsaus Clatworthy ym., 2007).

Vaikka saadut tulokset ovatkin lupaavia, ja PRD1 vähentää populaation antibioottiresistenttiyden jopa alle prosenttiin, on kriittisyys pidettävä mielessä. Faagien käytössä saattaa piillä riski. Johdannossa esiteltiin virusten käyttöä ihmisten ja eläinten sairauksien hoidossa. Virukset eivät näyttäisi olevan haitaksi bakteerien isännälle, mutta luonnon jatkuvan kilpavarustelun seurauksia on vaikea ennustaa. Jos bakteeriviruksia aletaan käyttää laajemmassa mittakaavassa, on huomioitava esim. virusten kyky transduktioon eli geneettisen materiaalin siirtoon isäntäsolujen välillä. Chen ja Novick (2009) raportoivat faagin välittävän haitallisia geenejä bakteerista toiseen (*S. aureus* ja *L. monocytogenes*).

Koska tässäkin tutkimuksessa havaittiin bakteerin vastustuskyky virusta kohtaan, ei voida varmaksi sanoa, kuinka pitkään virukset toimisivat käytettäessä lääkkeenä mikrobeja vastaan. Joka tapauksessa ainakin yllä olevien tulosten pohjalta voidaan sanoa resistenttiyden faageja kohtaan koskevan murto-osaa populaation soluista. Verrattuna konjugaation välityksellä nopeasti koko populaatioon siirtyvään antibioottiresistenssiin virusresistenttiys vaikuttaa pieneltä ongelmalta.

5. Lähdeluettelo

- Abrescia, N. G. A., J. J. B. Cockburn, J. M. Grimes, G. C. Sutton, J. M. Diprose, S. J. Butcher, S. D. Fuller, C. San Martin, R. M. Burnett, D. I. Stuart, D. H. Bamford ja J. K. Bamford. 2004. Insights into assembly from structural analysis of bacteriophage PRD1. *Nature*. 432: 68-74.
- Adamczyk, M. ja G. Jagura-Burdzy. 2003. Sread and survival of promiscuous IncP-1 plasmids. *Acta Biochim Pol*. 50: 425-453.
- Bamford, D. H. 2003. Do viruses form lineages across different domains of life? *Res Microbiol*. 154: 231-236.
- Bates, S., A. M. Cashmore ja B. M. Wilkins. 1998. IncP Plasmids Are Unusually Rffective in Mediating Conjugation of *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*: Involvement of Tra2 Mating System. *J Bacteriol*. 180: 6538-6543.
- Brantl, S. 2004. Plasmid Replication Control by Antisense RNAs. *Plasmid Biology*. B. E. Funnell and G. J. Phillips, toimittajat. AMS Press. Washington D.C. 47-63.
- Burkardt, H-J., G. Riess ja J. Pühler. 1979. Relationship of Group P1 Plasmids Revealed by Heteroduplex Experiments: RP1, RP4, R68 and RK2 Are Identical. *J General Microbiology*. 114: 341-348.
- Butcher, S. J., D. H. Bamford ja S. D. Fuller. 1995. DNA packaging orders the membrane of bacteriophage PRD1. *EMBO J*. 14: 6078-6086.
- Caspi, R., M. Pacek, G. Consiglieri, D. R. Helinski, A. Toukdarian ja I. Konieczny. 2001. A broad host range replicon with different requirements for replication initiation in three bacterial species. *EMBO J*. 20: 3262-3271.
- Chattoraj, D.K. 2000. Control of plasmid DNA replication by iterons: no longer paradoxical. *Mol Microbiol*. 37: 467-476.
- Chen J. ja R. P. Novick. 2009. Phage-mediated intergenic transfer of toxic genes. *Science*. 323: 139-141.
- Clatworthy, A. E., E. Pierson ja D. T. Hung. 2007. Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy. *Nat Chem Biol*. 3: 541-548.
- Dahlberg, C. ja L. Chao. 2003. Amelioration of the cost of conjugative plasmid carriage in *Escherichia coli* K12. *Genetics*. 165: 1641-1649
- de la Cruz, F. ja J. Davies. 2000. Horizontal gene transfer and the origin of species: lessons from bacteria. *Trends Microbiol*. 8: 128-133.
- de la Cruz, F., L. S. Frost, R. J. Meyer ja E. L. Zechner. 2010. Conjugative DNA metabolism in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev*. 34: 18-40.
- DeNap, J. C., J. R. Thomas ja P. J. Hergenrother. 2004. Combating drug-resistant bacteria: small molecule mimics of plasmid incompatibility as antiplasmid compounds. *J Am Chem Soc*. 126: 15402-15404.
- Eisenbrandt, R., M. Kalkum, E-M. Lai, R. Lurz, C. I. Kado ja E. Lanka. 1999. Conjugative Pili of IncP Plasmids, and the Ti Plasmid T Pilus Are Composed of Cyclic Subunits. *J Biol Chem*. 274: 22548-22555.
- Fauquet C. M, M. A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger, L. A. Ball. 2005. Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses—Eighth report of the international committee on the taxonomy of viruses. C.M. Fauquet, M.A. Mao, J. Maniloff, U. Desselberger, L.A. Ball, toimittajat. Elsevier Academic Press/San Diego, USA.

- Gerdes, K., P. B. Rasmussen ja S. Molin. 1986. Unique type of plasmid maintenance function: Postsegregational killing of plasmid-free cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83: 3116-3120.
- Gerlitz, M., O. Hrabak ja H. Schwab. 1990. Partitioning of Broad-Host-Range Plasmid RP4 Is a Complex System Involving Site-Specific Recombination. *J Bacteriol.* 172: 6194-6203.
- Gowen, B., J. K. Bamford, D. H. Bamford ja S. D. Fuller. 2003. The tailless icosahedral membrane virus PRD1 localizes the proteins involved in genome packaging and injection at a unique vertex. *J Virol.* 77: 7863-7871.
- Grahn, A. M., J. Haase, E. Lanka ja D. H. Bamford. 1997. Assembly of functional phage PRD1 receptor depends on 11 genes of the IncP plasmid mating pair formation complex. *J Bacteriol.* 179: 4733-4740.
- Grahn, A. M., J. Caldentey, J. K. Bamford ja D. H. Bamford. 1999. Stable packaging of phage PRD1 DNA requires adsorption protein P2, which binds to the IncP plasmid-encoded conjugative transfer complex. *J Bacteriol.* 181: 6689-6696.
- Grahn, A.M., R. Daugelavičius ja D.H. Bamford. 2002. Sequential model of phage PRD1 DNA delivery: active involvement of the viral membrane. *Mol Microbiol.* 46: 1199-1209.
- Haase, J., R. Lurz, A.M. Grahn, D.H. Bamford ja E. Lanka. 1995. Bacterial Conjugation Mediated by Plasmid RP4: RSF1010 Mobilization, Donor-Specific Phage Propagation, and Pilus Production Require the Same Tra2 Core Components of a Proposed DNA Transfer Complex. *J Bacteriol.* 177: 4779-4791.
- Hamilton, H. L. ja J. P. Dillard. 2006. Natural transformation of *Neisseria gonorrhoeae*: from DNA donation to homologous recombination. *Mol Microbiol.* 59: 376-385.
- Holčik, M., V. N. Iyer. 1996. A novel plasmid gene involved in bacteriophage PRD1 infection and conjugative host-range. *Plasmid.* 35: 204-210
- Thatte, V., D. E. Bradley ja V. N. Iyer. 1985. N conjugative transfer system of plasmid pCU1. *J Bacteriol.* 163: 1229-1236.
- Iyer, V. N. 1989. IncN group plasmids and their genetic systems. Promiscuous plasmids of gram-negative bacteria. C. M. Thomas, toimittaja. Academic Press. London. 165-183.
- Jensen, R.B., R. Lurz ja K. Gerdes. 1998. Mechanism of DNA segregation in prokaryotes: Replicon pairing by *parC* of plasmid R1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95: 8550-8555.
- Karhu, N., G. Ziedaite, D. H. Bamford ja J. K. Bamford. 2007. Efficient DNA packaging of bacteriophage PRD1 requires the unique vertex protein P6. *J Virol.* 81: 2970-2979.
- Kariuki, S., G. Revathi, J. Muyodi, J. Mwituria, A. Munyalo, S. Mirza ja A. Hart. 2004. Characterization of multidrug-resistant typhoid outbreaks in Kenya. *J Clin Microbiol.* 42: 1477-1482.
- Konieczny, I., D.R. Helinski. 1997a. Helicase Delivery and Activation by DnaA and TrfA Proteins during the Initiation of Replication of the Broad Host Range Plasmid RK2. *J Biol Chem.* 272: 33312-33318.
- Konieczny, I., D.R. Helinski. 1997b. The replication initiation protein of the Broad-host-range plasmid RK2 is activated by the ClpX chaperone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94: 14378-14382.
- Kostelidou, K., C.M. Thomas. 2000. The Hierarchy of KorB Binding at its 12 Binding Sites on the Broad-host-range Plasmid RK2 and Modulation of this Binding by IncC1 Protein. *J Mol Biol.* 295: 411-422.
- Kotilainen, M.M, A.M. Grahn, J. K. Bamford ja D. H. Bamford. 1993. Binding of Escherichia coli double-stranded DNA virus PRD1 to a receptor coded by an IncP-type plasmid. *J Bacteriol.* 175: 3089-3095.
- Kües, U. ja U. Stahl. 1989. Replication of Plasmids in Gram-Negative Bacteria. *Microbiol Rev.* 53: 491-516.

- Lanka, E. ja P. T. Barth. 1981. Plasmid RP4 specifies a deoxyribonucleic acid primase involved in its conjugal transfer and maintenance. *J Bacteriol.* 148: 769-187.
- Lessl, M., D. Balzer, R. Lurz, V.L. Waters, D.G. Guiney ja E. Lanka. 1992. Dissection of IncP Conjugative Plasmid Transfer: Definition of the Transfer Region Tra2 by Mobilization of the Tra1 Region in *trans*. *J Bacteriol.* 174: 2493-2500.
- Lessl, M., D. Balzer, K. Weyrauch ja E. Lanka. 1993. The Mating Pair Formation System of Plasmid RP4 Defined by RSF1010 Mobilization and Donor-Specific Phage Propagation. *J Bacteriol.* 175: 6415-6425.
- Lujan, S. A., L. M. Guogas, H. Ragonese, S. W. Matson ja M. R. Redinbo. 2007. Disrupting antibiotic resistance propagation by inhibiting the conjugative DNA relaxase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104: 12282-12287.
- Melendez, S. N., I. Hanning, J. Han, R. Nayak, A. R. Clement, A. Wooming, P. Herrera, F. T. Jones, S. L. Foley ja S. C. Ricke. 2010. *Salmonella enterica* isolates from pasture-raised poultry exhibit antimicrobial resistance and class I integrons. *J Appl Microbiol.* doi: 10.1111/j.1365-2672.2010.04825.x
- Merryweather, A., P. T. Barth ja B. M. Wilkins. 1986. Role and specificity of plasmid RP4-encoded DNA primase in bacterial conjugation. *J Bacteriol.* 167: 12-17.
- Meyer, R., M. Hinds ja M. Brasch. 1982. Properties of R1162, a broad-host-range, high-copy-number plasmid. *J Bacteriol.* 150: 552-562.
- Mindich, L., J. Cohen ja M. Weisburd. 1976. Isolation of nonsense suppressor mutants in *Pseudomonas*. *J Bacteriol.* 126: 177-182.
- Mindich, L., D. Bamford, C. Goldthwaite, M. Laverty ja G. Mackenzie. 1982a. Isolation of nonsense mutants of lipid-containing bacteriophage PRD1. *J Virol.* 44: 1013-1020.
- Mindich, L., D. Bamford, T. McGraw ja G. Mackenzie. 1982b. Assembly of bacteriophage PRD1: particle formation with wild-type and mutant viruses. *J Virol.* 44: 1021-1030.
- Nash, R. P., S. Habibi, Y. Cheng, S. A. Lujan ja M. R. Redinbo. 2010. The mechanism and control of DNA transfer by the conjugative relaxase of resistance plasmid pCU1. *Nucleic Acids Res.* 38: 5929-5943.
- Novick, R. P. 1987. Plasmid incompatibility. *Microbiol rev.* 51: 381-395.
- O'Flaherty, S., R. P. Ross ja A. Coffey. 2009. Bacteriophages and their lysins for elimination of insectivorous bacteria. *FEMS Microbiol rev.* 33: 801-819.
- Ogura T. ja S. Hiraga. 1983. Mini-F plasmid genes that couple host cell division to plasmid proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 80: 4784-4788.
- Olsen, R.H., J-S. Siak ja R.H. Gray. 1974. Characteristics of PRD1, a plasmid-dependent broad host range DNA bacteriophage. *J Virol.* 14: 689-699.
- Oscar, T. P., G. K. Rutto, J. B. Ludwig ja S. Parveen. 2010. Qualitative map of Salmonella contamination on young chicken carcasses. *J Food Prot.* 73: 1596-1603.
- Pacek, M., G. Konopas ja I. Konieczny. 2001. DnaA Box Sequences as the Site for Helicase Delivery during Plasmid RK2 Replication Initiation in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 276: 23639-23644.
- Pansegrau, W., D. Baltzer, V. Kruff, R. Lurz ja E. Lanka. 1990a. *In vitro* assembly of relaxosomes at the transfer origin of plasmid RP4. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87: 6555-6559.

- Pansegrau, W., G. Ziegelin ja E. Lanka. 1990b. Covalent Association of the *TraI* Gene Product of Plasmid RP4 with the 5'-Terminal Nucleotide at the Relaxation Nick Site. *J Biol Chem.* 265: 10637-10644.
- Pansegrau, W., W. Schröder ja E. Lanka. 1993. Relaxase (*TraI*) of *IncPa* plasmid RP4 catalyzes a site-specific cleaving-joining reaction of single-stranded DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90: 2925-2929.
- Paterson, E. S., M. I. Moré, G. Pillay, C. Cellini, R. Woodgate, G. C. Walker, V. N. Iyer ja S. C. Winans. 1999. Genetic analysis of the mobilization and leading regions of the *IncN* plasmids pKM101 and pCU1. *J Bacteriol.* 181: 2572-2583.
- Rydman, P. S., J. Caldentey, S. J. Butcher, S. D. Fuller, T. Rutten ja D. H. Bamford. 1999. Bacteriophage PRD1 contains a labile receptor-binding structure at each vertex. *J Mol Biol.* 291: 575-587.
- Rydman P. S. ja D. H. Bamford. 2000. Bacteriophage PRD1 DNA entry uses a viral membrane-associated transglycosylase activity. *Mol Microbiol.* 37: 356-363.
- Rydman, P. S., J. K. Bamford, D. H. Bamford. 2001. A minor capsid protein P30 is essential for bacteriophage PRD1 capsid assembly. *J Mol Biol.* 313: 785-795.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch ja T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual.* 2. painos. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Saunders, N. J., D. W. Hood ja E. R. Moxon. 1999. Bacterial evolution: bacteria play pass the gene. *Curr Biol.* 9: 180-183.
- Seppälä, J., F. Silvenius, J. Grönroos, T. Mäkinen, K. Silvo ja E. Storhammar. 2001. Kirjoloheen tuotanto ja ympäristö. Suomen Ympäristökeskus. Edita Prima Oy. Helsinki.
- Siddique, A. ja D. H. Figurski. 2002. The active partition gene *IncC* of *IncP* plasmids is required for stable maintenance in a broad range of hosts. *J Bacteriol.* 184: 1788-1793.
- Smith, H. W. ja M. B. Huggins. 1983. Effectiveness of phages in treating experimental *Escherichia coli* diarrhoea in calves, piglets and lambs. *J Gen Microbiol.* 129: 2659-2675.
- Smith, H. W., M. B. Huggins ja K. M. Shaw. 1987. The control of experimental *Escherichia coli* diarrhoea of calves by means of bacteriophages. *J Gen Microbiol.* 133: 1111-1126.
- Strömsten, N. J., D. H. Bamford ja J. K. Bamford. 2003. The unique vertex of bacterial virus PRD1 is connected to the viral internal membrane. *J Virol.* 77: 6314-6321.
- Sulakvelidze, A., Z. Alavidze ja J. G. Morris, jr. 2001. Bacteriophage therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* 45: 649-659.
- Taylor, D. E., A. Gibreel, T. D. Lawley ja D. M. Tracz. 2004. Antibiotic Resistance Plasmids. *Plasmid Biology.* B. E. Funnell and G. J. Phillips, toimittajat. AMS Press. Washington D.C. s. 473-491.
- Thomson, V., O. S. Jovanovic, R. F. Pohlman, C-H. Chang ja D. Figurski. 1993. Structure, Function, and Regulation of the *kilB* Locus of Promiscuous Plasmid RK2. *J Bacteriol.* 175: 2423-2435.
- Velappan, N., D. Sblattero, L. Chasteen, P. Pavlik ja A. R. M. Bradbury. 2007. Plasmid incompatibility: more compatible than previously thought? *Protein Eng Des Sel.* 20: 309-313.
- Waters, V. L., B. Strack, W. Pansegrau, E. Lanka ja D. G. Guiney. 1992. Mutational analysis of essential *IncPa* plasmid transfer genes *traF* and *traG* and involvement of *traF* in phage sensitivity. *J Bacteriol.* 174: 6666-6673.
- Weber-Dabrowska, B., M. Mulczyk ja A. Gorski. 2001. Bacteriophage therapy for infections in cancer patients. *Clin Applied Immunol Rev.* 1: 131-134.

Williams, J. J. ja P. J. Hergenrother. 2008. Exposing plasmids as the Achilles' heel of drug-resistant bacteria. *Curr Opin Chem Biol.* 12: 389-399.

Zwietering, M. H., I. Jongenburger, F. M. Rombouts ja K. van 't Riet. 1990. Modeling of the bacterial growth curve. *Appl Environ Microbiol.* 56: 1875-1881.