

Ringkasan dalam bahasa Indonesia

Fenomena ketahanan atas berbagai macam obat (MDR) ialah kemampuan dari sel untuk membangkitkan ketahanan terhadap berbagai molekul-molekul beracun, yang secara struktur tidak saling terkait. MDR disebabkan oleh di(over)ekspresikannya transporter yang membawa molekul-molekul tersebut ke luar dari sel. MDR menyebabkan terjadi berbagai komplikasi pada penanganan, misalnya, kanker atau penyakit-penyakit infeksi. Contoh pengaruh MDR pada penyakit infeksi antara lain adalah pada tuberkolosis (ketahanan berlebih akan obat, XDR-TB) dan *Staphylococcus aureus* (ketahanan akan metisilin, MRSA), yang telah menyebabkan kematian jutaan orang di seluruh dunia. Penggunaan dan penyalahgunaan antibiotik ditenggarai sebagai penyebab timbulnya sejumlah bakteri dengan genom yang termutasi sehingga mengembangkan mekanisme ketahanan, yang memungkinkan mereka untuk bertahan hidup dalam lingkungan yang mengandung antibiotik. Beberapa macam mekanisme ketahanan dapat diidentifikasi sebagai: 1) degradasi dan inaktivasi obat secara enzimatik, 2) perubahan target obat, 3) pencegahan masuknya obat, dan yang terakhir 4) dikeluarkannya obat secara aktif dengan dioverekspresikannya transporter protein membran (MDR transporter) (BAB 1). Analisis sekuensi terhadap beberapa genom bakteri mengungkapkan bahwa transporter yang menyerupai MDR banyak ditemui di alam. Berbagai upaya telah dilakukan untuk menjabarkan fungsi fisiologis dari transporter MDR, termasuk mekanisme transport, pengenalan substrat, dan regulasi ekspresinya (BAB 1).

Regulasi transporter MDR dari bakteri merupakan salah satu aspek yang penting dalam ketahanan atas berbagai obat karena deregulasinya sering kali merupakan penyebab dari fenotip MDR. Regulasi dari sebagian besar transporter MDR pada bakteri terjadi pada tingkat transkripsi, oleh protein-protein regulator lokal maupun global. Secara umum, bakteri memiliki mekanisme ketahanan yang memungkinkannya untuk memberikan respon terhadap keberadaan molekul-molekul beracun disekitarnya. Keberadaan molekul-molekul beracun ini menyebabkan teraktivasinya regulasi transporter MDR di dalam sel, yang sebelumnya diekspresikan secara terbatas. Contohnya adalah dua protein yang telah terkaraktisasi secara lengkap, yaitu aktivator transkripsi BmrR dari *Bacillus subtilis* dan represor transkripsi QacR dari *Staphylococcus aureus* yang masing-masing meregulasi ekspresi pompa efluks MDR Bmr dan QacA (BAB 1). Regulator MDR secara khas mempunyai dua domain; pada ujung N- adalah

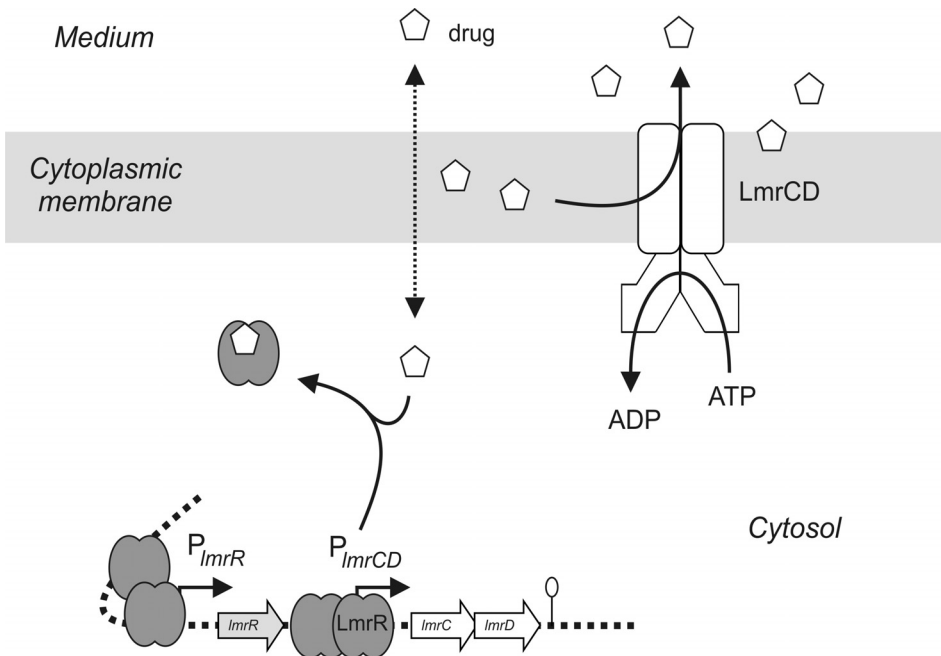
domain untuk pengikatan DNA dan pada ujung C- adalah domain untuk pengikatan ligan. Fitur umum dari domain untuk pengikatan DNA adalah adanya motif heliks-putar-heliks (HTH). Klasifikasi lebih lanjut dari regulator-regulator MDR didasarkan pada keterdekatan sekuen pada domain untuk pengikatan DNA, dan atas dasar inilah ada empat kelompok regulator MDR: AraC, MarR, MerR, dan TetR. Yang menarik adalah, baru-baru ini ditemukan suatu indikasi bahwa Ladr dari *Listeria monocytogenes* dan LmrR dari *Lactococcus lactis* termasuk ke dalam keluarga regulator transkripsi PadR, yang sebelumnya tidak termasuk ke dalam MDR. Tidak seperti halnya transporter MDR yang terikat pada membran, regulator transkripsi merupakan protein terlarut dan secara relatif dapat dioverekspresikan secara langsung dalam jumlah besar. Karakterisasi struktur dan fungsi dari regulator transkripsi MDR ini menjadi penting karena protein ini sering kali mengenali substrat yang sama jumlahnya dengan transporter yang mereka regulasikan. Fitur ini menjadikan regulator transkripsi sebagai kandidat ideal untuk mempelajari dasar-dasar molekular dalam pengenalan berbagai macam obat oleh bakteri. Wawasan baru yang didapatkan akan sangat berguna untuk pengembangan senyawa-senyawa antimikroba.

Lactococcus lactis merupakan bakteri asam laktat yang gram positif dan banyak digunakan dalam produksi makanan-makanan hasil fermentasi. Dalam genomnya terdapat sekitar 40 gen putatif transporter MDR, yang beberapa diantaranya terlibat dalam proses, yang bergantung pada energi, pengeluaran senyawa-senyawa lipofilik yang tak terkait dan beracun. Sebagai contoh, transporter LmrP sekunder bergantung pada kekuatan motif proton untuk mengeluarkan sekelompok jenis obat, sementara transporter-transporter LmrA (3) dan LmrCD (2) yang memiliki kaset pengikatan ATP (ABC) memanfaatkan energi yang terbebaskan dalam proses hidrolisis ATP untuk menjalankan fungsi yang setara. Penelaahan inaktivasi gen akhir-akhir ini menyarankan bahwa LmrC dan LmrD bertanggung jawab atas sifat resistensi akan berbagai macam obat yang intrinsik pada *L. lactis*. Keduanya tergolong pada setengah transporter ABC yang mengalami heterodimerisasi untuk membentuk transporter MDR yang fungsional. Overekspresi LmrCD menimbulkan perlindungan selular terhadap pengaruh racun dari berbagai macam obat yang dicobakan, sebagai contoh daunomisin, etidium bromida, dan Hoechst 33342 (BAB 2), sedangkan penghilangan gen *lmrCD* dari genom *L. lactis* galur NZ9000 menghasilkan sel yang sangat sensitif terhadap obat-obatan tersebut. Lebih lanjut, fenotip yang memiliki ketahanan dari galur Δ *lmrCD* dapat dikembalikan keasalnya dengan overekspresi *lmrCD* secara trans. Menariknya, overekspresi gen *lmrA* tidak memberikan pengaruh dan menghasilkan sel yang lebih rentan terhadap obat (BAB 2) Analisis susunan DNA dari keempat galur MDR dari *L. lactis* yang ditumbuhkan dalam keberadaan daunomisin,

etidium bromida, kolat, dan rodamin 6G dengan konsentrasi yang meningkat mengungkap regulasi naik yang terjadi secara signifikan dari gen *lmrC* dan *lmrD*, juga dari sebuah gen pada hulu *lmrCD* yang disebut *lmrR* (regulator ketahanan ganda atas obat pada *Lactococcus*) yang sebelumnya dikenal sebagai *ydaF*. Analisis urutan nukleotida menunjukkan terjadinya pergeseran kerangka dan mutasi tertentu pada gen *lmrR* di empat galur MDR yang menyebabkan diproduksi varian LmrR yang tidak fungsional. Hasil-hasil tersebut menyarankan suatu kemungkinan peran LmrR dalam regulasi turun pada ekspresi *lmrCD* dan *lmrR* di *L. lactis* (BAB 2).

Secara homologi LmrR termasuk ke dalam keluarga regulator transkripsional PadR. Regulator PadR berperan dalam meregulasi pengekspresian gen asam fenolik dekarboksilase (*pad*) untuk menghilangkan pengaruh racun dari turunan asam-asam fenolik, seperti asam p-kumarat, asam ferulik, dan asam kafeik (1). Banyak anggota keluarga PadR yang berkerabat secara dekat dengan keluarga ketahanan akan berbagai antibiotik MarR yang ditemukan pada bakteri dan arkea. Analisis transkriptom dari galur Δ *lmrR* menunjukkan terjadinya secara signifikan regulasi naik dari gen *lmrC* dan *lmrD* namun tidak dari gen lainnya (BAB 3). Hasil ini menunjukkan bahwa LmrR adalah regulator transkripsi local yang khusus untuk gen *lmrCD* dan mengkonfirmasi catatan sebelumnya bahwa LmrCD merupakan transporter utama yang bertanggung jawab atas fenotip MDR yang didapatkan dari berbagai galur MDR *L. lactis* terpilih. Karakterisasi lanjutan menunjukkan bahwa LmrR asalan berikatan dengan dua sisi yang berbeda pada daerah promoter *lmrCD*; sisi I terletak diantara daerah -35 dan -10 dimana sisi II memiliki motif dua perulangan terbalik yang tidak sempurna, yang hampir serupa dengan sisi pengikatan PadR pada promoter *padA* (BAB 3). Uji pengikatan obat secara langsung menunjukkan bahwa terjadinya pengikatan obat ini memberikan sinyal induksi untuk ekspresi gen *lmrCD*. Suatu model sederhana mengenai regulasi ekspresi gen *lmrCD* oleh LmrR diuraikan sebagai berikut: ketika molekul obat yang bersifat hidrofobik hadir di lingkungan dan memasuki sel, LmrR yang terikat pada DNA mengikat molekul obat tersebut dan mengalami perubahan konformasi yang menyebabkannya terlepas dari sisi operator pada gen *lmrCD* dan saat itu juga RNA polymerase dapat memulai transkripsi *lmrCD*. LmrCD akan mengeluarkan molekul obat dari sel dan, karena konsentrasi obat dalam sel menurun, kembali ke kondisi apo dan berikatan kembali dengan sisi operator diikuti dengan menekan gen *lmrCD*. Analisis transkriptom dari berbagai galur MDR yang diisolasi secara independen juga menunjukkan peningkatan tingkat transkripsi gen *lmrR* yang signifikan. Salah satu varian LmrR yang memiliki mutasi tertentu (T82I) tidak mampu berikatan dengan daerah promoter pada kedua gen *lmrCD* dan *lmrR*, dan juga tidak mampu mengikat obat Hoechst 33342. Pencocokan sekuen LmrR

dengan regulator PadR/MarR lainnya menunjukkan bahwa residu ini sangat terlestarikan (BAB 5) dalam keluarga protein ini. Analisis reaksi polimerase berantai – waktu berbalik (RT-PCR) dari keempat galur MDR yang sebelumnya ditumbuhkan dalam media yang bebas dari obat menunjukkan ekspresi gen *lmrCD* dan *lmrR* secara konstitutif karena sel-selnya kekurangan protein LmrR yang fungsional. Hasil ini mengindikasikan secara kuat bahwa ekspresi gen *lmrCD* dan *lmrR* melalui dua mekanisme regulasi yang berbeda pada *L. lactis*. Yang menarik, banyak regulator PadR terlibat dalam degradasi dan detoksifikasi asam fenolik secara enzimatik, dimana LmrR mengregulasi ekspresi tranporter MDR yang mengeluarkan molekul beracun dari dalam sel (gambar 1 dan BAB 3).

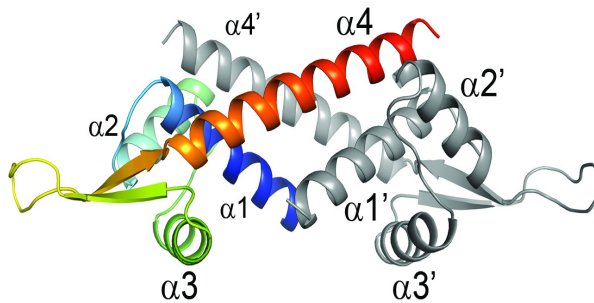


Gambar 1. Mekanisme ketahanan akan obat di *L. lactis*. Saat obat atau molekul beracun tidak ada, LmrR dalam berbagai tingkat oligomerisasi berturut-turut berikatan dengan DNA kontrol dari *lmrCD* dan *lmrR*. Ketika sel bertemu dengan senyawa beracun dalam lingkungan tumbuhnya, senyawa ini masuk ke dalam sel dan berikatan dengan dimer LmrR secara stoikiometri. Keadaan ini kemungkinan besar akan menyebabkan terlepasnya LmrR dari urutan operator *lmrCD* dan akibatnya *lmrCD* akan tertekan. ABC transporter LmrCD yang kemudian terbentuk pada membran sel akan mengeluarkan obat dari dalam sel dan dengan demikian meringankan mekanisme penekanan *lmrCD*. Sebaliknya, awal transkripsi *lmrR* nampaknya tidak dipengaruhi oleh keberadaan obat. Berbagai protein LmrR berikatan dan mengubah daerah operator *lmrR*, dan menyebabkan penekanan ekspresi *lmrR* melalui suatu mekanisme yang belum jelas.

Sebagian besar senyawa sintetik yang dikenali oleh transporter MDR memiliki karakter yang serupa dengan molekul alami yang ditemui oleh bacteria dilingkungannya. Sebagai contoh, molekul yang terlibat dalam pengenalan lingkungan akan senyawa antimikroba yang dikeluarkan oleh tanaman dapat menjadi substrat bagi transporter-transporter yang menyerupai MDR. Transporter MDR mungkin berasal dari transporter-transporter yang terlibat dalam sekresi molekul alami dan pada saat dioverekspresikan, mereka dapat ikut serta dalam mekanisme pertahanan diri. Pemetaan sisi pemulaian transkripsi pada gen *lmrCD* dan *lmrR* mengungkapkan adanya perbedaan mekanisme regulasi yang terlibat bagi kedua gen. Gen *lmrCD* dan *lmrR* tersusun dalam operon yang berbeda. Namun demikian, pintasan transkrip yang mengandung semua gen maupun tiga transkrip utama dengan panjang berbeda yang diamati, kesemuanya memiliki gen *lmrCD* yang lengkap. Analisis in-silico tidak mengidentifikasi adanya terminator internal hilir *lmrR*. Beragam transkrip *lmrCD* yang ditemui kemungkinan mewakili perbedaan respon terhadap induser dan kondisi yang berbeda dalam sel, walaupun hipotesis ini masih memerlukan validasi melalui penelaahan lebih lanjut. Alternatifnya, transkrip yang lebih panjang tidak stabil dan cenderung mengalami degradasi dari ujung 3'. Perbedaan signifikan pada mekanisme pengikatan oleh LmrR ke daerah promoter *lmrCD* dan *lmrR* tersingkap dan ditampilkan oleh mikroskop berkekuatan atomic. Pengikatan LmrR ke promoter *lmrR* mengakibatkan perubahan besar-besaran DNA dalam arti melingkungan dan pelingkupan DNA karena interaksi protein dan DNA secara berlebihan. Penandaan “dalam gel” mengkonfirmasi perlindungan berlebih promoter *lmrR* pada pengikatan LmrR. Data ini menyarankan ekspresi *lmrR* yang diregulasi dengan ketat. Di sisi lain, pengikatan LmrR pada daerah kontral *lmrCD* hanya menghasilkan pelengkungan DNA dengan jelas (BAB 4). Sel perlu untuk merespon dengan cepat perubahan-perubahan yang ditemui dalam lingkungan. Oleh sebab itu, penekanan *lmrCD* oleh LmrR yang tidak rumit ini mungkin merupakan cara yang efektif untuk meregulasi ekspresi *lmrCD* sementara jaringan regulasinya diselaraskan dan dilengkapkan melalui ekspresi *lmrR* secara ketat. Lebih jauh, ekspresi *lmrR* yang tidak terkontrol akan mengurangi kesensitifan mekanisme sensor yang akan mengatur regulasi ekspresi *lmrCD* yang bergantung pada obat (BAB 4).

Transporter MDR mampu mengikat dan mengeluarkan berbagai macam senyawaan yang tidak saling terkait, dengan demikian menjadikannya mekanisme pertahanan utama pada bakteri. Overekspresi transporter ini dalam banyak hal bertanggung jawab atas munculnya galur-galur MDR. Oleh sebab itulah, pemahaman akan struktur dari MDR dapat menyediakan informasi berharga tentang mekanisme pengenalan dan transport obat, dan membuka pendekatan baru

untuk pengembangan obat baru. Namun demikian, protein-protein membran sulit untuk dikristalkan karena mereka tidak larut dalam air dan cenderung mengagregasi. Di lain pihak, analisis struktur dan fungsi dari protein regulator MDR memperluas wawasan mengenai salah satu aspek MDR yang paling menarik, yaitu pengenalan akan berbagai macam obat. Struktur kristal LmrR yang bebas dan berikatan dengan Hoechst 33342 atau daunomisin dielusidasi dengan resolusi 2.0 Å dan 2.2 Å. LmrR memiliki topologi $\alpha 1$ - $\alpha 2$ - $\alpha 3$ - $\beta 1$ - $\beta 2$ - $\alpha 4$ dalam dua domain berbeda. Domain pengikatan DNA pada ujung N dari LmrR terbangun dari motif heliks-putar-heliks yang khas dari regulator transkripsi yang terkait dengan MDR pada bakteri, sedang ujung C terdiri dari sebuah pori tengah berbentuk rata berukuran besar untuk pengikatan ligan (Gambar 2).



Gambar 2. Struktur protein LmrR dielusidasi dengan resolusi 2.0 Å. LmrR mempunyai pori tengah yang besar dimana reaksi pengikatan obat terjadi.

Fitur ini unik karena tidak ada satupun regulator transkripsi yang terkait dengan MarR/PadR yang telah dikarakterisasi sebelumnya memiliki pori tengah pada daerah antar muka dimernya. Terlebih lagi, sisi pengikatan LmrR berbentuk simetris dimana kedua sub unit memberikan kontribusi yang setara kepada struktur ini, tidak seperti pada sisi pengikatan obat pada BmrR dari *B. subtilis* atau QacR dari *S. aureus* yang tidak simetris dan terbentuk dari sebuah sub unit tunggal. Ketika pengikatan obat terjadi, system cincin dari molekul Hoechts 33342 atau daunomisin yang rata terjepit diantara W96 dan rantai samping W96 membentuk tumpukan interaksi aromatis dimana setiap cincin pada kedua system indol tanpa adanya ikatan hydrogen antara obat dan LmrR teramati. Lebih jauh, analisis mutagenesis terarah mengkonfirmasi pentingnya peran W96 dalam pengikatan obat

dan DNA (BAB 5). Dengan membandingkan LmrR dalam keadaan bebas dan mengikat obat, beberapa perubahan orientasi dalam struktur teramati. Ketika dimer LmrR yang terikat kepada Hoechst 33342 atau daunomisin dibandingkan dengan bentuk bebasnya, salah satu domain wHTH berputar berlawanan arah relatif terhadap wHTH dari sub unit yang lain. Perputaran ini diikuti dengan perubahan ruang antara kedua heliks pengenalan DNA. Perbedaan lainnya adalah arah dari residu-residu dari satu sub unit relatif terhadap residu-residu dari sub unit lain teramati di dalam pori pengikatan yang mempengaruhi struktur dari sisi pengikatan obat. Perubahan-perubahan ini diperkirakan memancing hilangnya kemampuan pengikatan LmrR untuk mengatur DNA menyebabkan terjadinya regulasi naik transporter MDR LmrCD. Struktur kristal LmrR yang berikatan dengan DNA merupakan tantangan dan diperlukan untuk menyibak dasar molecular dari mekanisme penekanan ekspresi *lmrCD* oleh transkripsi penekan LmrR di *L. lactis*.

