

**A bakteriális antibiotikum rezisztencia *de novo*
evolúciója és járulékos következményei**

Ph.D. értekezés

Spohn Réka

Témavezető: Dr. Pál Csaba

Biológia Doktori Iskola

**MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Biokémiai
Intézet**

SZTE-TTIK

Szeged

2018.

Tartalomjegyzék

Rövidítések	3
I. Bevezetés: a multidrog rezisztencia okozta egészségügyi krízis	4
II. Irodalmi áttekintés.....	9
II.1. Az antibiotikumok általános jellemzése és csoportosítása	9
II.2. Az aminoglikozid antibiotikumok összetett hatásmechanizmusa	11
II.3. A bakteriális antibiotikum rezisztencia molekuláris mechanizmusai	12
II.4. Az aminoglikozid rezisztencia egyedi jellegzetességei.....	19
II.5. Laboratóriumi evolúciós kísérletek	21
II.6. Az antibiotikum rezisztencia kialakulásának vizsgálata kólibaktériumban	24
II.7. Fiziológiás és evolúciós antibiotikum kölcsönhatások	26
III. Célkitűzés.....	29
IV. Anyag és Módszer	30
IV.1. Alkalmazott antibiotikumok, tápoldat és baktérium törzsek.....	30
IV.2. Laboratóriumi evolúciós kísérlet.	31
IV.3. Teljes genom szekvenálás.	32
IV.4. Mutációs ráta mérése fluktuációs teszttel.....	33
IV.5. Az antibiotikum rezisztencia spektrum nagy áteresztőképességű szűrése.	34
IV.6. Kémiai és kemogénomikai profil hasonlósági vizsgálatok	38
IV.7. Egyedi mutánsok létrehozása.....	39
IV.8. Bakteriális membránpotenciál mérése	40
IV.9. Hoechst akkumulációs mérés.....	41
IV.10. Minimális gátló koncentráció (MIC) mérése hígítási soron, valamint E-teszt csíkok segítségével.....	41
IV.11. AcrAB efflux pumpa overexpressziós és deléziós vizsgálatok.....	42
V. Eredmények.....	43
V.1. Nagyléptékű laboratóriumi evolúciós kísérlet az egyes antibiotikumokkal szemben magas rezisztenciával rendelkező törzsek létrehozására.	43
V.2. Az adaptív mutációk domináltak a laboratóriumi evolúcióval létrehozott antibiotikum rezisztens vonalakban.	44
V.3. A funkcióvesztéssel mutációk rendkívül elterjedtek	47
V.4. A párhuzamos evolúció bizonyítékai	49

V.5. Az adaptált vonalak antibiotikum rezisztencia spektrumának nagy áteresztőképességű szűrése.....	52
V.6. Az egyetlen antibiotikummal történő kezelés is gyakran multidrog rezisztenciához vezet	53
V.7. A keresztrezisztencia kölcsönhatásokért részben a párhuzamos evolúció felel ...	56
V.8. Az antibiotikumok sajátosságainak hatása a keresztrezisztencia kölcsönhatások kialakulására	59
V.9. A multidrog rezisztens baktériumok Achilles-sarka, azaz a járulékos érzékenység	62
V.10. Többszintű mechanizmus az aminoglikozid rezisztencia hátterében.....	63
V.11. Az aminoglikozid-adaptált vonalak mutációinak kettős hatása a membrán permeabilitásra.....	65
V.12. A <i>trkH</i> gén egyetlen pontmutációja is széleskörű járulékos érzékenységhoz vezet.....	67
V.13. A járulékos érzékenység részben az AcrAB efflux rendszerhez köthető	69
VI. Az eredmények megvitatása	71
VII. Gyakorlati következtetések: lehetőségek a multidrog rezisztencia megfékezésére ...	75
Köszönetnyilvánítás	78
VIII. Szakirodalmi hivatkozások	79
Saját publikációk jegyzéke.....	99
Összefoglalás	102
Summary	105
Függelék	108

Rövidítések

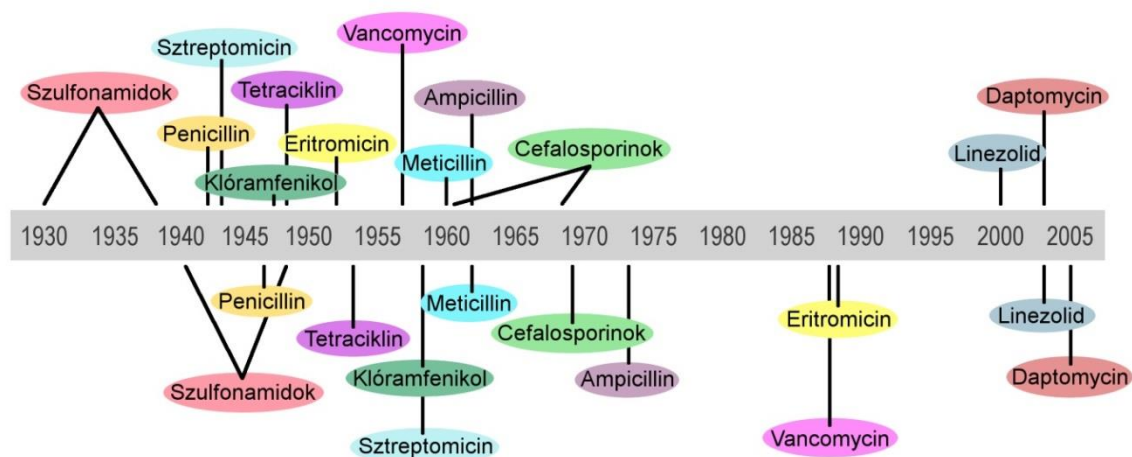
AMP	ampicillin
CFU	össz-sejtszám (colony forming unit)
CHL	klóramfenikol
CPR	ciprofloxacín
DOX	doxiciklin
ERY	eritromicint
FDA	USA Élelmiszerbiztonsági és Gyógyszerészeti Hivatala (Food and Drug Administration)
FOX	cefoxitin
gDNS	genomi DNS
KAN	kanamicin
LPS	lipopoliszacharid
LTEE	hosszútávú evolúciós kísérlet (Long-Term Experimental Evolution)
Mar	„multiple antibiotic resistance” fenotípus
MEGA-lemez	mikrobiális evolúció és növekedési aréna (microbial evolution and growth arena)
MIC	minimális gátló koncentráció (minimum inhibitory concentration)
NAL	nalidixsav
NIT	nitrofurantoin
OD	optikai sűrűség (optical density)
ORF	nyitott leolvasási keret (open reading frame)
RND	rezisztencia nodulációs osztódási (resistance nodulation division) efflux pumpák családja
R.P.M.	percenkénti fordulatszám (revolutions per minute)
SCV	kis kolóniás variánsok (small colony variants)
TET	tetraciklin
TOB	tobramicin
TRM	trimetoprim
WHO	Egészségügyi Világszervezet (World Health Organization)

I. Bevezetés: a multidrog rezisztencia okozta egészségügyi krízis

Az antibiotikumok terápiás alkalmazása rendkívüli mértékben járult hozzá a várható életkor növekedéséhez¹. Antibiotikumok nélkül nem csupán a bakteriális fertőzéseket nem tudnánk kezelni, hanem ellehetetlenülnének a rákterápiás kezelések, a transplantációk és más immunszuppressziós eljárások, az invazív sebészeti beavatkozások, valamint a koraszülöttek ellátása is¹. Nem kell messzire mennünk, hogy szembesüljünk az antibiotikumok hiányának tragikus következményeivel: az erőforrás hiánnyal küszködő országokban a bakteriális fertőzések okozzák a második legtöbb halálesetet, a gyermekhalálozások 60%-áért a bakteriális fertőzések felelősek^{1,2}. Az antibiotikum rezisztencia terjedése által okozott közegészségügyi kockázatot tehát nem lehet eleget hangsúlyozni.

A bakteriális antibiotikum rezisztencia alacsony szinten megjelenhet a természetes populációkban is, az egyes antibiotikumok klinikai alkalmazását követően azonban néhány éven belül általánosan elterjedhet (1. ábra)^{3,4}. Például míg a penicillinre szinte az összes Gram-pozitív baktérium érzékeny volt az 1940-es években, manapság szinte az összes fertőzést okozó Gram-pozitív baktérium, például a *Staphylococcus aureus*, penicillin-rezisztens, és 50%-uk a penicillin erősebb utódjával, a meticillinrel szemben is ellenállóvá vált⁴. A meticillin-rezisztens fertőzések kezelésére ezért ismét egy új antibiotikumot, a vancomycint vezették be, azonban a leggyakoribb kórházi fertőzéseket okozó *Staphylococcus aureus*-nál már erre a szerre is megjelent a rezisztencia⁴. A vancomycin-rezisztens *S. aureus* törzsek kezelésére kifejlesztett linezoliddal szemben már szintén megjelent a rezisztencia, bár még széleskörben nem terjedt el⁴.

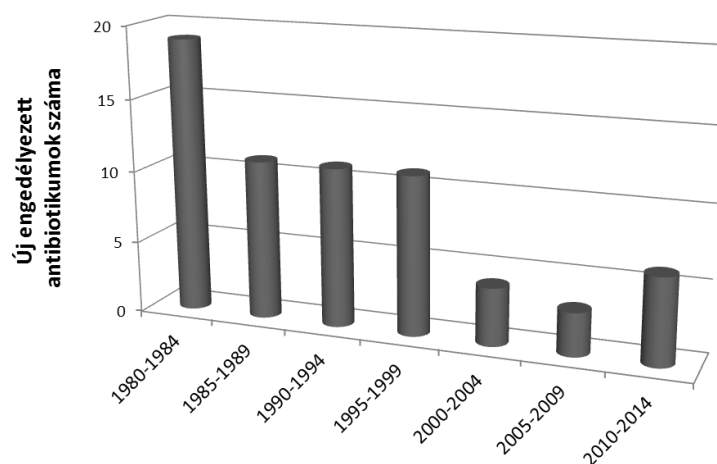
Antibiotikum klinikai alkalmazásának kezdete



Antibiotikum rezisztencia megjelenése

1. ábra. A legfontosabb antibiotikumok bevezetésének és a rezisztencia megjelenésének időpontjai (Clatworthy és mtsai, 2007, valamint Palumbi, 2001)

Az új patogének megjelenése és az antibiotikum rezisztencia egyre növekvő elterjedése a baktérium populációkban folytonos emlékeztető számunkra, hogy a mikróbák élő szervezetek, melyek olyan gyorsasággal tudnak evolválódni, ami hatással van az egészségügyi beavatkozások sikerére⁵. Ezeket az evolúciós változásokat ráadásul rendkívüli módon felgyorsította az emberi beavatkozás: az antibiotikumok nagymértékű, sokszor felesleges alkalmazása erős szelekciós nyomást biztosít a rezisztencia kialakulásának irányában⁴. Ezt felismerve a leghatékonyabb, végső megoldásként (last resort) alkalmazott antibiotikumok, például a vancomycin használatát erősen korlátozták, és csak abban az esetben alkalmazzák, ha minden más antibiotikum hatástalannak bizonyul⁴. A leghatékonyabb szerek visszatartása csökkenti a baktériumokkal szembeni szelekciós nyomást, így eredményesen növeli ezen antibiotikumok, például a vancomycin hatékony alkalmazhatóságának időtartamát^{4,6}. Ennek ellenére ennek a stratégiának a sikeressége számos terület együttműködésén múlik: a használatra vonatkozó korlátozásoknak meg kell valósulnia mind az antibiotikum gyártásban, mind az állattenyésztésben, valamint más megelőző kezeléseknél is⁴. Ha tehát nem veszünk tudomást az antibiotikum rezisztencia evolúciójának gyorsaságáról, továbbra is hátrányos helyzetből próbáljuk költséges eszközökkel utolérni a baktériumok fejlődését, miközben egyre több kezelés bizonyul hatástalannak⁴. Mivel az emberiség hatása az evolúció gyorsaságára nem valószínű, hogy egykönnyen korlátozható, kénytelenek vagyunk az antibiotikum evolúció alapjainak megértése által szerzett tudással új stratégiákat kidolgozni a rezisztencia kialakulásának elkerülésére⁴.

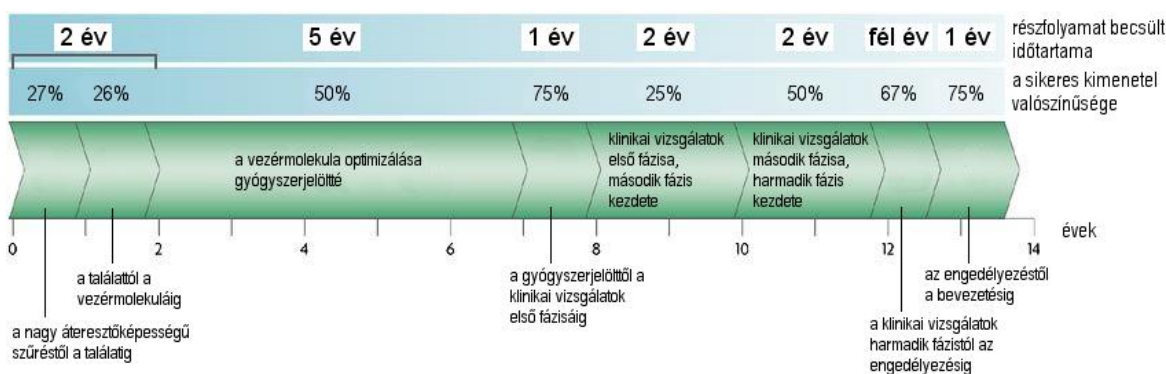


2. ábra. Az újonnan engedélyezett antibakteriális terápiás szerek száma ötévenkénti bontásban (Ventola, 2015 nyomán)⁸.

Miközben a rezisztens baktériumok okozta kezelhetetlen fertőzések valós közegészségügyi veszélyt jelentenek, az új és a rezisztens baktériumokkal szemben is hatékony antibiotikumok felfedezése rendkívül lelassult (**2. ábra**)^{7,8}. Új, ígéretes vezérmolekulák azonosítására alkalmas hatékony platform hiányában pedig a rezisztens patogének korlátok nélkül fejlődhetnek ki és terjedhetnek el⁷. Szinte az összes ma

használatban lévő antibiotikumot az antibiotikum felfedezés aranykorában, az 1940-estől az 1960-as évekig fedezték fel, vagy az akkoriban azonosított antibiotikumok egyikének a származéka⁷. Az antibiotikum fejlesztés lelassulásának hátterében gazdasági és szabályozási indokok egyaránt megfigyelhetők⁸. Ezeknek következtében a 18 legnagyobb gyógyszeripari cégből 15 felhagyott az antibiotikum kutatás területével^{8,9}. A gyógyszeripari cégek egymásba olvadása szintén jelentősen csökkentette a kutatócsoportok számát és változatosságát^{8,10}. Az antibiotikumokra irányuló akadémiai kutatások számát pedig a gazdasági válság okozta megszorítások csökkentették^{8,10}.

Az antibiotikum fejlesztést ma már nem tartják gazdaságilag kifizetődő befektetésnek a gyógyszeripari cégek⁹. Mivel az antibiotikumokat viszonylag rövid ideig kell alkalmazni és gyakran gyors gyógyuláshoz vezetnek, ezért az antibiotikumok gyártása gyakran nem jár közel sem annyi haszon termelődésével, mint más krónikus betegségek gyógyszereinek gyártása, így a legtöbb gyógyszeripari cég inkább ez utóbbi gyógyszerek fejlesztésébe fektet^{8,11}. Tovább csökkenti az antibiotikumok fejlesztésének és gyártásának megtérülését, hogy az antibiotikumok a többi, krónikus betegségeket kezelő gyógyszerhez képest általában alul vannak árazva, ami akár több nagyságrend különbséget is jelenthet az árakban⁹⁻¹¹. Mindezek mellett, amennyiben kifejlesztésre kerül egy olyan új antibiotikum, mely a rezisztens fertőzésekkel szemben is hatékony, az adott antibiotikumot végső megoldásként (last resort) alkalmazott antibiotikumként tartják számon, s ennél fogva kizárólag végszükség esetén alkalmazzák⁸. Ezzel az orvosoknak természetesen az a céljuk, hogy az új szerrel szemben minél tovább előzzék meg a rezisztencia megjelenését és elterjedését, azonban ezzel párhuzamosan ez a gyakorlat ellehetetleníti az antibiotikum kifejlesztésének a megtérülését¹⁰. A rezisztencia ráadásul minden elővigyázatosság ellenére előbb-utóbb felüti a fejét minden új szerrel szemben kémiai struktúrától vagy molekuláris célponttól függetlenül, csak az a kiszámíthatatlan, hogy ehhez vajon mennyi idő szükséges^{11,12}. Ezen okoknak köszönhetően sok gyógyszeripari cég tart attól, hogy az új antibiotikumok fejlesztésébe fektetett dollármilliók nem térülnek meg⁸.



Amit az antibiotikum fejlesztésben még ennél is kevésbé értékelnek, az az, hogy mennyire nagy kihívás technikailag egy új antibiotikum fejlesztése, valamint hogy ehhez milyen sok befektetett időre és munkára van szükség **(3. ábra)**¹². Egy korai ígéretes molekula jelöltből egy emberekben is alkalmazható gyógyszert fejleszteni olyan alapvető tudományos és technikai kihívás, melynek nehézségein sem a közérdek, sem irányelvek, sem a kereskedelmi környezet megváltozása nem tud segíteni¹². Új kémiai struktúrájú és hatásmechanizmusú antibiotikumok hiányában a jelenleg a klinikai vizsgálatok különböző fázisaiban szereplő szerek szinte mind a már jól ismert, alkalmazásban lévő antibiotikumok származékai, melyekre a rezisztencia mechanizmusok már széles körben elterjedtek¹². Ilyen alapfelállásból pedig nehéz lesz megszorongatni a baktériumokat, melyek akár órák alatt is képesek alkalmazkodni a változó körülményekhez¹².

Azon gyógyszeripari cégek, melyek továbbra is vagy éppen új résztvevőként folytatják az új antibiotikumok fejlesztését további akadállyal találhatják szemben magukat: az engedélyezési folyamat bürokratikus lépéseivel^{10,11}. A folyamat buktatói között szerepel a bürokratikus nehézségeken túl az átláthatóság hiánya, az országok közötti eltérések az előírt klinikai vizsgálatokban, a szabályozási és engedélyezési előírások folyamatos változása és az ineffektív kommunikáció^{8,10}. Az USA Élelmiszerbiztonsági és Gyógyszerészeti Hivatala (Food and Drug Administration, FDA) az antibiotikumok klinikai vizsgálatát különösen megkönnyítette¹³. Az antibiotikumok placebo-val való összehasonlítása a klinikai vizsgálatok során etikátlan, így az új gyógyszerjelölteknek a már meglévő antibiotikumokkal egyenértékű vagy erősebb hatását kell a vizsgálatok során bizonyítani¹³. Ehhez azonban nagyon nagy mintaelemszám szükséges, ami így a klinikai vizsgálatok egyébként is magas költségeit még tovább növeli^{8,10,13}. Miközben a nagy gyógyszeripari cégek kilépése utáni űrt az antibiotikum fejlesztésben új, kisebb cégek kezdték el kitölteni, a klinikai vizsgálatok hármas fázisának komplexitása és költségei túlszárnyalják ezen kisebb cégek anyagi lehetőségeit¹⁰. Ezt a problémát felismerve az FDA belekezdett egy új, részletesebb és könnyebben követhető irányelv kidolgozásába a klinikai vizsgálatok elvégzéséről, melyben törekednek a statisztikai pontosság megtartása mellett a mintaelemszám minimalizálására⁸. Felmerült továbbá annak a lehetősége is, hogy gyorsított klinikai vizsgálatok mellett az új antibiotikum jelöltek minél hamarabb alkalmazhatóak legyenek a magas rizikójú betegek esetében, amikor az új hatóanyag előnyei túlmutatnak az esetleges váratlan mellékhatások hátrányain⁸. Az ilyen gyors, limitált engedélyezések gyakorlata már jelenleg is ismert néhány ritka betegség kezelésénél^{10,11}.

Habár az antibiotikum rezisztens törzsek keletkezése és elterjedése kiszámíthatatlan, ugyanakkor elkerülhetetlen is, ezért felkészültnek kell lennünk¹². Annak ellenére, hogy az antibiotikum rezisztencia jelensége régóta ismert, a rezisztencia kialakulásának folyamatáról és járulékos hatásairól korlátozottak az ismereteink. Az antibiotikum rezisztencia evolúcióját gyakran segítik az antibiotikum terápia során a bakteriális genomban felhalmozódó mutációk¹⁴. Ezen mutációk felhalmozódása az első lépéseként

szolgálhat a nagymértékű, klinikumban is megfigyelhető szintű rezisztenciát biztosító specifikusabb rezisztencia mechanizmusok megjelenésének¹⁵⁻¹⁷. Ezek a rezisztencia mutációk ugyanakkor potenciálisan befolyásolhatják a baktérium érzékenységét számos más antibiotikummal szemben is¹⁸. A multidrog rezisztencia és a hiperérzékenység evolúciójának megértését a kutatási terület központi kérdéseként tartják számon¹⁴. Ezen jelenségek megértése valóban rendkívüli módon hozzájárulhat a jövőben olyan terápiás stratégiák kidolgozásához, mellyel a rezisztencia kialakulása megakadályozható. Például az optimális antibiotikum kombinációk kiválasztásához nem elegendő az antibiotikumok fiziológiás kölcsönhatásainak ismerete, az azokkal szemben megjelenő rezisztencia mutációk pleiotróp fitness hatásának feltérképezése legalább ennyire fontos, ha nem fontosabb^{14,19,20}. Az egyértelmű klinikai relevancia ellenére a rezisztens baktériumok megváltozott érzékenységi profilját egy több, mint 60 éve elvégzett úttörő fenomenológiai vizsgálatot leszámítva egészen a közelmúltig senki nem vizsgálta²¹. Az ezt az úttörő vizsgálatot követő további mikrobiológiai vizsgálatok hiánya két okból is meglepő: egyrészt már korábban is felismerték, hogy az antibiotikum rezisztencia fitness költséggel jár stresszmentes környezetben²²; másrészt a hiperérzékenységet, más néven járulékos érzékenységet széleskörben vizsgálták már rák kemoterápiás kutatásokban²³. A közelmúlt technológiai fejlődése a laboratóriumi automatizáció és a teljes-genom szekvenálás területén lehetővé tette a járulékos érzékenység rendszerszintű vizsgálatát²⁴. Ennek köszönhetően jelen tanulmányunk számos rendszerszintű vizsgálatot jelent meg szoros egymásutánban²⁵⁻²⁸, s jelenleg is számos kutatás fókuszál a járulékos érzékenység klinikai hasznosíthatóságának lehetőségeire.

II. Irodalmi áttekintés

II.1. Az antibiotikumok általános jellemzése és csoportosítása

Jelenlegi ismereteink az antibiotikumok hatásmechanizmusáról főként az antibiotikumok sejtbeli célpontjaira és az azokkal folytatott kölcsönhatásra fókuszálnak^{29,30}. Így amennyiben hatásmechanizmus alapján szeretnénk csoportosítani az antibiotikumokat, sokszor valójában a sejtbeli célpont alapján soroljuk őket kategóriákba, antibiotikum osztályokba (**1. táblázat**). Emellett azonban tágabb besorolást is alkalmazhatunk a hatásmechanizmus alapján, ha pusztán arra fókuszálunk, hogy az adott antibiotikum a baktérium sejt elpusztulását eredményezi, azaz baktericid; vagy csupán a baktérium sejt növekedését, osztódását gátolja, azaz bakteriosztatikus.

1. táblázat. A jelen munkában felhasznált 12 antibiotikum.

antibiotikum	rövidítés	hatásmechanizmus	baktericid/bakteriosztatikus
ampicillin cefoxitin	AMP FOX	sejtfal szintézis gátlók	baktericid
ciprofloxacin nalidixsav	CPR NAL	giráz gátlók	baktericid
nitrofurantoin	NIT	sokrétű hatásmechanizmus	baktericid
kanamicin tobramicin	KAN TOB	aminoglikozidok	baktericid
tetraciklin doxiciklin	TET DOX	30s riboszóma alegység gátlók	bakteriosztatikus
klóramfenikol eritromicin	CHL ERY	50s riboszóma alegység gátlók	bakteriosztatikus
trimetoprim	TRM	folsav bioszintézis gátlók	bakteriosztatikus

A béta-laktám antibiotikumokat a félszintetikus penicillin származék ampicillin (AMP) és a cefalosporinok közé tartozó cefoxitin (FOX) képviseli munkánkban. A béta-laktám típusú sejtfal szintézis gátlók megváltoztatják a sejt alakját és méretét, s végső soron a sejt líziséhez vezetnek³¹. Pontosabban ezek a béta-laktám antibiotikumok a bakteriális sejtfalat felépítő peptidoglikánokban a keresztkötés kialakulását gátolják, a kötést létrehozó transzpeptidáz enzimek, más néven penicillinkötő fehérjék blokkolása által. A gátlás során a béta-laktám antibiotikum a peptidoglikán helyett, annak analógjaként a béta-laktám gyűrűvel a transzpeptidáz enzim aktív centrumába köt^{32,33}. Ezen felül a béta-laktám antibiotikumok vezethetnek közvetett módon az SOS válasz kiváltásához, valamint a baktérium sejtek filamentációjához²⁹.

A fluorokinolonokat képviselő ciprofloxacin (CPR) és nalidixsav (NAL) széles hatásspektrumú antibiotikum, s emiatt terápiás felhasználásuk a multidrog rezisztens baktériumok terjedésével egyre nagyobb méreteket ölt³⁴. A kinolonok népszerűsége

széles hatásspektrumuk mellett abban is rejlik, hogy rendkívül gyorsan képesek elpusztítani a baktériumokat³⁵. A kinolonok elsődleges sejtbeli célpontja két DNS topoizomeráz egyike lehet: Gram-negatív baktériumok esetében a giráz, míg Gram-pozitív baktériumoknál a topoizomeráz IV³⁶. A Gram-negatív baktériumok, így a kólibaktérium (*Escherichia coli*) esetében is, az antibiotikum kezelést követően percekben belül kialakul a giráz, és ezáltal a DNS replikáció teljes gátlása^{37,38}. Ez a gátlás azonban visszafordítható³⁷, tehát a DNS replikáció gátlása önmagában mindössze bakteriosztatikus hatást érhetne el, a baktérium sejtek gyors pusztulása semmiképp sem magyarázható önmagában a DNS replikáció gátlásával³⁵. A kinolonok általi gyors sejthalálért a replikáció gátlásából fakadó több másodlagos folyamat összehatása a felelős: fő folyamatként a kinolonok replikációs villákhoz való kötődése feltehetően széleskörű kromoszóma fragmentációhoz vezet³⁹, melynek hatását tovább erősíti a kinolonok által beindított SOS válasz, valamint filamentáció⁴⁰.

A nitrofurantoin (NIT) a nitrofurán származékok egyike, melyek egy vagy több nitro csoporttal rendelkeznek nitroaromatikus vagy nitroheterociklikus gerincükön⁴¹. A nitrofurán származékok hatásmechanizmusa attól egyedülálló, hogy hatásuk kifejtéséhez *in vivo* aktiválásuk szükséges⁴². A nitrofurantoin redukálását, azaz az aktív antibakteriális forma létrehozását kólibaktériumban az NfsA és NfsB nitroreduktáz enzimek végzik^{43,44}. A gyors redukálás eredményeképp olyan reaktív intermedierek keletkeznek, melyek egyaránt támadják a riboszómákat, a DNS-t, a respirációt, a piruvát metabolizmust és számos más makromolekulás rendszert a sejtben⁴⁵. Valószínűleg ennek a sokrétű mechanizmusnak köszönhetően a nitrofurantoin rezisztencia sokkal kevésbé elterjedt a klinikumban, mint más antibiotikum osztályok esetében⁴⁶.

A 30S riboszóma alegységet gátló mechanizmussal rendelkeznek a tetraciklinek és az aminociklitolok, mely utóbbi családba tartozik a spektinomycin és az aminoglikozidok⁴⁷. A két csoport 30S alegységre gyakorolt hatása merőben eltér, melyet mi sem bizonyít jobban, mint hogy míg a tetraciklinek bakteriosztatikus, addig az aminoglikozidok baktericid hatással rendelkeznek. Az eltérés oka, hogy míg az aminoglikozidok a 30S alegység 16S rRNS komponenséhez kötnek, addig a tetraciklin típusú antibiotikumok az aminoacil-tRNS riboszómához történő hozzáférést blokkolják²⁹. Az aminoglikozid antibiotikumokat a kanamicin (KAN) és tobramicin (TOB) képviseli munkánkban. Mivel eredményeink értelmezésében kiemelt szerepet kapott az aminoglikozidok hatásmechanizmusa, valamint az ellenük kialakuló rezisztencia, így ennek részletes bemutatására külön fejezetet szenteltem. A tetraciklineket kísérletünkben a tetraciklin (TET) és a doxiciklin (DOX) antibiotikumok képviselik. A tetraciklinek riboszómához való kapcsolódása, s ezáltal a fehérje szintézis gátlása visszafordítható, hatásuk így csupán bakteriosztatikus⁴⁸. A tetraciklinek riboszómához való kötődése nemcsak a transzlációt blokkolja azáltal, hogy a transzláció folytatásához elengedhetetlen aminoacil-tRNS-ek hozzáférést gátolja; kötődése emellett a riboszóma alegység struktúrájában is nagymértékű változáshoz vezet⁴⁹. A tetraciklinek számos más kismolekulás

antibiotikumhoz hasonlóan passzív diffúzióval, az OmpF és OmpC porin csatornákon keresztül jutnak át a kólibaktérium külső membránján, hogy aztán a sejtbeli célpontjaikon kifejtsék hatásukat^{48,50}.

Az 50S riboszóma alegységet gátló antibiotikumokat változatos, de minden esetben a riboszóma 50S alegységét gátló hatásmechanizmusuk köti egy strukturálisan szintúgy rendkívül változatos osztályba^{51,52}. Ebből az osztályból szintén két antibiotikumot választottunk vizsgálatainkhoz: a makrolid típusú eritromicint (ERY) és az amfenikol típusú klóramfenikolt (CHL). Az 50S riboszóma alegység gátlók általában fizikailag blokkolják vagy a lánckezdést (a fehérje szintézis iniciációját) vagy a keletkező (nascent) fehérje lánc folytatását (elongációját)^{29,53}. A vizsgálatunkban alkalmazott eritromicin és klóramfenikol egyaránt a fehérje lánc elongációját gátolja, míg a multidrog-rezisztens Gram-pozitív fertőzések kezelésére alkalmazott új keletű linezolid a fehérje szintézis legelső lépését, iniciációját akadályozza.

A trimetoprim a 2-es típusú antifolatok, azaz folsav szintézis gátlók csoportját képviseli⁵⁴. A trimetoprim a dihidrofolát reduktáz enzim aktív centrumához kötve gátolja a dihidrofolsav redukcióját tetrahidrofolsavvá^{55,56}. A tetrahidrofolsav a timidin szintézis esszenciális előfutára (prekursor), így előállításának gátlása a DNS szintézist közvetve gátolja, s bakteriosztatikus hatáshoz vezet^{55,57}.

II.2. Az aminoglikozid antibiotikumok összetett hatásmechanizmusa

Az aminoglikozidok a 30S riboszóma alegységet gátló antibiotikumok baktericid hatással rendelkező alcsoportját képezik²⁹. A 30S riboszóma alegység gátlását annak 16S rRNS komponenséhez kötődve valósítják meg, azáltal, hogy megváltoztatják a 16S rRNS, az mRNS kodon és az ahhoz kapcsolódó aminoacil-tRNS által létrehozott komplex konformációját. Ez a konformáció változás hibás kodon-antikodon párosodást, s ezáltal a genetikai kód hibás lefordítását, ún. fehérje misztranszlációt okoz⁵⁸⁻⁶¹. Az aminoglikozidok tehát nem állítják meg a fehérje transzlációt, ahogy azt a többi riboszóma alegység gátló antibiotikum teszi. Ehelyett hibás fehérjék szintézisét okozzák azáltal, hogy hozzájárulnak a nem megfelelő aminosavak beépüléséhez a növekvő peptid láncba⁵⁸. Ez a misztranszláció teszi nagyon egyedivé az aminoglikozidok által okozott fenotípusos változásokat, s ennek köszönhető azok baktericid hatása is²⁹.

A misztranszláció közvetett módon a sejtműködés számos pontjában tud zavart okozni. Egyrészt a hibás membrán fehérjék beépülése a sejtmembránba a membrán integritását megbontva növeli a sejt permeabilitását, s hosszú távon a sejt halálához is vezethet⁶². Ez a fokozott membrán permeabilitás áll feltételezhetően például az aminoglikozidok béta-

laktámokkal mutatott szinergisztikus kölcsönhatásának hátterében²⁹. A misztranszláció másik jelentős következménye az olyan kétkomponensű rendszerek aktiválása, mint a membrán stressz választ szabályozó Cpx rendszer, vagy az oxidatív stressz választ szabályozó Arc rendszer²⁹. Ezek a kétkomponensű rendszerek olyan gének expresszióját szabályozzák, melyek a Cpx esetében a membrán integritás kialakításában⁶³, az Arc esetében pedig a membránhoz köthető energiatermelésben^{62,64} játszanak szerepet. Mind a Cpx rendszer, mind az Arc rendszer aktiválása olyan stressz indukált változásokat idéz elő a sejt metabolizmusában, melyek önmagukban is baktericid hatással rendelkezhetnek²⁹.

A bakteriális sejt respirációjának szintén kulcsszerepe van az aminoglikozidok felvételében és letalitásában⁶². Az aminoglikozidok a kezdeti elektrosztatikus kölcsönhatást követően, a baktérium membránjának elektrokémiai potenciálját felhasználva, azaz aktív módon jutnak be a sejtbe⁶⁵. Ennek a respiráció függő felvételnek alapvető feltétele a membránkött citokrómoknak, valamint a membránpotenciált fenntartó kinon készletnek (quinone pool) a megfelelő működése^{66,67}. Ezt támasztja alá az a megfigyelés is, miszerint az aminoglikozidok felvétele erősen gátolt anaerob körülmények között^{68,69}. Bár a respiráció függő felvétel egy meglehetősen korlátozott sejtbe jutási módszernek tűnhet, az aminoglikozidok képesek önmaguk sejtbe jutásának hatékonyságát tovább növelni a misztranszláció által okozott membránkárosodásnak és az ebből következő sejt permeabilitás növekedésnek köszönhetően^{62,70,71}.

II.3. A bakteriális antibiotikum rezisztencia molekuláris mechanizmusai

A baktériumok rendelkeznek természetes védelemmel (intrinsic rezisztencia) számos antibiotikummal szemben, amelyekre pedig természetes érzékenységet mutatnak, azokkal szemben genomi mutációk vagy horizontális géntranszfer révén tudnak úgynevezett szerzett rezisztenciára szert tenni⁷². A természetes védelem esetében az adott baktérium fajnak vagy törzsnek az alapvető felépítése vagy funkcionális sajátossága okán hatástalan az adott antibiotikum⁴⁴. Természetes védelem okozza például számos Gram-pozitív baktériumokkal szemben alkalmazott antibiotikum, így például a vancomycin hatástalanságát Gram-negatív baktériumokkal szemben, hiszen ezek a szerek a Gram-negatív baktériumokra jellemző külső membránon nem képesek átjutni, így nem érik el célpontjukat (például a vancomycin esetében a peptidoglikán réteget a két membrán közötti periplazmában, ahol a vancomycin a peptidoglikán közötti keresztkötések létrejöttét gátolja)⁷³. A szerzett rezisztenciaként megjelenő mechanizmusok széles tárházát két fő stratégiába sorolhatjuk: egyik lehetőség az antibiotikum sejten belüli koncentrációjának minimalizálása, míg a másik lehetőség az

antibiotikum célpontjának módosítása vagy a célzott sejtbeli folyamat alternatív útvonalra való terelése, újraprogramozása (**4. ábra**). Ezen rezisztencia mechanizmusok megszerzésére kétféle lehetősége van a baktériumnak: vagy horizontális géntranszferrel tesz szert a számára szükséges rezisztenciát biztosító génekre, vagy genomi mutációk révén, vagy a kettő kombinációjával biztosítja a számára szükséges mértékű rezisztenciát.

I. Az antibiotikum intracelluláris felhalmozódásának akadályozása

Ahhoz, hogy egy antibiotikum ki tudja fejteni antimikrobiális hatását, el kell jutnia sejten belüli célpontjához (azaz át kell jutnia a Gram-negatív baktériumok esetében mind a külső, mind a belső membránon), majd ott olyan koncentrációban kell felhalmozódnia, amelyben már képes hatását kifejteni, például egy adott sejtfolyamatot gátolni⁷⁴. Az antibiotikum sejten belüli koncentrációjának minimalizálása három módon vagy azok kombinációjával valósulhat meg: 1) a membrán permeabilitás csökkentése által eleve megakadályozva az antibiotikum sejtbe jutását, 2) a bejutott antibiotikumot enzimatikusan lebontva vagy hatástalanítva csökkenteni az aktív antibiotikum mennyiségét a sejtben, vagy 3) a bejutott antibiotikumot aktívan kipumpálva a sejtől efflux pumpák segítségével.

1) A membrán permeabilitás csökkentése. A Gram-negatív baktériumokra jellemző külső membrán egy olyan erős permeabilitási gátat képez a sejt körül, mely számos antibiotikum sejtbe jutását gátolja^{75,76}. Ez a külső membrán az oka a Gram-negatív baktériumok korábban már részletezett természetes védelmének (intrinsic rezisztencia) számos, Gram-pozitív baktériumok ellen használt antibiotikummal szemben. A Gram-negatív baktériumok külső membránjának kritikus szerepe van a sejtek védelmében, ugyanakkor mindeközben biztosítania is kell a sejt fenntartásához elengedhetetlen anyagok változatlan átjutását⁷⁷. A két látszólag ellentétes funkció betöltésének érdekében a külső membránnak igen összetett a felépítése. A külső membrán aszimmetrikus felépítésű kétrétegű foszfolipid membrán, mely külső rétegében lipopoliszacharidot (LPS) is tartalmaz. Az LPS aszimmetrikus jelenléte a külső membrán egyedülálló sajátossága⁷⁷. Az LPS egy hidrofób zsírsav oldalláncokat tartalmazó lipid A molekulából, egy központi oligoszacharidból és egy poliszacharid jellegű O-antigénből áll. A külső membrán emellett számos fehérjét tartalmaz, köztük porin fehérjéket is, melyek a sejt fenntartásához nélkülözhetetlen anyagok átjutását biztosítják.

Az antibiotikumok számára két lehetséges útvonal áll rendelkezésre a külső membránon való átjutáshoz: a hidrofób antibiotikumok a lipid-mediálta útvonalon juthatnak át a külső membránon, míg a hidrofil antibiotikumok az általános diffúziós porin csatornákon

keresztül tudnak bejutni a sejtbe^{77,78}. Ennek következtében a külső membrán lipid és fehérje összetétele nagy hatással bír a sejt antibiotikum érzékenységére. A lipid-mediálta útvonalat használó, a sejtekbe a külső membrán kettős rétegén szabadon diffundálva bejutó hidrofób antibiotikumokat képviseli vizsgálatunkban a két aminoglikozid (a kanamicin és a tobramicin), valamint a makrolid eritromicin⁷⁷⁻⁷⁹. Az LPS központi régiója – valószínűleg egy hidrophil környezet biztosításával – kulcsszerepet játszik a hidrofób antibiotikumokkal szembeni gát kialakításában, így azok a törzsek, melyek teljes (full-length) LPS-t termelnek, természetes védelemmel rendelkeznek a hidrofób antibiotikumokkal szemben⁷⁷.

Egy átmeneti csoportot képeznek a tetraciklinek (tetraciklin, doxiciklin) és a fluorokinolonok (ciprofloxacin, nalidixsav), melyek képesek mind a lipid-mediálta, mind a porin-mediálta útvonal használatára. Az, hogy a két útvonal közül melyiken jut be az antibiotikum, az antibiotikum protonáltságától függ, amit pedig az aktuális környezet pH értéke jelentősen befolyásol⁸⁰⁻⁸⁴. Míg a töltéssel nem rendelkező antibiotikum molekulák képesek áthaladni a külső membrán lipid kettősrétegén, addig a negatívan töltött antibiotikum molekulák a porin csatornákon jutnak át, feltehetően magnézium kelátorokként⁷⁷. A fluorokinolonok esetében további befolyásoló tényező az adott antibiotikum hidrofobicitása, mely az antibiotikum osztályon belül igen nagy változatosságot mutat. A ciprofloxacin érzékenységet például egyáltalán nem befolyásolja a külső membrán LPS összetétele, így valószínűleg ez az antibiotikum kizárólag a porin-mediálta útvonalat használja a sejtbe jutáshoz⁸⁴.

A porinok olyan vízzel telített transzmembrán csatornákat képeznek a Gram-negatív külső membránban, melyeken a kis hidrophil molekulák passzívan, diffúzióval képesek a sejtek periplazmatikus terébe jutni^{85,86}. Az *E coli* három általános diffúziós porinja, az OmpC, az OmpF, valamint a PhoE csatorna-fehérje transzmembrán szekvenciái β -redős szerkezetűek, s egy közepén összeszűkülő, hidrophil pórrussal rendelkező β -hordó struktúrát hoznak létre, mely összeszűkülés biztosítja a csatorna ion szelektivitását^{85,87}. Az OmpF esetében például ez a szelektivitás körülbelül 600 Daltonos méret feletti kizárást jelent, tehát ezen a csatornán főleg ionok, aminosavak és kisebb cukrok képesek a periplazmába bejutni⁷⁸. Ezen porinok olyan hidrophil kismolekulás antibiotikumok számára nyújtanak bejutási lehetőséget a sejtbe, mint a β -laktámok, a tetraciklin, a klóramfenikol és a kevésbé hidrophób fluorokinolonok (mint például a ciprofloxacin)⁷⁸. Míg az OmpF és OmpC porinok a semleges és a kationos molekulákat részesítik előnyben, addig a PhoE főleg az anionos molekulákat szállítja⁸⁶. A porinokon alapuló antibiotikum rezisztenciának két fő mechanizmusát írták eddig le klinikai izolátumokban: 1) a külső membrán összetételének olyan változása, mely során a porinok vagy teljesen eltűnnek vagy számuk nagymértékben csökken a külső membránban, vagy egy főbb porint más porin helyettesít; 2) a porinok funkciója változik meg azok permeabilitását csökkentő mutációk által⁷⁷.

2) Az antibiotikum efflux növelése. Az efflux pumpák olyan transzport fehérjék, melyek aktív módon, többségük a protonmotoros erőt felhasználva, pumpálják ki a mérgező szubsztrátumokat (köztük számos klinikailag releváns antibiotikumot) a sejtből a környezetbe⁸⁸. Ezek a pumpák lehetnek specifikusak egy adott szubsztrátra (pl. a tetraciklin/proton antiporter), vagy kipumpálhatnak struktúráisan teljesen eltérő szubsztrátokat is (például több eltérő osztály antibiotikumait)⁸⁸. Ez utóbbi pumpák okozhatnak multidrog rezisztenciát⁸⁸. Bármennyire is meglepő, a multidrog efflux pumpák nem az antibiotikumok terápiás alkalmazására válaszul jelentek meg hanem már sokkal korábban megjelentek a lipofil és amfipatikus molekulák membránon keresztüli transzportálására^{74,88}. Összességében körülbelül a bakteriális gének 5-10%-a vesz részt transzport folyamatokban, és ezeknek nagy része efflux pumpákat kódol^{89,90}. Ezen pumpák elsődleges célja lehet például, hogy az antibiotikum termelő baktérium a termelt antibiotikumot olyan gyorsan távolítsa el saját intracelluláris teréből, amilyen gyorsan termelődik az, ezáltal védve a sejtet a saját maga által gyártott „fegyvertől”⁷⁴. Ameddig a baktérium sejtéből az adott antibiotikum gyorsabban pumpálódik ki, mint amilyen gyorsan be tud diffundálni a sejtbe, és ezáltal a sejten belüli koncentráció alacsony és hatástalan marad, a baktérium sejtfunkciói zavartalanul működnek tovább⁷⁴.

A multidrog efflux pumpák meglete jelentősen hozzájárul a Gram-negatív baktériumok természetes védelméhez (intrinsic rezisztencia) bizonyos Gram-pozitív baktériumok ellen használt antimikrobiális szerrel szemben⁹¹. Mindeközben ezen pumpák túltermelése, azaz overexpressziója pedig akár olyan fokú rezisztenciát is biztosíthat a baktérium számára, mely akár az addig a klinikumban hatékonyan alkalmazott, a Gram-negatív baktériumokkal szemben alkalmazott antibiotikumokat is hatástalanná tehetik⁷⁴. Az efflux pumpák túltermelése (overexpresszió) bekövetkezhet a lokális represszor gének (például az *E. coli* MarR) mutációja által^{92,93}, vagy egy globális transzkripció regulátor (például az *E. coli* MarA, Rob vagy SoxS) általi aktiválás következtében^{94,95}. Az efflux pumpák szabályozatlan túltermelése potenciálisan előnytelen is lehet a baktérium számára, hiszen a mérgező szubsztrátokkal együtt tápanyagok és metabolikus intermedierek is távozhatnak a sejtéből⁸⁸. Ennek következtében az efflux pumpák expressziója nagyon szigorúan kontrollált a sejtben^{74,88}. A kólibaktérium AcrAB-TolC efflux pumpa AcrAB komponenseit kódoló gének például egyrészt a szigorú szabályozásukat végző AcrR represszort kódoló gén mellett helyezkednek el a genomban^{96,97}; másrészt mind az AcrAB, mind a TolC komponenseket kódoló gének expresszióját pozitívan szabályozó transzkripció faktorokat (pl. MarA) kódoló gének is az őket szigorúan szabályozó erős represszorok (pl. MarR) génjei mellett helyezkednek el a genomon⁹⁶.

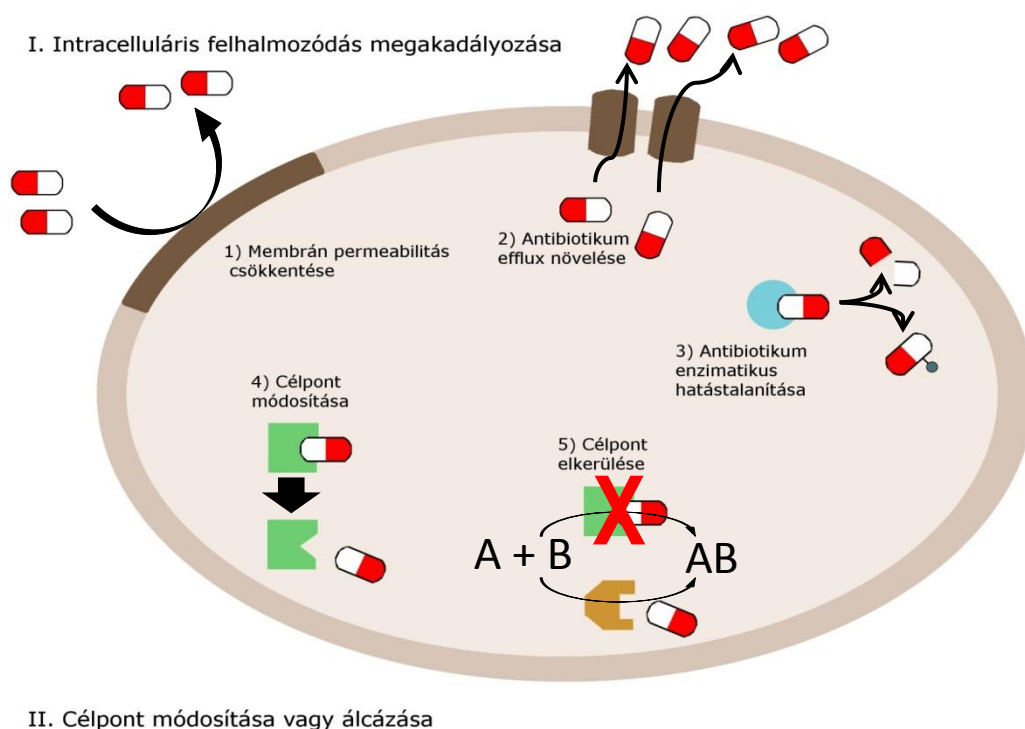
Számos multidrog efflux pumpát írtak már le részletesen az irodalomban, melyeket összesen 5 efflux pumpa családba tudunk csoportosítani⁹⁶. Az 5 multidrog efflux pumpa családból a rezisztencia nodulációs osztódási (RND, resistance nodulation division) efflux pumpák családja attól egyedülálló, hogy ezek a pumpák nem csupán a belső membránon át a periplazmáig juttatják ki a szubsztrátjaikat, hanem az intracelluláris térből, mindkét

membrán áthaladva, egyenesen a sejten kívüli környezetbe számúzik azokat⁹⁶. A szubsztrátok kipumpálásához az RND efflux pumpák a bakteriális membrán protonmotoros erejét használják fel^{98,99}. A legalaposabban karakterizált RND efflux pumpa rendszer a kólibaktériumban az AcrAB-TolC rendszer, melynek az RND pumpákra jellemző három komponense a belső membrán transzporter AcrB, a külső membrán fehérje csatorna TolC és a periplazmikus adaptor fehérje AcrA^{96,100}. Az AcrAB-TolC efflux pumpának szubsztrátjai a legkülönbözőbb antibiotikumok (béta-laktámok, novobiocin, eritromicin, fuzársav, fluorokinolonok, tetraciklin, klóramfenikol, linezolid), valamint az aromás szénhidrogének, a benzalkónium, az etídiüm-bromid, az akriflavin, a kristályibolya festék, a nátrium-dodecil-szulfát (SDS), a Triton X-100 detergens, az epesavas sók, a triklozán, a zsírsavak és a metotrexát^{96,101–103}.

3) Az antibiotikum inaktiválása vagy módosítása. Akárcsak az előző két mechanizmus, az antibiotikum közvetlen módosítása végeredményben szintén az aktív antibiotikum felhalmozódását gátolja vagy késlelteti a sejtben. Ennek klasszikus esete a penicillin és cefalosporin típusú antibiotikumok béta-laktám gyűrűjének hidrolitikus hasítása a rezisztens baktérium által termelt béta-laktamáz enzim segítségével^{74,104}. Mivel konkrétan a béta-laktám gyűrű köt be irreverzibilisen a sejtfal peptidoglikánjainak keresztkötését létrehozó transzpeptidáz enzim aktív centrumába^{32,33}, a széthasított béta-laktám gyűrűvel rendelkező antibiotikum képtelen a transzpeptidáz enzimhez kötődni, és így a sejtfal szintézis gátlása teljes mértékben meghiúsul⁷⁴. A béta-laktamáz termelő rezisztens baktérium az enzimet a periplazmába szekretálva képes megakadályozni, hogy az antibiotikum hatékony formája elérje célpontját⁷⁴. A béta-laktamázokkal szemben még rendkívül magas koncentrációban sincs semmi esélye a béta-laktám antibiotikumoknak, mivel egyetlen béta-laktamáz enzim molekula képes másodpercenként 10^3 penicillin molekulát hidrolizálni, ami azt jelenti, hogy mindösszesen 10^5 béta-laktamáz enzim molekula képes másodpercenként 100 millió penicillin molekulát irreverzibilisen tönkretenni⁷⁴.

Más antibiotikum osztályoknál az antibiotikum hidrolitikus inaktiválására nincs lehetőség, ugyanakkor más molekuláris módosításokkal is elérhető az antibiotikum csökkent vagy minimális aktivitása. Az aminoglikozidok esetében például a deaktiváló enzimek három különböző kémiai (foszfát-, acetyl-, adenil-) csoporttal „díszítik fel” az aminoglikozid molekulát, mely így jelentősen kisebb affinitással képes kötni az RNS molekulához és képtelen a fehérje szintézist akadályozni^{74,105}. Az antibiotikum módosításának egy speciális esete, amikor az aktív antibiotikum molekula létrehozásához szükséges a bevitt prekursor egy adott bakteriális enzim általi módosítása. Ez utóbbi esetre példa a nitrofurantoin, mely antibiotikumot a kólibaktérium NfsA és NfsB nitroreduktáz enzimjei redukálják, alakítják át az aktív formává^{43,44}. Mivel a nitrofurantoin redukált formája olyan reaktív intermedierek keletkezését okozza, melyek számos ponton támadják a

baktériumot, a baktérium számára a legkézenfekvőbb lehetőség a nitroreduktázokat kódoló *nfsA* és *nfsB* gének inaktíváló mutációja által rezisztenciára szert tenni^{41,45,46}. Ebben az esetben a rezisztencia nem egy enzim működése révén az antibiotikum semlegesítése által, hanem épp ellenkezőleg, egy enzim inaktíválása révén az antibiotikum semleges formában maradásával jön létre.



4. ábra. A legfontosabb antibiotikum rezisztencia mechanizmusok
(Coates és mtsai, 2002 nyomán)¹⁰⁶.

II. Az antibiotikum célpontjának módosítása vagy álcázása

Míg az antibiotikum sejten belüli koncentrációjának csökkentése az antibiotikum célponthoz való eljutásának lehetőségét hivatott minimalizálni, az antibiotikum célponthoz kifejtett hatásának megakadályozására két stratégia terjedt el leginkább: a célpont módosítása és a célzott útvonal újraprogramozása.

4) A célpont módosítása mutációk által. A legtöbb jelenleg alkalmazásban lévő antibiotikum nagy affinitással, specifikusan köt sejtbeli célpontjához, ezáltal akadályozva

annak normális aktivitását⁷². A célpont olyan módosításai, melyek megakadályozzák az antibiotikum kötődését, ugyanakkor a sejten belüli, normál funkciók működését továbbra is lehetővé teszik, nagymértékű rezisztenciát biztosíthatnak az adott antibiotikummal szemben⁷². A célpont módosítása során egy vagy több genomi mutáció olyan strukturális változást okoz az antibiotikum által célzott fehérjében, mely által az antibiotikum kevésbé képes kölcsönhatásba lépni az adott fehérjével, tehát hatástalanná válik, míg a fehérje sejtbeli funkcióját részben vagy teljes mértékben továbbra is képes végrehajtani. Klasszikus példa a célpont mutáció által okozott rezisztenciára a *gyrA* DNS giráz kódoló gén mutációja kólibaktérium esetében, mely nagymértékű rezisztenciát okoz a giráz működését gátló kinolonokra, például ciprofloxacinnal¹⁰⁶. További például szolgálhat a penicillin-rezisztencia, mely nem csupán béta-laktamázok termelésével érhető el, hanem a penicillin-kötő peptidoglikán transzpeptidázok mutációi által is⁷⁴.

5) A célpont elkerülése egy alternatív, nem érzékeny target által. További lehetőség az antibiotikum és a célpont kölcsönhatásának elkerülésére, ha a baktérium szert tesz egy olyan fehérjére, mely a célpont szerepét képes átvenni a sejtben, az adott antibiotikumra azonban nem érzékeny¹⁰⁷. Erre a mechanizmusra szolgálhat például az a plazmidon megszerezhető dihidrofolát-reduktáz (DHFR) enzim, mely a trimetoprim antibiotikumra nem érzékeny, azonban a sejt saját, a trimetoprim által gátolt DHFR enzim normál működését helyettesíteni tudja, ezáltal biztosítva trimetoprim rezisztenciát a baktérium számára^{107,108}. Szintén például szolgálhat erre a jelenségre is a penicillin-rezisztencia: a penicillin-kötő peptidoglikán transzpeptidáz enzimnek is létezik plazmidon kódolt, a béta-laktám antibiotikumokra csak alacsony affinitást mutató formája, mely ezáltal penicillin-rezisztenciát képes biztosítani a baktérium számára⁷⁴.

Az antibiotikum rezisztencia összetett jelenség

A fent ismertetett antibiotikum rezisztencia mechanizmusok nem izoláltan fordulnak elő, hanem leggyakrabban együttesen vannak jelen a baktérium sejtben. A „multiple antibiotic resistance” (Mar) fenotípust létrehozó, akár egyetlen a *mar* operont érintő mutáció is számos fehérje sejtbeli szintjének koordinált változását hozza létre⁷⁷. A fenotípus kialakulásához vezető változások közé tartozik efflux pumpák (például az AcrAB-TolC multidrog efflux pumpa) túltermelése, valamint porin csatornák (például az OmpF porin csatorna) termelésének a gátlása transzkripció vagy poszttranszkripció szabályozás által^{77,110,111}. A Mar fenotípusú baktérium sejtek rezisztenciát mutatnak számos hidrofíli és lipofíli antibiotikumra^{112,113}. Érdekes módon, bár az efflux pumpa túltermelése multidrog rezisztenciához vezet, mégis csak enyhe, klinikai szempontból nem túl jelentős rezisztenciát biztosít⁸⁸. A valódi előnye a Mar fenotípusú

baktériumoknak, hogy lehetőségük nyílik annyi ideig túlélni az antibiotikum szelekciós nyomását, ameddig további mutációk (pl.: target gén mutációk) megjelenésével a baktérium nagymértékű rezisztenciára tud szert tenni^{88,114}. Egy kutatásban például egy Mar fenotípusú kólibaktériumból ezerszer nagyobb eséllyel alakultak ki nagymértékű fluorokinolon rezisztenciával rendelkező törzsek, mint a vad típusú kólibaktériumból¹¹⁵. Emellett a nagymértékű fluorokinolon rezisztenciával rendelkező baktériumok általában a fluorokinolonok bakteriális célpontjában (topoizomeráz enzimek) hordozott mutációk mellett csökkent permeabilitást (porin downreguláció) és megnövekedett effluxot (efflux pumpa overexpresszió) is mutatnak^{92,93}. A Mar regulon mutáció általi aktiválódásának következtében tehát összehangolva jön létre a membrán permeabilitás csökkentése és az ennek ellenére a citoplazmába és periplazmába jutó antibiotikumok kipumpálása, mely folyamatoknak köszönhetően a baktérium számos antibiotikummal szemben elegendő időt nyer (enyhe rezisztenciát szerez) ahhoz, hogy további mutációk által nagyfokú rezisztenciát alakítson ki az adott antibiotikummal szemben^{107,116,117}.

II.4. Az aminoglikozid rezisztencia egyedi jellegzetességei

Ahogy az antibiotikum rezisztencia globális terjedése egyre nagyobb méreteket ölt, úgy nő az aminoglikozidok klinikai jelentősége is¹¹⁸. Az aminoglikozidokat széles hatásspektrumuk, gyors baktericid hatásuk és más antibiotikumokkal (például béta-laktám típusú antibiotikumokkal) mutatott szinergisztikus, azaz egymást erősítő hatásuk tette különösen hasznossá a súlyos nozokomiális, azaz egészségügyi ellátás következtében kialakuló fertőzések kezelésére^{118,119}. Természetesen, ahogy a többi antibiotikum esetében, úgy az aminoglikozidoknak is a túlzott és felesleges használata az aminoglikozid rezisztencia elterjedéséhez vezetett számos jelentős patogén baktérium esetében¹²⁰. Mindazonáltal az aminoglikozid rezisztencia megjelenéséhez, más antibiotikumokkal ellentétben, hosszútávú vagy ismétlődő kitettség vagy nagyon magas bakteriális sejtszám szükséges^{121,122}.

A leggyakrabban előforduló aminoglikozid rezisztencia mechanizmusok az aminoglikozidok intracelluláris módosítását célozzák különböző bakteriális enzimekkel¹¹⁸. Ezek az enzimek alapvetően a baktérium sejt normál metabolizmusában vesznek részt, azonban az aminoglikozidok által okozott szelekciós nyomás hatására olyan mutációk keletkeznek az enzimeket kódoló génekben, melyek az adott enzim expresszióját és/vagy szerkezetét olyan módon befolyásolják, hogy annak lehetősége legyen az aminoglikozidok módosítását elvégezni^{118,123}. Az aminoglikozidok módosítását végző három ismert enzimosztály az aminoglikozid acetiltranszferázok, az aminoglikozid nukleotidiltranszferázok és az aminoglikozid foszfortranszferázok¹¹⁸. Az aminoglikozid acetiltranszferáz az aminoglikozid négy amino-csoportjának egyikét acetilálja, és ezáltal

négy nagyságrenddel csökkenti annak affinitását a 30S riboszóma alegység tRNS-kötő helyéhez^{118,124}. Az aminoglikozid nukleotidiltranszferázok az aminoglikozid deaktiváló enzimek legkisebb osztályát képviselik, azonban klinikai előfordulások az aminoglikozidok alkalmazásával ugrásszerű lokális növekedésre képes¹¹⁸. Az aminoglikozid foszfortranszferázok pedig olyan kinázok, melyek az antibiotikum foszforilációjával dramatikusan lecsökkentik annak riboszóma-kötő képességét¹¹⁸. Az aminoglikozid foszfortranszferázok rendkívül elterjedtek és széles körben alkalmazzák őket például rezisztencia markerként molekuláris biológiai vizsgálatoknál¹¹⁸.

Igen gyakori aminoglikozid rezisztencia mechanizmus továbbá az aminoglikozidok aktív kipumpálása a bakteriális sejtből specifikus vagy általános efflux pumpákkal¹¹⁸. Ilyen aminoglikozidok kipumpálására alkalmas efflux pumpákat találunk például a rezisztencia nodulációs osztódási (RND, resistance nodulation division) efflux pumpa család tagjai között¹¹⁸. Az RND efflux pumpa család tagjai a bakteriális membrán protonmotoros erejét felhasználva juttatják ki szubsztrátjaikat a sejtből közvetlenül a sejten kívüli környezetbe^{98,99}. Több RND efflux pumpa is képes szubsztrátjaként az aminoglikozidokat protonmotoros erő-függő módon eltávolítani a kólibaktériumból, például az AcrD efflux pumpa feltehetően mindkét általunk vizsgált aminoglikozid (kanamicin és tobramicin) kipumpálására képes^{117,125}.

További lehetőség az aminoglikozid rezisztencia kialakulására az aminoglikozid sejtbeli célpontjának módosulása egy mutáció megjelenése által¹¹⁸. Az aminoglikozidok célpontja a bakteriális riboszóma, azon belül is a kis (30S) alegység, mely a 16S rRNS-ből és 20 fehérjéből épül fel^{126,127}. Ezen belül az aminoglikozidok pontos célpontja a 16S rRNS-en található „A”-kötőhely, mely a sorban következő tRNS-t fogadó hely^{126,128}. A 16S rRNS többek között biztosítja a tRNS kötését és a megfelelő kodon-antikodon párosodást, valamint zárt konformációt hoz létre, ha a párosodás sikeres¹²⁶. Bár a különböző aminoglikozidok kissé eltérő módon kötődnek a 16S rRNS-hez, de maga a kötődés minden esetben a fehérje termelődés akadályozásához, hibás kodon-antikodon párosodáshoz, és végső soron misztranszlációhoz vezet⁵⁸⁻⁶¹. A genomi rezisztencia mutációk megjelenésének elsődleges célpontja tehát a 16S rRNS-et kódoló *rrs* gén, mely génnek bizonyos mutációi valóban nehezíthetik az aminoglikozidok kötődését¹²⁶. Ennek ellenére az *rrs* génnek a mutációi nem túl elterjedtek, hiszen ez a gén annyira alapvető szerepet tölt be a bakteriális sejtben, hogy mutációi gyakran letálisak¹²⁶. További ismert célpontja az aminoglikozid rezisztencia mutációknak a szintén a riboszóma kis (30S) alegységének felépítésében részt vevő S12 riboszómális proteint kódoló *rpsL* gén¹²⁶. Az S12 protein további stabilitást biztosít a 16S rRNS-nek, így mutációi szintén az aminoglikozidok kisebb affinitású kötődéséhez vezetnek¹²⁹.

A genomi mutációkon felül a 16S rRNS enzimatisz módosítása is egy lehetséges módja az aminoglikozid rezisztencia biztosításának¹²⁶. Az aminoglikozid termelő törzsek jellegzetes rezisztencia mechanizmusa a 16S rRNS metilációja az ezekre a törzsekre jellemző rRNS

metiláz enzimek által^{118,130}. Ez a metilációs módosítás nagymértékű rezisztenciát képes biztosítani az önmaga által termelt aminoglikozid antibiotikumra¹¹⁸. Súlyos problémát okozhat azonban a klinikumban, ha egy aminoglikozid-rezisztenciát okozó metiláz enzim génje plazmidon elterjed a rezisztens törzsek között, akár több másik rezisztencia génnel azonos plazmidon terjedve, mely rezisztenciát biztosít nem csupán az aminoglikozidokra, hanem béta-laktámokra, trimetoprimre és szulfonamidra is¹³¹.

Fontos megemlíteni, hogy csakúgy, mint más antibiotikumok esetében, az aminoglikozidok esetében sem különülnek el az eltérő rezisztencia mechanizmusok, hanem leggyakrabban egyidejűleg vannak jelen ugyanabban a baktérium törzsben¹¹⁸.

II.5. Laboratóriumi evolúciós kísérletek

Első gondolatra az evolúció egy végtelenül lassú folyamatnak tűnhet, amelynek vizsgálatához rendkívül hosszú időszakokat kell felölelni¹³². Charles Darwin is azt írta A fajok eredete című művében, hogy az evolúció lassú változásaiból mi semmit sem láthatunk, s a régmúlt geológiai korokról pedig annyira erősen korlátozottak az ismereteink, hogy csak annyit tudhatunk biztosra, a mai életformák különböznek a korábbi életformáktól^{133,134}. Azonban sehol sem látványosabb az evolúció folyamata, mint a mikroorganizmusoknál¹³². A laboratóriumi evolúciós kísérletek lehetőséget teremtenek az evolúciós folyamatok valós idejű vizsgálatára jól kontrollált kísérletes körülmények között^{134,135}. A laboratóriumi evolúciós kísérletek során az evolúciós folyamatokat vizsgálják adott kísérletes populációk válaszát megfigyelve a kísérletben szigorúan szabályozott környezettel szemben¹³⁵. Az evolúciós kísérlet tehát egy előre eltervezett, kontrollált kísérlet, melyben a szigorúan szabályozott környezet hatására a szelekció bármilyen, az adott környezetben a baktérium fitnessét befolyásoló tulajdonságra vagy génre hatással lehet¹³⁵. A meghatározás kizárja tehát az olyan eseteket, amikor mesterséges szelekció (háziasítás) történik, ahol a szelektált tulajdonságok vagy genotípusok előre meghatározottak.¹³⁵

Az elmúlt évtized technológiai fejlesztéseinek köszönhetően ma már lehetőségünk van feltérképezni az egyes evolúciós folyamatok genomi és molekuláris hátterét¹³⁵. A legújabb technológia nyújtotta lehetőségekre építve ugrásszerűen nőtt az evolúciós kísérletek száma, s egyben számos kérdés megválaszolására lehetőség nyílt¹³⁵:

1) Evolúciós elméletek vizsgálata. Az evolúciós kísérletek sokoldalúsága leglátványosabban az evolúcióelmélet hipotéziseinek tesztelésében nyilvánul meg¹³⁵. Az evolúciós kísérletek által lehetőség nyílik olyan „proof of principle” tanulmányok elvégzésére, melyek bizonyíthatják, hogy bizonyos elméletben felvetett evolúciós folyamatok a valóságban is lejátszódnak-e¹³⁵. Így például bizonyítást nyert, hogy bár a

mutátor fenotípus széleskörben el tud terjedni gyors adaptációt igénylő környezetben az előnyös mutációk „potyautasaként”, azonban a mutátorok jelenléte mégsem vezet feltétlenül az adaptáció felgyorsulásához¹³⁶.

2) Populációgenetikai paraméterek becslése. A mutáció akkumulációs kísérletek során egy nagyon kicsi, izogenikus populációból indul ki az evolúciós kísérlet, melynek során minimalizálják a szelekciót¹³⁵. Az ilyen mutáció akkumulációs kísérletek által rengeteg információ deríthető ki a spontán mutációk megjelenéséről, terjedéséről, fitness hatásáról, kölcsönhatásairól, fenotipikus varianciájáról és más kvantifikálható tulajdonságairól vagy jellegeiről^{135,137}.

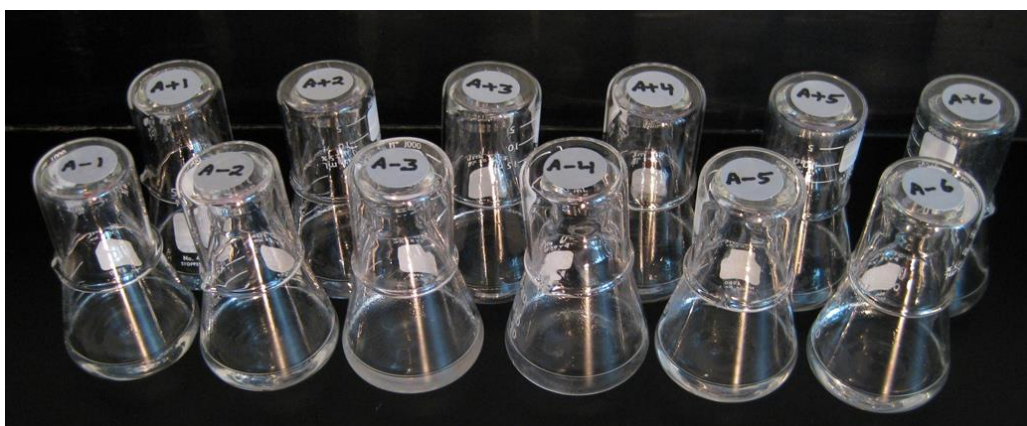
3) Evolúciós csereviszonyok (trade-off) és kényszerek vizsgálata. Széleskörben feltételezik, hogy a legtöbb adaptáció során megjelennek bizonyos csereviszonyok (trade-off), melyek esetében bizonyos tulajdonságok vagy jellegek, melyek egy adott környezetben vagy helyzetben fitness előnyt jelentenek, más környezetben vagy helyzetben kimondottan hátrányosak¹³⁵. Számos evolúciós kísérletben bizonyították már ezen csereviszonyok (trade-off) széleskörű, bár nem teljeskörű jelenlétét és mutattak be a háttérben álló mechanizmusokra példákat^{138,139}. A kólibaktérium esetében például bebizonyították, hogy egy hisztidin külső forrásból igénylő törzs képes a hisztidin-mentes és hisztidinben gazdag környezetek váltakozásához alkalmazkodni, azonban az alkalmazkodás során megjelenő riboszómális mutációk olyan lassú fehérjeszintézishez vezettek, melynek következtében az adaptált törzs a hisztidinben gazdag környezetben is rendkívül lassan tudott csak növekedni¹⁴⁰.

4) Adaptáció specifikus környezetekhez. Számos evolúciós kísérlet legfőbb célja megérteni, hogyan képes egy populáció alkalmazkodni egy bizonyos környezeti feltételhez, például baktériumok esetében hőmérséklethez¹⁴¹, tápanyagforráshoz¹⁴² vagy egyéb környezeti stresszhatásokhoz¹⁴³. Ezen kutatások során általában kiemelt hangsúlyt helyeznek az adaptáció háttérben álló genomi mutációk vizsgálatára és az adaptáció mechanizmusának megértésére¹³⁵.

Számos esetben bár az evolúciós kísérlet előre meghatározott célja a négy nagy kérdéskör egyikébe esik, ugyanakkor az eredmények alapján több kérdéskör változatos kérdései válaszolhatóak meg. Az egyik leginformatívabb laboratóriumi evolúciós kísérlet 1988-ban indult és jelenleg is tart: a hosszútávú evolúciós kísérlet (Long-Term Experimental Evolution, LTEE) során 12 párhuzamos kólibaktérium populációt indítottak el glükóz-limitált minimál tápoldatban és az azóta eltelt 30 évben naponta a populációk 1%-át friss tápoldatba oltották át **(5. ábra)**^{144,145}. A kísérlet jelenleg több, mint a 60.000. generációnál tart és mérhetetlen egyszerűsége ellenére számos váratlan eredménnyel szolgált¹⁴⁵. A kiindulási törzs szigorúan aszexuális, így a kísérlet során kizárólag a populációkban

megjelenő spontán mutációkra ható természetes szelekció és genetikai sodródás (drift) határozta meg az evolúciós folyamatot¹⁴².

A hosszútávú evolúciós kísérlet (LTEE) során a glükóz csak limitált mennyiségben van jelen a tápoldatban, de ezen kívül tartalmaz még a tápoldat citrát formájában is szénforrást, melyet azonban a kiindulási törzs nem képes hasznosítani. A citrát hasznosító képesség megjelenéséig mégis több, mint 30.000 generáció telt el az LTEE során¹⁴². Annak, hogy erre az evolúciós találmányra 31.500 generációt kellett várni, két oka lehet: vagy valamilyen szélsőségesen ritka mutáció szükséges az új tulajdonság megjelenéséhez, vagy a megfelelő mutáció fizikai megjelenésének vagy fenotípusos kifejeződésének előfeltétele az, hogy a genomban már jelen legyenek a megfelelő azt megelőző mutációk¹⁴². A citrát hasznosítás elhúzódó megjelenésének okát keresve a kutatók azt találták, hogy a 20.000. generáció környékén a később citrát hasznosító képességet szerző populációban megjelent egy olyan mutáció, mely a citrát hasznosítás megjelenését a későbbiekben lehetővé tette¹⁴². A citrát hasznosítás megjelenésének lehetősége tehát az adott populáció evolúciós történetén múlt¹⁴². Tágabb értelemben tehát az evolúciós múlt különösen fontos az olyan kulcs innovációk megjelenésének elősegítésekor, melyek fokozatosan halmozódó szelekcióval nem könnyen evolválódnak¹⁴².



5. ábra. A hosszútávú evolúciós kísérlet (LTEE) 12 párhuzamos populációja (forrás: Wikipédia).

A hosszútávú evolúciós kísérlet (LTEE) remélhetőleg még hosszú évtizedekig folytatódni fog, hiszen végtelenül egyszerű és olcsó, azonban rendkívül informatív kísérletről van szó. Ráadásul a citrát hasznosítás kialakulásának példájából is láthatjuk, hogy a jelentősebb innovációk megjelenéséhez esetenként sok időnek kell eltelnie. Különösen hosszú távra szükséges terveznünk, ha az új funkciók megjelenésén túl a sejtek között kialakuló kölcsönhatásokat, a horizontális géntranszfer megjelenését vagy akár új fajok keletkezését is szeretnénk valós időben megfigyelni az evolúciós kísérletek segítségével¹³². Összességében az LTEE eddigi eredményei azt mutatják, hogy az állandó

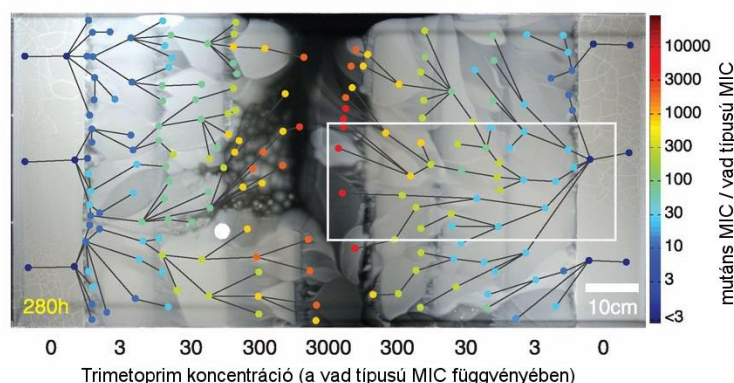
környezethez való hosszútávú adaptáció sokkal összetettebb és dinamikusabb, mint azt gyakran feltételezik¹⁴⁵.

II.6. Az antibiotikum rezisztencia kialakulásának vizsgálata kólibaktériumban

Az antibiotikum rezisztencia terjedésének egyre égetőbb problémája számos olyan kutatáshoz vezetett a közelmúltban, melyek az antibiotikum rezisztencia evolúciójának, az adaptáció mechanizmusának megértését célozták^{18,146–148}. Egy kutatásban például azt vizsgálták, hogy 5 béta-laktamáz rezisztencia mutáció, melyek együttesen körülbelül 10^5 -szeresére növelik a bakteriális rezisztenciát, milyen sorrendben jelennek meg az evolúció során¹⁴⁷. Meglepő módon az 5 mutációnak számos alkombinációja nem növeli az antibiotikum rezisztenciát, így a 120 lehetséges mutációs útvonalból valójában csak néhánynak van lehetősége a valóságban is lejátszódnia, s ezáltal a fehérje evolúció lehetőségei igen korlátozottak, könnyen ismétlődőnek tűnnek¹⁴⁷. Egy másik kutatásban graduálisan növekvő antibiotikum koncentrációhoz adaptáltatott kólibaktérium populációknál a populáció tagjainak nagy része sokkal kevésbé bizonyult rezisztensnek, mint a populáció egésze az adaptációt követően¹⁴⁸. A populáció nagymértékű rezisztenciáját valójában néhány kiugróan rezisztens mutáns biztosította, melyek egy szignálmolekula kibocsátásával védték a környezetükben lévő sejteket az antibiotikumtól¹⁴⁸. Egy további kísérletben egy speciális, morbidosztátnak elnevezett készülékben úgy adaptáltatták a kólibaktériumot három antibiotikum egyikéhez, hogy az egyes antibiotikumok koncentrációja dinamikusan növekedett a bakteriális növekedés függvényében¹⁸. Ebben a kísérletben ezáltal a kutatóknak lehetőségük nyílt összehasonlítani az egyes antibiotikumokkal szembeni rezisztencia kialakulásának dinamikai különbségeit: míg a klóramfenikol és a doxiciklin esetében a rezisztencia gyorsan kialakult egy jól körülírható rezisztencia gén készlet változatos mutációinak számtalan kombinációja által, addig a trimetoprim esetében a rezisztencia lépésről lépésre alakult ki, s a mutációk kizárólag az antibiotikum célpontját, a dihidrofolát-reduktáz enzimet érintették¹⁸.

Egy friss tanulmányban a rezisztencia evolúciós folyamatok megértésén túl kiemelt hangsúlyt fektettek az eredmények reprezentálására és könnyen érthetőségére, miközben az eredmények mind a laikusok, mind a kutatók számára tudtak új információval szolgálni¹⁴⁶. Ebben a kísérletben egy hatalmas, 120 x 60 cm-es antibiotikum gradiens agarlemez (mikrobiális evolúció és növekedési aréna lemez, microbial evolution and growth arena (MEGA-lemez)) készítettek, melyben a kólibaktériumnak lehetősége volt mozogni (**6. ábra**). Az evolúciót meghatározó környezet így az eddigi evolúciós

kísérletek homogén környezetéből egy strukturált környezetté vált, ahol a megfelelő rezisztencia mutációkon túl a térbeli elhelyezkedés is számít.



6. ábra. A MEGA-lemez lehetővé teszi az antibiotikum rezisztencia evolúció valós idejű, vizuális megjelenítését. (Baym és mtsai, 2016)¹⁴⁶.

A MEGA-lemezen a négy lépcsős antibiotikum gradiens szimmetrikusan befelé növekedett, mindig egy-egy nagyságrenddel növelve az adott antibiotikum koncentrációját. A lemez két oldalára oltott kólibaktérium miután a helyben található tápanyagokat felhasználta, kemotaxissal tudott a lemezen a tápanyagban gazdagabb környezet irányába mozogni. Ezen mozgás során azonban egyre magasabb és magasabb antibiotikum rezisztencia elérésére volt szüksége a baktériumnak ahhoz, hogy a következő koncentráció szekcióba juthasson. Ahogy egy rezisztens mutáns keletkezik a populációban, annak leszármazottai képesek tovább jutni és szétterjedni a következő antibiotikum koncentráció szekcióba, s közben elzárni az utat a további lehetséges rezisztens mutánsok előtt. Amikor a nyertes vonalak elérik a következő szekció határát, ott egy második rezisztencia mutáció megjelenésével ismétlődik meg ez a folyamat, amíg a baktériumok el nem érik és be nem nőnek a legmagasabb koncentrációt is.

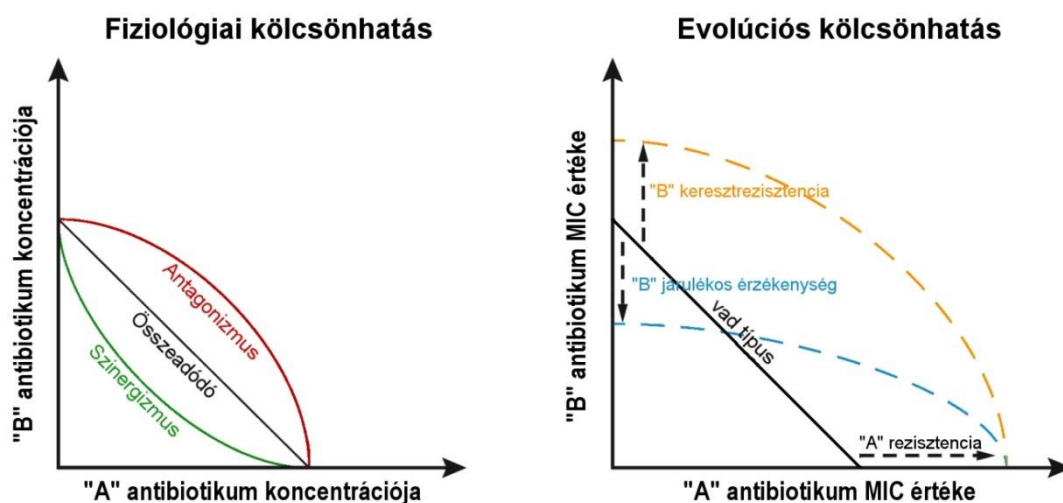
Ebben a térben is strukturált környezetben tehát megváltozik az általánosan alkalmazott homogén környezethez képest a szelekció formája: az egyes baktériumoknak itt nem kell hosszú távon a szomszédaival versenyeznie a limitált tápanyagforrásokért; elég, ha ő tud elsőként bejutni az új szekcióba. A kísérlet végén tehát nem biztos, hogy a legjobb fitnesszel vagy legmagasabb rezisztenciával rendelkező baktérium fog győzni, hanem az, amelyikben a leggyorsabban jelent meg a soron következő szekciónak megfelelő szintű rezisztenciát biztosító mutáció. Összességében, MEGA-lemez lehetővé tette az egyes vonalak fenotípusos és genotípusos evolúciós történetének vizuális, majd molekuláris feltérképezését. Ezen felül, a MEGA-lemez egy rendkívül hasznos és egyszerű módszer az evolúció jelenségének vizuális bemutatására és oktatásban való felhasználására.

Míg az eddig bemutatott kutatások magának a rezisztencia kialakulásának a dinamikáját, mechanizmusait vizsgálták, az antibiotikum rezisztencia okozta egészségügyi krízis következtében az antibiotikum rezisztencia evolúciós kísérletek egy újfajta alkalmazása is széles körben elterjedt: annak igazolása, hogy egy-egy új fejlesztésű antimikrobiális szerre nem vagy csak lassabban alakul ki rezisztencia, mint a hagyományos antibiotikumokra. Az antibiotikum rezisztencia ugyanis az egyes hagyományos antibiotikumok használatának bevezetésekor rendkívül gyorsan jelent meg és terjedt el (**1. ábra**). A jelenleg fejlesztés alatt álló antimikrobiális szereknél tehát létfontosságú lenne, hogy a rezisztenciának ezekre a szerekre ne legyen lehetősége megjelenni, vagy lassabban jelenjen meg és korlátozottabban tudjon terjedni, hiszen ez tudná garantálni, hogy az új fejlesztésű szerek hosszútávon is megőrizhessék hatékonyságukat^{149,150}. A legtöbb új felfedezésű szernél így ma már a szer felfedezését követően, a hatásspektrumának és *in vivo* hatékonyságának vizsgálatával egy időben vizsgálják a szerre kialakuló rezisztencia lehetőségeit is. A közelmúltban írták le például a teixobaktint, melyet egy laboratóriumi környezetben nem tenyészthető talajbaktériumból izoláltak egy speciális, *in situ* diffúziós kamrában történő tenyésztés és nagy áteresztőképességű szűrés segítségével¹⁵¹. Miután a teixobaktinnak azonosították a feltételezhető hatásmechanizmusát (sejtfal szintézis gátlás), hatásspektrumát (Gram pozitív baktériumok) és *in vivo* hatékonyságát, alaposan feltárták a rezisztencia kialakulásának lehetőségeit is. A rezisztencia vizsgálatok során a teixobaktin két fő célpontjára, a *Staphylococcus aureus* és a *Mycobacterium tuberculosis* fajokra is elvégeztek két-két független kísérletet. Az első kísérletben a mutáció prevenciós koncentráció mérésével azt igazolták, hogy nagy dózisu teixobaktinnal szemben egyetlen mutációs lépéssel nem tud kialakulni rezisztencia. A második kísérletben pedig sorozatos átváltással, tehát laboratóriumi evolúciós kísérlettel azt mutatták ki, hogy 27 nap alatt a gátló koncentráció alatti (subinhibitory) koncentrációban jelenlévő teixobaktinnal szemben a vizsgált baktérium törzsek nem tudtak rezisztenciát kialakítani. Ez utóbbi esetben a gátló koncentráció alatti alkalmazásnak köszönhetően a baktériumoknak lehetőségük nyílt volna akár több mutáció kombinációjával elérni a kívánt rezisztenciát. A kísérletek mellett a teixobaktin eredetével és hatásmechanizmusával kapcsolatban a szerzők további érveket sorakoztattak fel a rezisztencia megjelenésének lehetősége ellen. A rezisztencia kialakulásának vizsgálata tehát napjainkban már szerves részét képezi az új antimikrobiális szerek leírásának, s e vizsgálat részeként az antibiotikum rezisztencia evolúciós kísérletek rendkívül jól hasznosíthatóak.

II.7. Fiziológiás és evolúciós antibiotikum kölcsönhatások

Számos jelentős fertőző betegség, például a HIV fertőzés, a tuberkulózis és a malária esetében, a kombinációs terápia a standard eljárás, s ezeknek a kombinációs terápiáknak a fő célja a rezisztencia kialakulásának késleltetése^{152–155}. Ezzel szemben az átlagos akut

bakteriális fertőzésekre nagyon kevés esetben alkalmaznak kombinációs terápiát, és akkor is kizárólag azzal a céllal, hogy a két alkalmazott antibiotikum felerősítse egymás hatását, tehát a szinergisztikus hatás kiaknázására¹⁵⁶. A szinergisztikus antibiotikum párok terápiás alkalmazásakor valóban gyorsabb a tisztulás (clearance), ráadásul alacsonyabb antibiotikum dózis mellett^{156,157}. Ez az egyoldalú hozzáállás az antibiotikum kölcsönhatásokhoz ugyanakkor rendkívül káros is lehet: egy laboratóriumi evolúciós kísérletben ugyanis azt találták, hogy a szinergisztikus antibiotikum párokkal szemben sokkal gyorsabban alakul ki a rezisztencia, mint a más kölcsönhatást mutató párokkal szemben, sőt még annál is gyorsabban, mint az egyedileg alkalmazott antibiotikumokkal szemben¹⁵⁸. Ahhoz tehát, hogy kiaknázhassuk az antibiotikum terápiák esetében is a kombinációs terápiában rejlő maximális lehetőségeket, az antibiotikum kölcsönhatások sokkal átfogóbb ismeretére lenne szükségünk¹⁵⁶. Az antibiotikum kölcsönhatásoknak két csoportját ismerjük: a fiziológiás és az evolúciós kölcsönhatásokat. Az antibiotikumok fiziológiás kölcsönhatásai már az 1950-es évek óta ismertek¹⁵⁹, az evolúciós kölcsönhatások jelentőségére pedig a jelen munka alapjául szolgáló publikációinkkal hívtuk fel a nemzetközi szakma figyelmét, melyet azóta számos új publikáció követett a témában.



7. ábra. Az antibiotikumok között megfigyelhető fiziológiai és evolúciós kölcsönhatások (Baym és mtsai, 2016 nyomán)¹⁶⁰.

Fiziológiás kölcsönhatások¹⁶⁰. A fiziológiás kölcsönhatások megjelenéséhez két vagy több antibiotikum egyidejű jelenléte szükséges. Fiziológiás kölcsönhatásról valójában akkor beszélhetünk, ha a két egyidejűleg jelenlévő antibiotikum együttes hatása erősebb vagy gyengébb, mint amire az antibiotikumok egyedi hatása alapján számítanánk. A legegyszerűbb ezeket a kölcsönhatásokat úgy elképzelni, ha a két antibiotikum koncentrációs terére rárajzoljuk, hogy a baktérium adott kölcsönhatásnál mekkora területen képes növekedni (7. ábra). A koncentrációs térben „A” antibiotikum koncentrációja az x-tengely mentén, míg „B” antibiotikum koncentrációja az y-tengely

mentén növekszik. A tér minden pontja tehát a két antibiotikumnak a két tengelytől való távolsággal arányos, az adott pontnak megfelelő koncentrációjú kombinációját képviseli. Az alap feltételezésünk, hogy a két antibiotikum hatása összeadódik (összeadódó vagy additív kölcsönhatás), tehát mindegy, hogy melyik antibiotikumból mennyi szerepel a kombinációban, ha a kombináció összesített koncentrációja azonos, a hatás is azonos lesz. Ebben az esetben a növekedési zóna egy egyenes mentén ér véget. Szinergizmus esetében a kombináció erősebben hat, tehát jobban gátolja a baktérium növekedését, mint amit az összeadódó hatás esetében várnánk. Ebben az esetben tehát a növekedési zóna széle konkáv, a két antibiotikum felerősíti egymás hatását. Antagonizmus esetében a kombináció gyengébben hat, tehát kevésbé gátolja a baktérium növekedését. A növekedési zóna széle ebben az esetben konvex, a két antibiotikum gyengíti egymás hatását. A fiziológiás kölcsönhatások terápiás hasznosításának egyik legáltalánosabban ismert példája a szinergisztikus trimetoprim - szulfametoxazol kombináció alkalmazása középfülgyulladás fertőzések kezelésére^{156,161}.

Evolúciós kölcsönhatások. Az evolúciós kölcsönhatások nem a klasszikus értelemben vett kölcsönhatások, tehát ilyenkor a két antibiotikum nem egy időben, nem kombinációban van jelen. Az evolúciós kölcsönhatások egy adott antibiotikumra adott evolúciós válasznak a következményei, tehát a spontán megjelenő rezisztencia mutációk vagy a szerzett rezisztencia gének által jönnek létre: ugyanaz a mutáció vagy gén mely egy adott antibiotikumra rezisztenciát biztosít, más antibiotikumokkal szemben is megváltoztatja a baktérium érzékenységét¹⁶⁰. Amennyiben az adott rezisztencia mutáció vagy gén több antibiotikumra is rezisztenciát okoz, keresztrezisztenciáról vagy multidrog rezisztenciáról beszélünk. Abban a rendkívül izgalmas esetben azonban, amikor az adott rezisztencia mutáció vagy gén egy másik antibiotikumra fokozott érzékenységet (hiperszenzitivitást) okoz, járulékos érzékenységről (kollaterális szenzitivitásról) beszélünk. Ez utóbbi jelenséget egy körülbelül 60 évvel ezelőtti úttörő munkában publikálták először²¹. Ebben az úttörő munkában az akkori laboratóriumi lehetőségek ellenére rendszerszinten vizsgálták 15 antibiotikum evolúciós kölcsönhatásait. A kísérlet során elsősorban az antibiotikumok hatásmechanizmusa közötti hasonlóságokat és eltéréseket célozták vizsgálni. A járulékos érzékenység nem kizárólag az antibiotikumokra jellemző jelenség: jelentőségét felvetették már a rovarirtó rezisztencia^{162,163}, a malária^{164,165}, a HIV terápia¹⁶⁶ és a rákterápia²³ területén is.

III. Célkitűzés

Munkám céljaként azt tűztük ki, hogy választ adjunk napjaink egyik legsürgetőbb kihívására, miszerint megértsük, milyen genetikai változások jönnek létre a *de novo* antibiotikum rezisztencia evolúciója során, valamint ezek az adaptív változások hogyan befolyásolják az adott baktérium érzékenységét más antibiotikumokkal szemben. Ezen evolúciós kölcsönhatások rendszerszintű vizsgálatának elvégzéséhez a következő részfeladatokat tűztük ki:

- Az antibiotikum rezisztencia evolúciót meghatározó evolúciós hajtóerők vizsgálata nagyléptékű laboratóriumi evolúciós kísérlet, valamint teljes-genom szekvenálás segítségével, *Escherichia coli* baktériumban.
- A keresztrezisztencia és járulékos érzékenység kölcsönhatások feltérképezése 12 klinikailag releváns, változatos hatásmechanizmusokat képviselő antibiotikum között egy saját fejlesztésű, nagy áteresztőképességű antibiotikum érzékenységi szűrés segítségével.
- Az evolúciós és a fiziológiás antibiotikum kölcsönhatások közötti összefüggések vizsgálata.
- A keresztrezisztencia kapcsolatok mintázatát meghatározó legfőbb irányelvek megértése.
- A járulékos érzékenység jelenségének hátterében álló molekuláris mechanizmusok részletes feltárása biokémiai vizsgálati módszerek használatával. Annak feltárása, hogy milyen gyakori a járulékos érzékenység és kihasználható-e a klinikai alkalmazásban?

IV. Anyag és Módszer

IV.1. Alkalmazott antibiotikumok, tápoldat és baktérium törzsek.

Antibiotikumok. Az alábbi 12 antibiotikumot alkalmaztuk a laboratóriumi evolúciós kísérlet, valamint az antibiotikum rezisztencia spektrum nagy áteresztőképességű szűrése során (lásd **1. táblázat**): ampicillin (AMP), cefoxitin (FOX), ciprofloxacin (CPR), nalidixsav (NAL), nitrofurantoin (NIT), kanamicin (KAN), tobramicin (TOB), tetraciklin (TET), doxiciklin (DOX), klóramfenikol (CHL), eritromicin (ERY), trimetoprim (TRM). Minden antibiotikumot a Sigma-Aldrich gyártott, kivétel az ERY, melyet az AMRESCO és a DOX, melyet az AppliChem gyártott. Az egyes antibiotikum porokból hetente friss, tömény oldatos készletet (stock) készítettünk, melyet filter sterilizáltunk és a felhasználásig -20°C-on tároltunk.

Tápoldat. Alapszabályként az összes kísérlet során azonos tápoldatot, illetve táptalajt alkalmaztunk, amennyiben a kísérlet ezt lehetővé tette. Ez a tápoldat egy a hosszútávú laboratóriumi evolúciós kísérletekhez optimalizált tápoldat módosított verziója¹⁴⁴. Az általunk alkalmazott minimal salts (MS) tápoldat összetevői: 1g/L (NH₄)₂SO₄, 3g/L KH₂PO₄ és 7g/L K₂HPO₄, kiegészítve 1.2mM nátrium-citráttal, 0.4mM magnézium-szulfáttal, 0.54 µg/mL vas(III)-kloriddal, 1 µg/mL tiamin-hidrokloriddal, 0.2% kazaminosavval és 0.2% glükózzal. A tápoldat összes összetevőjét a Sigma-Aldrich-től szereztük be.

Azokban az esetekben, ahol azt a kísérlet célja nem tette lehetővé, hogy minimál salts (MS) tápoldatot alkalmazzuk, gazdag tápoldatban növesztettük a baktériumokat. Például a mutációs ráta méréséhez nagy sejtszámú, tömény kultúrákra volt szükségünk, így a sejtek növesztéséhez az ilyen jellegű mérésekben általánosan alkalmazott LB (lysogeny broth) gazdag médiumot használtuk. Az LB tápoldat összetevői: 5g/L NaCl, 5g/L élesztő kivonat, 10g/L tryptone. Ezeket az összetevőket szintén a Sigma-Aldrich-től szereztük be.

Törzsek. Vad típusú törzsként az *Escherichia coli* K12 BW25113 törzsét alkalmaztuk. Az *Escherichia coli* az *Enterobacteriaceae* családba tartozó Gram-negatív baktérium. A kólibaktérium széleskörben alkalmazott, ideális modellorganizmus, laboratóriumi körülmények között könnyen tenyésztethető, s gyors generációs idejének köszönhetően könnyen is kezelhető. Ezen felül a széleskörű alkalmazásnak köszönhetően rengeteg molekuláris és genetikai ismeret áll rendelkezésünkre róla¹⁶⁷. Rendelkezésünkre áll továbbá a molekuláris működések megértését segítő számos kollekció, például az ASKA overexpressziós könyvtár, mely a kólibaktérium összes nyitott leolvasási keretét (open reading frame, ORF) külön-külön hordozza plazmidon egy túltermelést biztosító promóter

mögé klónozva¹⁶⁸; vagy a KEIO deléciós kollekció, melyet a kólibaktérium nem esszenciális génjeinek egyesével történő kiütésével hoztak létre¹⁶⁹. További előnye a kólibaktérium laboratóriumi evolúciós alkalmazásának, hogy természetes módon nem képes transzformációra, szigorúan aszexuális, így a spontán genomi mutációk jelentik az összes genetikai változatosságot, melyre a természetes szelekció hatni tud¹³⁴. További érv a kólibaktérium alkalmazása mellett, hogy az Egészségügyi Világszervezet (World Health Organization, WHO) 2017-ben megjelent, az antibiotikum kutatás és fejlesztés számára a legsürgetőbb patogén baktériumot felsorakoztató prioritási listáján a többi *Enterobacteriaceae* baktériummal együtt a kólibaktérium is az 1. számú, kritikus prioritási csoportban szerepel¹⁷⁰. A laboratóriumi kólibaktérium virulenciával rendelkező patogén változatai ugyanis számos betegséget, például húgyúti és emésztőszervi megbetegedéseket, szepszist, vagy akár agyhártyagyulladást is okozhatnak¹⁷¹.

IV.2. Laboratóriumi evolúciós kísérlet.

Laboratóriumi evolúciós kísérletünk során egy az irodalomban sűrűn alkalmazott protokollt alkalmaztunk kisebb módosításokkal^{158,172}. Az evolúció során az *Escherichia coli* K12 BW25113 baktérium párhuzamos populációit adaptáltattuk a 12 használt antibiotikum (**1. táblázat**) egyikének növekvő koncentrációjával szemben úgynevezett „batch” kultúrában. A párhuzamos populációkat 96-lyukú mikrotiter lemezen növesztettük folyamatos rázás mellett (~320 r.p.m.) 30°C-os hőmérsékleten. A növekedés során a lemezeket egy speciális szendvics tetővel (EnzyScreen) zártuk le az optimális oxigén ellátottság biztosítása és a párolgás minimalizálása érdekében. A baktérium populációk 1%-át (~1-1,2 µl stacioner kultúra) 24 óránként 100 µl friss tápoldatba oltottuk át 96-pines replikátor (VP407) segítségével. Ez az átoltási rend körülbelül 100-szoros hígítást, így napi körülbelül 6-7 duplikációt biztosított. Az antibiotikum koncentráció az evolúciós kísérlet kezdetén a félfatásos gátló koncentráció (IC50) alatti értékről indult, majd minden negyedik átoltás alkalmával másfélszeresére emelkedett. Az optikai sűrűséget minden egyes átoltást megelőzően 600nm-en (OD600) leolvastuk egy Biotek Synergy lemezleolvasón. Ahogy az várható volt, a laboratóriumi evolúció során a párhuzamos populációk változatos sejt denzitást értek el az egyes átoltások alkalmával, ami a független evolúciós útvonalakat tükrözi. Az egyes populációk kihalását a teljes növekedés gátlással definiáltuk (OD600<0.05). Az egyes antibiotikumokkal szemben addig folytattuk az evolúciós kísérletet, míg a 96-ból minimum 10 párhuzamos populáció mutatott növekedést vagy el nem értük az adott antibiotikum oldhatósági határát. A párhuzamos populációk kihalási dinamikájától és az oldhatósági határtól függően az evolúciós kísérlet körülbelül 240-384 generáción át tartott. Ezt követően antibiotikumonként a 10-10 legnagyobb sejtsűrűséget mutató párhuzamosan adaptált populációból, összesen 120 egyedi klónt izoláltunk további vizsgálatok céljából. További

10, antibiotikum-mentes környezetben adaptált párhuzamos populációból is izoláltunk egyedi klónt, melyeket később adaptált kontroll vonalakként használtunk. Az adaptált és kontroll vonalakat, valamint minden negyedik evolúciós mikrotiter lemezt -80°C-on 20% (v/v) glicerol oldatban őrzünk meg.

IV.3. Teljes genom szekvenálás.

A kiindulási törzset (*Escherichia coli* BW25113) és 63 adaptált vonalat (4-6 párhuzamosan adaptált, független vonalat antibiotikumonként) új-generációs szekvenálásnak vetettük alá, hogy felderítsük a rezisztencia hátterében álló mutációkat. A kiválasztott kólibaktérium törzsekből genomi DNS-t (gDNS) izoláltunk SIGMA GenElute Bacterial Genomic DNA kit felhasználásával. A genomi DNS izolálást én végeztem el, míg a teljes-genom szekvenálást, a nyers szekvencia adatok elemzését, majd az azt követő adatelemzési validálást a Szegedi Biológiai Kutatóközpont Szekvenáló Platformja végezte, Dr. Nagy István szakmai vezetésével. A SOLiD szekvenáláshoz (szekvenálás oligonukleotid ligálással és detektálással) az izolált gDNS-ből az 5500 SOLiD Fragment Library Core Kit (Life Technologies) segítségével készült fragmentum könyvtár. Röviden, 3 µg tisztított bakteriális gDNS-t Covaris S2 rendszerrel 100-250 bázispár hosszú fragmentumokra daraboltak. A fragmentált DNS szakaszok két végére ezután különböző adaptereket (P1 és P2) ligáltak, melyek kiindulási szekvenciaként szolgáltak mind az amplifikáció, mind a szekvenálás során. A P2 adaptor ezen felül egy 10 bázispáros „ujjlenyomat” (barcode) szekvenciát is tartalmaz, amely a multiplex szekvenálás alapjaként szolgál (5500 SOLiD Fragment Library Barcode Adaptors, Life Technologies). Ezután a templátokat méret szerint elkülönítették Agencourt AMPure XP rendszerrel (Beckman Coulter), majd „nick”-transzlálták őket Platinum PCR Amplification Mix felhasználásával. Ezt követően a templát könyvtárban a DNS mennyiségét kvantitatív PCR módszerrel számszerűsítették a SOLiD Library TaqMan Quantitation Kit (Life Technologies) segítségével. A templátokat ezután egyesével kovalensen kötötték egy-egy gyöngy felszínéhez a P1 adaptoron keresztül, majd az egyes templátokat klonális amplifikációval szaporították fel az emulziós PCR során. Ezt követően a templátot butanollal denaturálták és a klonálisan amplifikált DNS-t tartalmazó gyöngyöket kovalensen a szekvenáló lemezre kötötték, végül a SOLiD 5500xl System szekvenáló platformba helyezték¹⁷³. A szekvenálás eredményként több millió 50-75 bázispár hosszúságú rövid leolvasás (read) keletkezett.

Az 50 bázispárnál rövidebb, rossz minőségű szekvenciák eltávolítása után, a szekvenálás során nyert rövid szekvenciákat az *Escherichia coli* K-12 MG1655 referencia genomra (Accession NC_000913; Version NC_000913.2 GI: 49175990) illesztették. Az illesztéshez a Genomics Workbench (CLC Bio) és az Omixon Gapped SOLiD Alignment 1.3.2 plugin (Omixon) programokat használták fel. Az összes szekvenált törzsre minimum átlagosan

50-szeres lefedettséget értek el. Az illesztés során az egyes leolvasásokban (read) a maximális szünet (gap) és mismatch számát 2-ben, a hasonlósági hányadost pedig 0.8-ban határozták meg. Minimum 4 leolvasásnak igazolnia kellett a lehetséges eltéréseket a referencia genomtól, mielőtt az adott mutációt tovább vizsgálták.

Mivel a kiindulási törzsünkől (*Escherichia coli* K-12 BW25113) a szekvenálás elvégzésekor még nem állt rendelkezésre referencia genom, így a kiindulási törzset szintén megszekvenáltuk, majd a kiindulási törzsben azonosított mutációkat töröltük az adaptált vonalak mutációinak a listájáról. Az összes fennmaradó mutáció valódiságát ezután manuálisan ellenőrizték, hogy a nem megfelelő térképeződésből adódó fals eredményeket kizárhassák. A valódinak ítélt azonosított mutációkból végül random választott változatos mutációk meglétét kvantitatív PCR reakcióval és/vagy Sanger szekvenálással igazolták 3500 Series Genetic Analyzer (Life Technologies) segítségével. A szükséges primereket Genomics Workbench programmal tervezték meg.

A teljes-genom szekvenálás nyers eredményei az NCBI BioProject adatbázisban elérhetőek (Accession: PRJNA248327 ID: 248327).

IV.4. Mutációs ráta mérése fluktuációs teszttel

Két adaptált vonalban (AMP6, CPR6) olyan nagy számú mutációt azonosítottunk a teljes-genom szekvenálás során, hogy indokoltá vált a mutációs ráta meghatározása, melyet kollégám, Dr. Méhi Orsolya végzett el. A mutációs ráta meghatározására a rifampicin rezisztencia megjelenési gyakoriságán alapuló Luria-Delbrück féle fluktuációs tesztet alkalmaztuk. A nagymértékű rifampicin rezisztencia a kólibaktérium számára egyetlen mutációs lépéssel elérhető az RNS polimeráz béta alegységét kódoló *rpoB* gén pontmutációja által¹⁷⁴. A két adaptált vonalra (AMP6, CPR6) a rifampicin minimális gátló koncentrációja (MIC) azonos a vad típusú kiindulási törzsre mutatott MIC értékével. A fluktuációs teszt során az éjszakán át 30°C fokon LB (lysogeny broth) tápoldatban növesztett vad típusú és rezisztens kultúrákat 10⁴ sejt/ml töménységűre hígítottuk és ezzel a töménységgel üveg kémcsőben törzsenként 6-6 párhuzamos kultúrát indítottunk el. 24 órás 30°-on történő inkubációt követően a sejt kultúrákat kétféle LB agarra szélesztettük. Egyrészt a rifampicin rezisztens sejtek számának meghatározásához 50-100 µl tömény sejt kultúrát 100 µg/ml koncentrációjú rifampicint tartalmazó LB agar lemezekre szélesztettünk, másrészt az össz-sejtszám (colony forming unit, CFU) meghatározásához a tömény sejt kultúrából hígítási sort készítettünk, s a megfelelő hígítási lépésekből nem szelektív LB agarra kentünk ki. A nem szelektív agaron a kolóniákat 24 óra elteltével számoltuk meg, míg a rifampicint tartalmazó agaron 48 óra elteltével voltak megszámálhatóak a telepek. Ezt követően a mutációs rátát az MSS

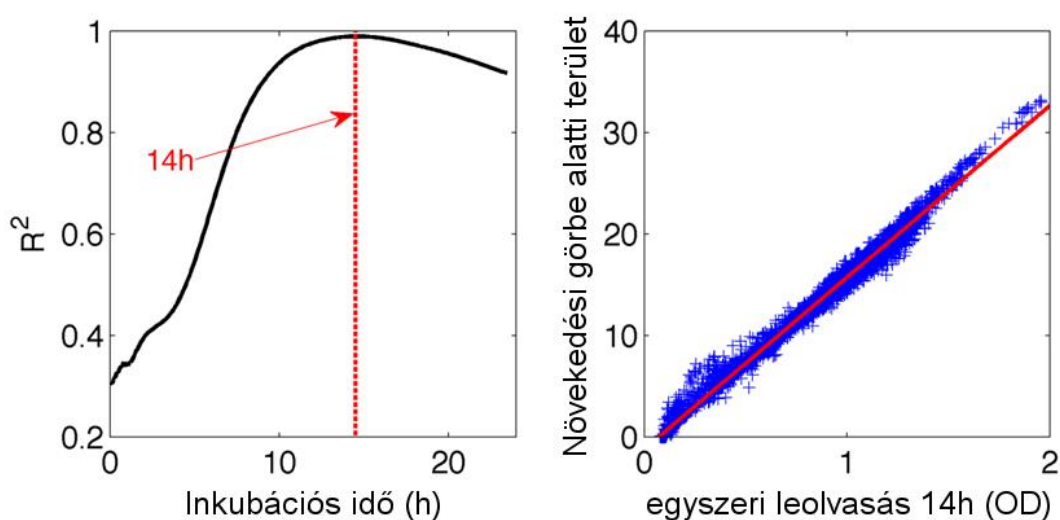
maximum-likelihood (Ma-Sandri-Sarkar legnagyobb valószínűség) módszer segítségével, a FALCOR (Fluctuation AnaLysis CalculatOR) online program felhasználásával számítottuk ki¹⁷⁵.

IV.5. Az antibiotikum rezisztencia spektrum nagy áteresztőképességű szűrése.

Következő lépésként a laboratóriumi evolúciós kísérlettel létrehozott 120 párhuzamos adaptált vonal érzékenységbeli változásait (keresztrezisztenciáját és járulékos érzékenységet) vizsgáltuk az adott vonal által még nem ismert 11 másik antibiotikummal szemben. Az összesen 1320 (120*11) adatpont feltérképezésének céljával létrehoztunk egy nagy áteresztőképességű szűrést és egy robusztus statisztikai eljárást. A nagy áteresztőképességű szűrés során a baktérium vonalakat folyadékkultúrában növesztettük az antibiotikum letális koncentráció alatti (sublethal) koncentrációjú jelenlétében, mely koncentráció körülbelül 50%-ban gátolta a baktérium növekedését. Minden adaptált vonal minden mérésnél 4 technikai replikátumban szerepelt (azonos 384-lyukú lemezen). Kontrollként szerepelt továbbá a lemezen a vad típusú kiindulási törzs is antibiotikumot tartalmazó és antibiotikummentes tápoldatban egyaránt, összesen 40 replikátumban. Ezen felül az antibiotikummentes tápoldatban adaptáltatott vonalak is szerepeltek kontrollként a 384-lyukú lemezeken (adaptált kontroll vonalak), hogy a környezet-specifikus fitness hátrányt elkülöníthessük a rezisztencia általános költségeitől. Mivel az antibiotikumok 50%-os gátló koncentrációját nehéz pontosan reprodukálhatóan előállítani, ezért minden egyes adaptált vonalra minden egyes antibiotikummal szemben minimum négy független mérést végeztünk. A reprodukálhatóság növelésének érdekében a 384-lyukú lemezek összeállításához és beoltásához folyadékkezelő robotizált rendszert (Hamilton Star Workstation) alkalmaztunk.

A bakteriális növekedés monitorozása. A bakteriális növekedést a folyadékkultúrák beoltását követően 14 órával az optikai sűrűséget (OD600) egy alkalommal leolvasva jegyeztük fel. Előzetes eredményeink azt mutatták, hogy a 14 órás inkubációt követő egyszeri leolvasás eredményei nagyon erős korrelációt mutatnak ($R^2 > 0.99$) a standard eljárásnak számító növekedési görbe alatti terület mérésén alapuló eredményekkel, mely utóbbi mérési eredmény felméri az antibiotikum gátló hatását a teljes bakteriális növekedési periódus során (**8. ábra**). Az ideális egyszeri leolvasási időpont azonosításához a vad típusú kiindulási törzset vizsgáltuk különböző antibiotikum stressz hatás alatt. Összesen 10 db 384-lyukú lemezen monitoroztuk a kólibaktérium párhuzamos sejtkultúráinak növekedését. Minden lemez más antibiotikum 50%-os gátló

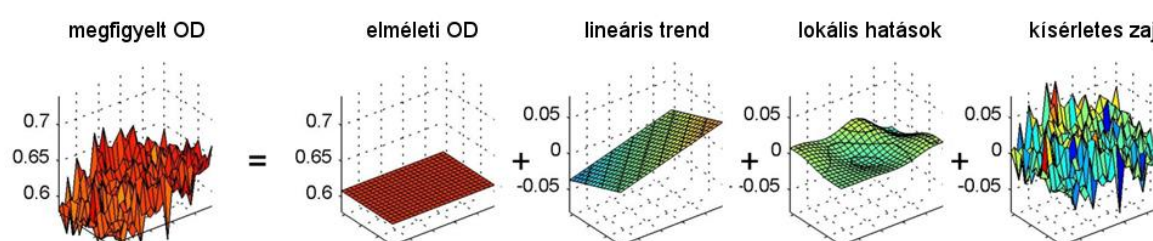
koncentrációját tartalmazta. A lemezeket Synergy 2 lemezleolvasóban ráztattuk és inkubáltuk. Az optikai sűrűséget (OD600) 24 órán át olvastuk le 60 percenként az optimális leolvasási időpont azonosításához. A nyers OD adatokat mind az optimalizálás, mind a kísérlet elvégzése során az alábbi transzformációval ($OD_{\text{kalibrált}} = OD + 0.40449 \cdot OD^3$) kalibráltuk a nagy sejtsűrűségnél mért OD érték és a valódi sejtsűrűség nem-lineáris összefüggése miatt (magasabb sejtsűrűségnél a sejtek eltakarják egymást, így az OD érték a valós sejtsűrűségnél alacsonyabb sejtsűrűséget mutat)¹⁷⁶. A görbe alatti területet ugyanezekből az eredményekből számítottuk ki egy MATLAB script segítségével, majd egy lineáris regressziós modellel megbecsültük minden egyes leolvasási időpontnak az OD értékéből ($384 \cdot 10 = 3840$ adatpont leolvasásonként), hogy az adott OD értékek mennyire tükrözik a görbe alatti területből nyert növekedési adatokat.



8. ábra. A nagy áteresztőképességű antibiotikum érzékenységi szűrés egyszeri leolvasási pontjának optimalizálása

A lemez-hatás kiszűrése. Az inkubáció során a hőmérséklet és a páratartalom minimális eltérései jellegzetes mintázatban befolyásolják a lemezen a baktériumok növekedését. Ennek a lemez-hatásnak (plate effect) az ellensúlyozására a nyers OD érték alapján a relatív fitness számolása során egy normalizációs eljárást alkalmaztunk. A lemezen belüli szisztematikus, az egyes lyukak pozíciójából származó lemez-hatások (plate effect) kiszűréséhez minden lemezen 40, a lemezen egyenletesen elosztott kontroll lyukat használtunk, melyek antibiotikummentes tápoldatot tartalmaztak és vad típusú kiindulási törzzsel oltottuk be. Ezek a kontroll lyukak alapján egyrészt meg tudtuk határozni a várható maximális növekedést, másrészt meg tudtuk figyelni és ellensúlyozni tudtuk a lemezen belüli hatásokat (plate effect). Pontosabban, regressziós eljárással következtettünk arra, hogy a 384 lyuk mindegyikében milyen növekedést mutatna a vad típusú kiindulási törzs antibiotikummentes tápoldatban a 40 kontroll lyukban mért adatok

alapján. Mivel az egyes lemezek között is fordulhatnak elő eltérések, minden egyes lemezre külön modellt illesztettünk. A modell további pontosításának érdekében a kísérlet előtt 16 olyan kontroll lemezt is leolvastunk és kiértékelünk, melyek mind a 384 pozícióban vad típusú kiindulási törzset tartalmaztak antibiotikummentes tápoldatban. Ennek az előkísérletnek az eredményei aztán hiperparaméterekként szerepeltek a regressziós modellben. Az előkísérletben megfigyelt OD értékeket az alábbi komponensekre bontottuk szét: i) egy konstans OD érték, melyet abban az esetben várnánk, ha nincs jelen lemez-hatás vagy zaj (elméleti OD), ii) egy lineáris trend, ami a lemezen belüli oszloponkénti és soronkénti lineáris lemez-hatásokból adódik össze (lineáris trend), iii) egy simított felület, ami a lokális és nem-lineáris lemez-hatásokat írja le (lokális hatások) és iv) a kísérletes zaj (9. ábra).



9. ábra. A lemez-hatás regressziós modellezése a nagy áteresztőképességű antibiotikum érzékenységi szűrés során.

Míg a lineáris trendet lineáris regresszióval modelleztük, a lokális hatások és a kísérletes zaj becslésére Gauss-folyamat regressziót alkalmaztunk¹⁷⁷. Azért döntöttünk a Gauss-folyamat regresszió mellett, mert egyrészt ez igen alkalmas a nem-lineáris térbeli változatosság modellezésére, másrészt egyszerre képes mind a kísérletes zajt, mind a lokális hatásokat megbecsülni a 40 kontroll lyuk alapján, harmadrészt pedig előzetes eredményeink azt mutatták, hogy a Gauss-folyamat regresszió hatékonyan tünteti el a lineáris regressziót követően a lemezen maradó szisztematikus hibákat. A kísérletet követően további 8 független kontroll lemez lemérésével igazoltuk, hogy a 40 kontroll lyuk eredményei alapján végzett lineáris trendekre és lokális hatásokra történő korrekció jelentősen csökkentette a mérési hibák jelenlétét a maradék 344 lyukban. A maradék 344 lyukban mért optikai sűrűség (OD) értékek alapján az alábbi képlettel számoltuk ki az egyes fitnessz értékeket: $\text{fitnessz} = (\text{OD} - \text{OD}_{t0}) / (\text{OD}_{\text{control}} - \text{OD}_{t0})$, ahol az $\text{OD}_{\text{control}}$ a 40 kontroll lyuk regressziós modellezéssel nyert eredménye, az OD_{t0} pedig a lyuk kiindulási OD értéke (teljes gátlásnál, bakteriális növekedés nélkül). A lemez-hatás regressziós modellezését kollégáim: Fekete Gergely, Busa-Fekete Róbert és Kégl Balázs végezte el.

A kísérleti adatok feldolgozása. Ezt követően első lépésben kiszűrtük a nem megbízható minőségű méréseket az alábbi három kritérium alapján: 1) kizártuk azokat a méréseket, ahol a lemez feltehetően befertőződött (a beoltás nélküli, steril tápoldatot tartalmazó lyukakban is volt növekedés), 2) kizártuk azokat a méréseket is, ahol az antibiotikummentes tápoldaton a kiindulási kontroll törzsek növekedésében túl nagy volt a variancia (a variációs koefficiens nagyobb volt, mint 20%), 3) továbbá kizártuk azokat a méréseket is, ahol az antibiotikum koncentrációja olyan magasnak bizonyult, hogy az adaptált kontroll vonalak növekedését nagymértékben gátolta (minimum 90%-os gátló koncentráció). Ezt a minőségellenőrzési lépést követően adaptált vonal – antibiotikum páronként 2-3 független mérés eredményei bizonyultak megbízhatónak, s ezekkel az eredményekkel dolgoztunk a továbbiakban.

A statisztikailag szignifikáns evolúciós kölcsönhatások azonosítása céljából az adaptált vonalak növekedésének normalizált értékét hasonlítottuk össze az adaptált kontroll vonalak növekedésével, azonos kezelési környezetben. Pontosabban, a növekedési adatokat felhasználva azt vizsgáltuk, hogy antibiotikumonként a 10 párhuzamos adaptált vonal csoportjának adott antibiotikummal szembeni összesített növekedése a 10 adaptált kontroll vonal csoportjának összesített növekedésétől mutatott-e minimum 10%-os eltérést azonos kísérleti körülmények között. A statisztikai szignifikanciát nem-parametrikus bootstrap módszerrel számoltuk ki¹⁷⁸. Minden egyes adaptált vonal növekedését a négy technikai replikátum mediánjaként határoztuk meg. Ezt követően a független kísérleti futásokból származó eredmények p-értékeit Fisher-féle kombinált teszttel (Fisher's combined probability test) egyesítettük **(1. függelék)**. Legvégül felállítottunk egy szigorú statisztikai eljárást, amivel biztosítottuk, hogy az antibiotikum rezisztencia általános fitness költségétől a járulékos érzékenység kapcsolatok jól elkülönüljenek. Erre azért volt szükségünk, mert azt tapasztaltuk, hogy számos antibiotikum-adaptált vonalunk mutat növekedési problémákat antibiotikummentes tápoldatban, ami igencsak költséges rezisztencia mechanizmusok jelenlétére utal. Ehhez először is kiszámoltuk a relatív fitness különbséget (RF) az egyes antibiotikum-adaptált vonalak és a vad típusú kiindulási törzs között az alábbi képlettel: $RF = (F_r - F_k) / F_k$ ha $F_r < F_k$, ellenkező esetben $RF = (F_r - F_k) / F_r$, mely képletben F_r az adaptált (rezisztens) vonal fitnessét, F_k pedig az adaptált kontroll törzsek fitnessét jelöli. Az RF értékét kiszámoltuk az összes törzsre az összes környezet (beleértve az antibiotikummentes környezetet is) jelenlétében. Az alacsony RF érték antibiotikummentes környezetben a rezisztencia általános fitness költségére utal, míg az antibiotikumot tartalmazó tápoldatban megfigyelt kiugróan alacsony RF érték járulékos érzékenységre utal. Az antibiotikummentes és antibiotikum jelenlétében megfigyelt RF értékeket összevetve minden egyes törzs és antibiotikum esetében Mann-Whitney-Wilcoxon rangösszeg próba (Wilcoxon Rank Sum test) segítségével döntöttük el, hogy az antibiotikum jelenlétében mért RF érték szignifikánsan alacsonyabb-e az antibiotikummentes környezetben mért RF értéknél **(2. függelék)**. Csak a statisztikailag szignifikáns különbséget mutató ($P < 0.05$ az FDR korrekciót követően) eseteket tekintettük valódi járulékos érzékenységnek **(3. függelék)**. Ezt az

eljárást csak azokban az esetekben végeztük el, ahol az antibiotikum-adaptált vonal jóval kisebb növekedést mutatott az adaptált kontroll vonalaknál azonos körülmények között.

További ellenőrzésként a keresztrezisztencia kapcsolatokra vonatkozó eredmények egy jelentős részét E-teszt méréssel igazoltuk (**4. függelék**).

IV.6. Az adaptált vonalak relatív fitness értékének megállapítása

A 120 párhuzamos adaptált vonal fitness költségének megállapítását a IV. 5. pontban részletesen leírt nagy áteresztőképességű szűrés során végeztük el azzal a céllal, hogy a megfigyelt járulékos érzékenységet el tudjuk különíteni az antibiotikum rezisztencia általános fitness költségétől. Az általános fitness költség megállapításának érdekében a nagy áteresztőképességű szűrésben használt összes 384-lyukú mérőlemezzel az egyes antibiotikumokat tartalmazó lemezek mellett egy-egy antibiotikummentes lemezt is beoltottunk. Az antibiotikummentes lemezek optikai denzitásának (OD600) 14 órás inkubációt követő egyszeri leolvasásával nyert adatokat az antibiotikumos mérésekkel azonos eljárással dolgoztuk fel. Röviden:

- 1) A nyers OD adatokat kalibráltuk a nagy sejtsűrűsége ($OD_{kalibrált} = OD + 0.40449 \cdot OD^3$).
- 2) Ezt követően korrigáltunk a lemez-hatásra ($fitness = (OD - OD_{t0}) / (OD_{control} - OD_{t0})$), ahol az $OD_{control}$ a 40 kontroll lyuk regressziós modellezéssel nyert eredménye, az OD_{t0} pedig a lyuk kiindulási OD értéke (teljes gátlásnál, bakteriális növekedés nélkül).
- 3) Végül kiszámoltuk a relatív fitness különbséget ($RF = (F_r - F_k) / F_k$ ha $F_r < F_k$, ellenkező esetben $RF = (F_r - F_k) / F_r$, mely képletben F_r az adaptált (rezisztens) vonal fitnessét, F_k pedig az adaptált kontroll törzsek fitnessét jelöli).

IV.7. Kémiai és kemogenomikai profil hasonlósági vizsgálatok

Kémiai hasonlóság. A felhasznált antibiotikumok kémiai hasonlóságát a CDK (Chemistry Development Kit) kemoinformatikai Java könyvtár eszközeit R programnyelvben felhasználva számítottuk ki¹⁷⁹. A kémiai hasonlóságot az általunk alkalmazott Tanimoto koefficiens a kémiai „ujjlenyomatok” (chemical fingerprint) hasonlóságában méri³⁰. A kémiai hasonlóság számolását kollégám, Györkei Ádám végezte el.

Kemogenomikai hasonlóság. A kemogenomikai hasonlóság kiszámításához a Girgis és munkatársai által korábban azonosított, az antibiotikum érzékenységet befolyásoló gének szettjeinek páronkénti Jaccard hasonlósági koefficiensét számoltuk ki¹⁸⁰. Ez a kemogenomikai szűrés 9 antibiotikumot lefedett az általunk vizsgált 12 antibiotikumból. Mivel ez a kemogenomikai szűrés egy nagyon érzékeny kompetíciós vizsgálatra épült, különösen hasznosnak bizonyult olyan gének azonosítására, melyeknek az inaktivációja növeli az antibiotikum rezisztenciát. A kemogenomikai hasonlóság számolását kollégám, Dr. Lázár Viktória végezte el.

IV.8. Egyedi mutánsok létrehozása

Az antibiotikum rezisztencia és az evolúciós kölcsönhatások molekuláris hátterének megértése céljából kiválasztottunk 9 olyan mutációt, melyeknek kulcs szerepe lehet a rezisztencia és az evolúciós kölcsönhatások kialakításában, és ezeket a mutációkat külön-külön visszaillesztettük a vad típusú kiindulási törzsbe. A mutációk visszaillesztését öngyilkos (suicide) plazmidon alapuló marker- és „hegmentes” (scarless) módszerrel végeztük el, így a mutációt hordozó törzsek csak az adott kromoszómális régió szekvenálásával voltak megkülönböztethetőek. A mutáció visszaillesztés elvégzése során a módszer lépéseinek korábbi leírását, valamint az eredeti protokollban használt és leírt plazmidokat (pST76-A, pSTKST) alkalmaztuk^{181,182}. Röviden, egy körülbelül 800 bázispár hosszú DNS fragmentet, melynek közepén szerepelt a kívánt pontmutáció, beklónoztunk a hőérzékeny öngyilkos plazmidba. A plazmid konstruktot ezután a vad típusú kiindulási törzsbe transzformáltuk, ahol a plazmid képes volt integrálódni a kromoszómára a mutáns allél és az annak megfelelő kromoszómális régió között létrejövő egyszeres crossover által. A megfelelően beépült plazmidokkal rendelkező sejtekre ezután a plazmidon hordozott antibiotikum rezisztencia markerrel volt lehetőség szelektálni. Mindeközben a kísérlet hőmérséklete nem tette lehetővé a hőérzékeny plazmid replikációját. Ezt követően a pSTKST segéd (helper) plazmidot is a sejtbe transzformáltuk, majd a sejten belül indukáltuk, hogy termelje az I-SceI meganukleáz enzimet. Az indukálás során a gén promóterének Tet represszorát inaktíváljuk egy derepresszor, a klór-tetraciklin hozzáadásával. Az I-SceI meganukleáz enzim elhasítja a kromoszómát az integrált plazmidon szereplő 18 bázispár hosszú felismerő helynél. A létrejövő kromoszómatörést ezután a RecA-mediálta intramolekuláris rekombináció javítja meg a törés közelében lévő homológ szekvenciák alapján. A rekombinációs javítás így egyaránt vezethet a vad típusú kromoszóma visszaállításához vagy a kívánt mutáció marker-mentes beillesztéséhez.

Mivel a fenti módszer nem működött a 9 kiválasztott mutáció közül két, a *gyrA* gént érintő mutáció (S83→L és D87→G) esetében, így ennél a két mutációnál az oligonukleotid-mediálta λ Red rekombinációt alkalmaztuk. A λ Red rekombináz

intracelluláris termeltetéséhez a pBAD $\alpha\beta\gamma$ arabinóz indukálható λ Red expressziós plazmidot használtuk. A rekombinációhoz szükséges oligonukleotidokat a standard előírások alapján terveztük meg¹⁸³. Röviden, a rekombinációhoz felhasznált oligonukleotidok rendelkeznek egy a replikálódó DNS lemaradó szálával komplementer szekvenciával és minimális másodlagos struktúrát vesznek fel. Ezen felül, minden oligonukleotid két egymást követő foszforotioát kötéssel rendelkezik mind az 5', mind a 3' végen az endogén nukleázok általi hasítás elkerülésének érdekében. Az oligonukleotidokat a standard tisztaságban és sómentesítve rendeltük az Integrated DNA Technologies (IDT) cégtől. A rekombináció során a plazmidot tartalmazó vad típusú sejteket 100 $\mu\text{g/mL}$ koncentrációjú ampicillint tartalmazó, 10 mL végtérfogatú LB tápoldatban növesztettük éjszakán át starter kultúrának 37°C fokon 250 r.p.m. erősségű rázás mellett, míg az OD(550) = 0,5-0,7 közötti értéket el nem érték. A λ Red fehérje expresszióját 0.2% végkoncentrációjú L-Arabinóz hozzáadásával indukáltuk 30 percen át. A rekombinációhoz ezután a sejteket kiülepítettük (3800r.p.m. sebességgel 7 percig centrifugálva), és kétszer mostuk jéghideg desztillált vízzel (dH_2O), majd 160 μL tisztított vízben (dH_2O) szuszpendáltuk őket ismét. A sejtszuszpenzióból 40 μL -t elektroporáltunk az adott mutációhoz szükséges oligonukleotiddal 2.5 μM végkoncentrációban. Az elektroporált sejtek 10 mL LB tápoldatban 37°C fokon éjszakán át regenerálódtak. Másnap a sejteket LB agar lemezekre szélesztettük, mely 100 ng/mL ciprofloxacin tartalmazott (mindkét bevitt mutáció ciprofloxacin rezisztenciát biztosít). A mutációk sikeres bevitelét a célzott kromoszómális régió szekvenálásával igazoltuk. Az egyedi mutánsokat kollégám, Dr. Csörgő Bálint hozta létre.

IV.9. Bakteriális membránpotenciál mérése

A különböző antibiotikum rezisztencia mechanizmusok membránpotenciálra gyakorolt hatásának vizsgálatához antibiotikumonként két-két adaptált vonalat választottunk ki véletlenszerűen. A membránpotenciál mérését a BacLight Bacterial Membrane Potential Kit (B34950, Invitrogen) felhasználásával áramlási citométeren (GUAVA EasyCyte 8HT Capillary Flow Cytometer) végeztük el. Az éjszakán át 30°C fokon, szűrt MS tápoldatban növesztett sejt kultúrákat 10^6 sejt/ml koncentrációra hígítottuk szűrt PBS (phosphate-buffered saline) foszfát pufferben, majd a hígított bakteriális szuszpenziókból 200-200 μL térfogatot osztottunk szét mikrotiter lemezen a festés kivitelezéséhez. A festést a kitben található fluoreszcens DiOC2(3) (3,3'-Dietiloxakarbocianin-jodid) festéssel végeztük el. A DiOC2(3) festék a bakteriális sejtekbe jutva alacsony koncentrációban zölden fluoreszkál. Magas membránpotenciállal rendelkező sejtekben azonban a festék olyan mértékben halmozódik fel, hogy a festék molekulák kölcsönhatása révén a fluoreszcencia a vörös irányába tolódik el^{184,185}. A DiOC2(3) festéket a kitben javasolt 0.03 mM-os végkoncentrációban adtuk a bakteriális szuszpenziókhoz (antibiotikumot a szuszpenziók

nem tartalmaztak). A festékkel a sejteket 30 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten sötétben, majd tízszeres hígítást követően áramlási citométerben mértük a sejtek zöld és vörös fluoreszcenciáját. A műszert a kit ajánlásainak megfelelően állítottuk be. Összesen törzsenként 15 000 sejt fluoreszcenciáját rögzítettük. A vörös és zöld fluoreszcencia értékek hányadosával a membránpotenciált a sejtek méretétől függetlenül, pontosan tudjuk meghatározni. Az aminoglikozid és nem-aminoglikozid adaptált vonalak vörös/zöld hányadosából a vad típusú kiindulási törzs három replikátumának átlagához viszonyítva számoltuk ki a relatív membránpotenciál változást. A mérés igazolására felhasználtunk egy negatív kontrollt is: a kitben található CCCP (karbonil cianid m-klorofenil hidrazon) proton ionofórral kezelt vad típusú kiindulási baktérium sejtek a kezelés hatására teljesen elvesztették membránpotenciáljukat.

IV.10. Hoechst akkumulációs mérés

Az adaptált vonalak membrán permeabilitásának változásait a Hoechst fluoreszcens festék (H33342 bisbenzimide) intracelluláris akkumulációján alapuló, felskálázható méréssel vizsgáltuk¹⁸⁶. Az antibiotikum-adaptált vonalakat éjszakán át növesztettük MS médiumban 30°C fokon, majd az optikai sűrűséget OD600 = 0,3 értékre állítottuk. Ezt követően 180-180 µl baktérium kultúrát átmértünk 96-lyukú mikrotiter lemezre, törzsenként 8 technikai replikátumban. A lemezt ezután Synergy 2 lemezleolvasóban inkubáltuk 30°C fokon, s a 25 µM végkoncentrációjú Hoechst festéket (Sigma) minden egyes lyukba azonos időpontban juttattuk be egy automata injekciós rendszerrel (Biotek dispenser box). Az OD és a fluoreszcencia görbéket 1 órán át mértük, 75 másodpercenként leolvasva. Az első 15 adatpontot kizártuk a későbbi adatelemzésből a technikai replikátumok közötti nagy standard deviáció miatt. A nyers OD értékeket a korábbiakban leírtak alapján kalibráltuk, majd kiszámoltuk a fluoreszcencia per OD arány görbéket. Ezután ezen arány görbének a görbe alatti területét határoztuk meg, majd ebből számoltuk tovább a relatív Hoechst akkumulációt az azonos lemezen mért vad típusú kiindulási törzshöz viszonyítva.

IV.11. Minimális gátló koncentráció (MIC) mérése hígítási soron, valamint E-teszt csíkok segítségével

Hígítási sor. Az MIC méréseket általában egy standard lineáris hígítási soron alapuló technikával végeztük¹⁸⁷. A mérések pontosságának és reprodukálhatóságának maximalizálása érdekében egy robotizált folyadékkezelő rendszert (Hamilton Star

Workstation) használtunk a 11 lépéses hígítási sorok elkészítéséhez a 96-lyukú mikrotiter lemezekben. A kész lemezekbe körülbelül 10^5 sejtet oltottunk lyukanként egy 96-túvel rendelkező pin replikátor segítségével. A hígítási soron vonalanként 4 technikai replikátum szerepelt. A beoltott lemezeket 30°C fokon 300 r.p.m. erősségű rázás mellett inkubáltuk. 24 órás inkubációt követően a nyers OD adatokat Synergy 2 lemezleolvasóban olvastuk le. Az MIC, tehát a nem növekedés cutoff értékét az alábbiak szerint határoztuk meg: a baktériummentes kontroll lyukak OD értékének átlaga ± 2 standard deviáció.

E-teszt. Az E-teszt csíkokat a kizárólagos gyártótól, a bioMerieux-től szereztük be. Az E-teszt inokulum előkészítés és szélesztés, a csík elhelyezése és az MIC meghatározása a gyártó leírása alapján történt¹⁸⁸. Röviden, az éjszakán át növesztett baktérium kultúrákat OD600 = 0,6 sűrűségűre hígítottuk, majd 100-100 μ l baktérium szuszpenziót szélesztettünk MS agar lemezekre. A lemezekben ezután elhelyeztük az E-teszt csíkokat, majd 24 órát követően a leírásnak megfelelően kiértékeljük a kísérlet eredményeit.

IV.12. AcrAB efflux pumpa overexpressziós és deléciós vizsgálatok

Az AcrAB efflux rendszer evolúciós kölcsönhatásokban betöltött szerepének vizsgálata céljából 3 különböző törzset módosítottunk az alábbiak szerint: egyszer az *acrB* gént deletáltuk, a másik esetben pedig az AcrAB efflux pumpát kódoló multicopy plazmidot (pUCacrAB) transzformáltuk ezekbe a törzsekbe. A 3 kiválasztott törzset a vad típusú kiindulási törzs, a *trkH* és *cyoB* mutációt hordozó aminoglikozid-adaptált TOB3-as vonal, valamint az egyetlen *trkH* mutációt hordozó *trkH** (T350L) törzs jelentette. A megfelelő *acrB* deléciós törzseket (Δ acrB/control, Δ acrB/*trkH**, Δ acrB/TOB3) egy standard P1 transzdukciós módszerrel hoztuk létre¹⁶⁹. Az efflux pumpák számának növeléséhez pedig az efflux pumpát kódoló géneket és natív promóterüket hordozó, magas kópiaszámú pUCacrAB plazmidot transzformáltuk a megfelelő törzsekbe (pUCacrAB/control, pUCacrAB/*trkH**, pUCacrAB/TOB3) egy korábbi tanulmány leírása alapján¹⁸⁹. A pUCacrAB plazmidot Dr. Kunihiro Nishino és Dr. Akihito Yamaguchi biztosította számunkra (Osaka University, Osaka, Japan).

V. Eredmények

V.1. Nagyléptékű laboratóriumi evolúciós kísérlet az egyes antibiotikumokkal szemben magas rezisztenciával rendelkező törzsek létrehozására.

Nagyléptékű laboratóriumi evolúciós kísérletünkhöz egy az irodalomban már leírt protokoll¹⁵⁸ módosított verzióját alkalmaztuk. Egyetlen közös ősből (*Escherichia coli* BW25113) kiindulva, a 12 kiválasztott antibiotikum (**1. táblázat**) egyikének fokozatosan növekvő koncentrációjú jelenlétében 96-96 párhuzamos kólibaktérium populációt növesztettünk úgynevezett „batch” kultúrában. A „batch” kultúrában meghatározott térfogatú, tápanyagokban szegény tápoldatba történik a baktérium sejtek beoltása, s az inkubációs idő (jelen esetben 24 óra) alatt a rendszer zárt marad, így a baktérium populáció növekedésével, a tápanyag fogyatkozásával és a salakanyag felhalmozódásával egy folyamatosan változó környezet jön létre¹⁹⁰. 24 óránként a kultúra 1%-a friss tápoldatba került átoltásra. A kezdetben még a gátló koncentráció alatti tartományban jelenlévő antibiotikum koncentrációját minden negyedik átoltásnál másfélszeresére növeltük. A baktérium populációk így a környezeti szennyeződésekhez, valamint az emberi testben az antibakteriális kemoterápiák által kialakított koncentráció grádienshez hasonlóan, az adott antibiotikum fokozatosan növekvő koncentrációjával találták szembe magukat^{15,191}.

2. táblázat. Az egyes antibiotikumokkal szembeni evolúciós kísérlet időtartama, valamint végpontjának paraméterei.

Alkalmazott antibiotikum	Rövidítés	Átoltások száma	Generációk becsült száma	A kiindulási MIC-hoz viszonyítva hányszorosára nőtt a koncentráció?	A 96 populációból hány mutatott az evolúció végén növekedést*?	A koncentráció elérte az oldhatósági határt?
ampicillin	AMP	30	180-210	20-szoros	11	nem**
cefoxitin	FOX	48	288-336	328-szoros	10	nem**
ciprofloxacin	CPR	48	288-336	328-szoros	16	nem**
doxiciklin	DOX	30	180-210	20-szoros	42	nem**
eritromicin	ERY	33	198-231	28-szoros	20	nem**
kanamicin	KAN	45	270-315	146-szoros	28	igen
klóramfenikol	CHL	48	288-336	328-szoros	23	igen
nalidixsav	NAL	48	288-336	328-szoros	24	igen
nitrofurantoin	NIT	30	180-210	20-szoros	16	nem**
tetraciklin	TET	39	234-273	65-szörös	11	igen
tobramicin	TOB	45	270-315	146-szoros	27	igen
trimetoprim	TRM	36	216-252	43-szoros	18	nem**

* A növekedést a 24 órát követő OD > 0.1 értékben határoztuk meg.

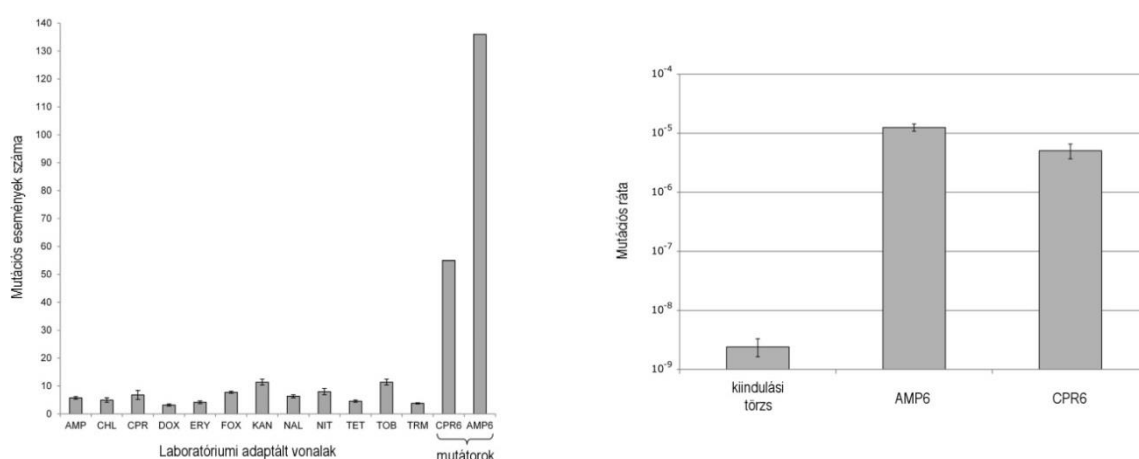
** Az evolúció azért ért véget, mert a következő koncentráción kevesebb, mint 10 populáció mutatott növekedést.

Az antibiotikum koncentrációjának fokozatos növelését szigorúan betartva a kísérletet addig folytattuk, amíg minimum 10 párhuzamos populáció növekedni tudott az adott antibiotikum jelenlétében, vagy amíg az adott antibiotikum oldhatósági határát el nem érték. Végül a laboratóriumi evolúció 240-384 generáción át tartott, ám a rövid időtartam ellenére nagyon magas, akár 328-szoros minimális gátló koncentráció (MIC) feletti értékig értünk el az alkalmazott antibiotikumok koncentrációjában, melyen a párhuzamosan

adaptált vonalak még növekedni tudtak (**2. táblázat**). Ezt követően antibiotikumonként 10-10 párhuzamos, összesen 120 adaptált vonalat választottunk ki további vizsgálatra. Emellett további 10 párhuzamos populációt adaptáltattunk antibiotikum-mentes tápoldatban, ezeket adaptált kontrol vonalakként használtuk fel a későbbiekben.

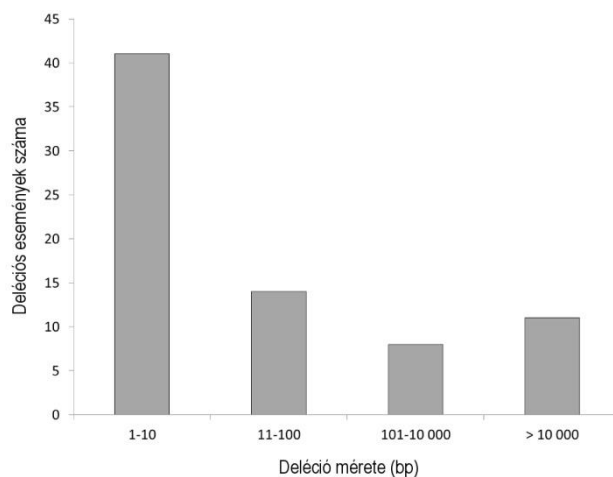
V.2. Az adaptív mutációk domináltak a laboratóriumi evolúcióval létrehozott antibiotikum rezisztens vonalakban.

A laboratóriumi evolúció végén, az egyes antibiotikumokkal szemben adaptáltatott 10-10 független párhuzamos vonalból kiválasztottunk összesen 63-at (5-6 vonalat antibiotikumonként), melyekből egyedi kolóniákat izoláltunk teljes-genom szekvenálásra, azzal a céllal, hogy feltérképezzük a rezisztencia mögött rejlő változatos molekuláris mechanizmusokat. A teljes-genom szekvenálás SOLiD platformon zajlott (Applied Biosystems). A mutációk sikeres azonosításához az evolúciós kísérlet kiindulási törzse is szerepelt 64.-ként a szekvenált vonalak között. Mivel ekkor még az általunk alkalmazott *Escherichia coli* BW25113 törzsrre nem állt rendelkezésünkre az azóta már elkészített referencia genom¹⁹², így első lépésben mind a 64 szekvenált vonalunkhoz a *Escherichia coli* K-12 MG1655 törzs teljes-genom szekvenciáját alkalmaztuk referencia genomként¹⁹³, majd ezután az egyes adaptált vonalak mutációit a kiindulási törzsünkben azonosított mutációkhoz viszonyítva azonosítottuk a laboratóriumi evolúció során megjelent mutációkat. A teljes-genom szekvenálást, a nyers szekvencia adatok elemzését, majd az adatalemzési eljárás validálását a Szegedi Biológiai Kutatóközpont Szekvenáló Platformja végezte, Nagy István szakmai vezetésével.



10. ábra. Az evolúciós kísérlet során párhuzamos vonalanként megjelenő átlagosan 5-6 mutációval szemben, a megnövekedett mutációs ráta következtében a CPR6 vonal 55, míg az AMP6 vonal 136 mutációt hordozott. A Luria–Delbrück féle fluktuációs teszt alapján az AMP6 és CPR6 vonalak mutációs rátája közel 3 nagyságrenddel növekedett az evolúciós kísérlet során.

A mutátor fenotípus megjelenését és gyors elterjedését leírták már mind laboratóriumi evolúciós kísérletekben¹⁹⁴, mind klinikai izolátumok esetében¹⁹⁵. Ennek hátterében valószínűleg az áll, hogy a gyakran több nagyságrenddel megemelkedett mutációs ráta lehetővé teszi a gyorsabb adaptációt olyan erős szelekciós nyomással szemben, mint például amit bizonyos antibiotikumok okoznak^{196,197}. A mutációs ráta növekedését többnyire a DNS hibajavítási mechanizmusokat károsító mutációk okozzák^{194,195}. Ezekkel a megfigyelésekkel összhangban 2 adaptált vonalunk (AMP6 és CPR6) is kiugróan nagyszámú mutációt hordozott magában (**10. ábra, bal oldali panel**). A két vonalban azonosítani tudtuk azokat a mutációkat, melyek feltehetően a mutációs ráta növekedéséhez vezettek. A ciprofloxacinnal (CPR) szemben adaptáltatott CPR6-os vonal összesen 55 mutációt hordozott, melyek között szerepelt a hibás bázispárosodás javításáért felelős MutL DNS mismatch repair fehérjét kódoló génben egy kereteltolódást okozó (frameshift) mutáció (Val303fs)¹⁹⁸. Az ampicillinnel (AMP) szemben adaptáltatott AMP6-os vonal még számottevőbb, összesen 136 mutációval rendelkezett, melyek egyike a *dnaQ* gént érintette és okozott aminosav szubsztitúciót (Ile9Ser). A *dnaQ* gén az általános DNS polimeráz enzim (Pol III) hibafelismerésért felelős ϵ alegységét kódolja¹⁹⁹. A két vonal mutációs rátájában bekövetkező változást Luria–Delbrück féle fluktuációs teszttel igazolta kollégám, Dr. Méhi Orsolya (**10. ábra, jobb oldali panel**). A mutátor fenotípus következtében ezek a vonalak számos olyan mutációt halmaztak fel, melyek az antibiotikum szelekciós nyomástól függetlenül voltak jelen a két vonalban, ezért ezeket a vonalakat minden későbbi elemzésből kizártuk.



11. ábra. A deléciók hossza általában 100 bázispár (bp) alatt maradt, azonban 19 esetben a 100 bázispárt (bp) meghaladta, s akár 61 génre is kiterjedt.

A további 61 adaptált vonalban összesen 402 független mutációs eseményt azonosítottunk (**5.-7. függelék**). A mutációk között egyaránt voltak pontmutációk, inzerciók, valamint kis és nagy genomi átrendeződések. Átlagosan vonalanként 4,2 pontmutációt, 1,2 deléciót, 0,26 inzerciót és 0,07 duplikációt azonosítottunk. A deléciók

általában rövidek voltak (1-100 bázispár között), azonban 19 esetben a deléció 0,3-58 kilobázis hosszú szakaszra nyúlt, ezzel eltávolítva 1-61 gént (**11. ábra**). Az IS-elem alapú genomi átrendeződések (inverziók, transzpozíciók és duplikációk) az adaptált vonalak 59%-ában voltak jelen.

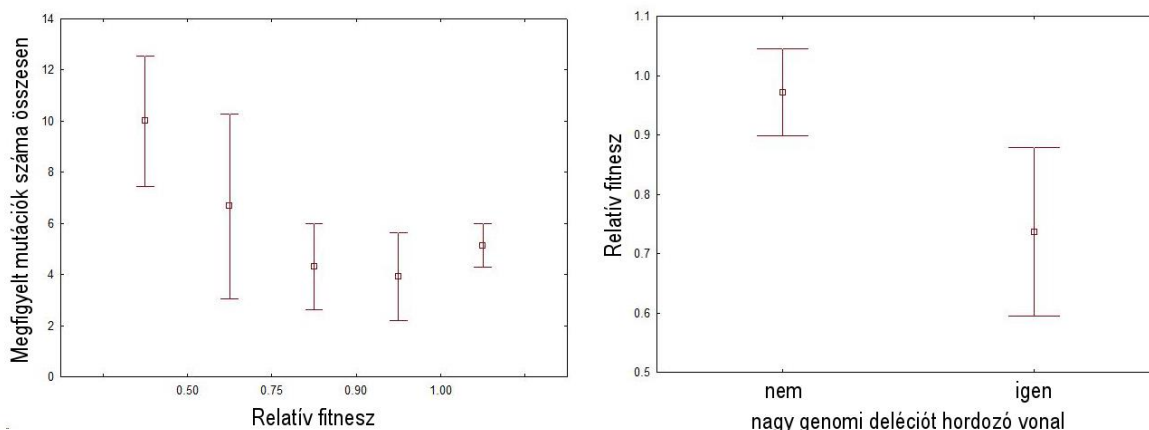
3. táblázat. *A laboratóriumi evolúció végpontjában azonosított mutációk átfedése a klinikumból és környezeti mintákból izolált rezisztens törzsekben talált genomi mutációkkal.*

Gén	Mutáció (aminosav szubsztitúció)	Adaptált vonal, melyben a mutáció megtalálható volt	Antibiotikum, mellyel szemben a környezetből/klinikumból izolált mutáció rezisztenciát okozott
folA	Ile94Leu	TRM2	TRM ²⁰⁰
fusA	Pro659Gln	KAN8, TOB3	KAN ²⁰¹
gyrA	Ser83Leu	CPR3, NAL8	CPR ^{202–205} , NAL ²⁰² , enrofloxacin ²⁰⁶
gyrA	Asp87Gly	CPR9, NAL1, NAL8	kinolonok ^{203,207} , béta-laktámok ²⁰⁷
gyrA	Asp87Asn	NAL7	CPR ^{203,204} , enrofloxacin ²⁰⁶
gyrA	Asp87Tyr	NAL3, NAL6	CPR ^{204,205}
marR	Ala70Thr	TET8	TET ²⁰⁸ , CHL ²⁰⁸
nfsB	Arg107His	NIT4	NIT ^{41,209}
nfsB	Gln44Arg	NIT8	NIT ⁴¹
rob	Arg156His	FOX8	spectinomycin ²¹⁰ , cefotaxime ²¹⁰
rpoB	His526Tyr	NIT5	rifampicin ^{211,212} , rifampin ²¹³

Számos bizonyíték utal arra, hogy a fehérje kódoló régiókban azonosított mutációk megjelenését az antibiotikum által okozott szelekciós nyomás vezette. Egyrészt a pontmutációk 87%-a nem csendes (szinoním) mutáció volt, azaz a kódolt aminosav megváltozásához vezetett. Másrészt pedig az adaptált vonalakban azonosítottunk számos olyan mutációt, mely nem csupán a gén szintjén, hanem a mutáció által okozott aminosav szubsztitúció szintjén is megegyezett az irodalomban leírt környezeti vagy klinikai rezisztens izolátumokban azonosított rezisztencia mutációkkal (**3. táblázat**). Ez utóbbi azért is rendkívül fontos, hiszen bemutatja, hogy a klinikumban előforduló genomi rezisztencia mutációk egy része előrejelezhető egyszerű laboratóriumi evolúciós kísérletek segítségével.

A korábbi kutatások eredményeivel összhangban az antibiotikum rezisztencia kialakulásának a laboratóriumi evolúciós kísérletünk során is mérhető fitness költsége volt: az adaptált vonalak mintegy 41%-a szignifikáns fitness csökkenést mutatott antibiotikum-mentes tápoldatban a kiindulási törzshöz viszonyítva. Az egyes vonalak fitnessét egy optikai sűrűség (OD600) értéken alapuló méréssel becsültük meg, majd az adaptált vonalak eredményeit a kiindulási törzsszel összevetve kaptuk meg a relatív fitness értékeket. A különösen alacsony fitnessszel rendelkező vonalak kiugróan nagy számú

mutációt hordoztak magukban (**12. ábra, bal oldali panel**, N=61, Kruskal Wallis teszt $P < 10^{-4}$), valamint gyakran hordoztak nagyobb genomi deléciókat (**12. ábra, jobb oldali panel**, N=61, T-próba $P = 0,0014$). A mutációk kiugróan magas száma és a nagyméretű genomi deléciók jelenléte gyakran azonos vonalakban volt megfigyelhető. Ez alapján feltételezhetjük, hogy bizonyos antibiotikumokhoz nagyobb kihívás alkalmazkodni és csak összetettebb rezisztencia mechanizmusok által lehetséges magas rezisztenciát elérni, s ez, mint eredményeink mutatják, nagyobb mértékű fitness költséghez vezet.

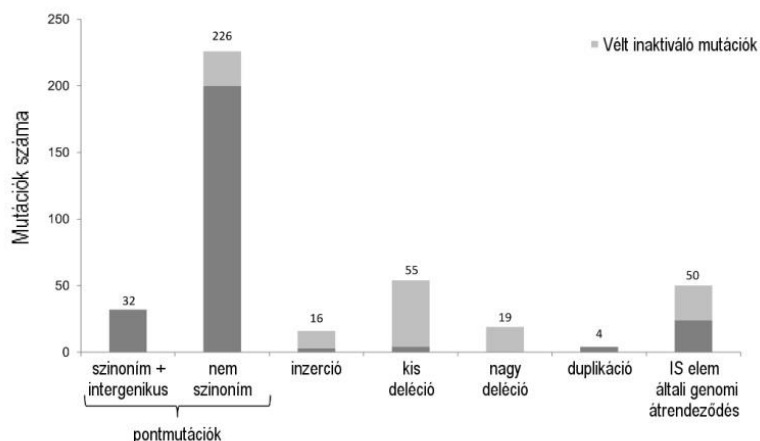


12. ábra. Az egyes adaptált vonalak által hordozott mutációk számának (bal oldali panel) és minőségének (jobb oldali panel) összefüggése a fitness költséggel (relatív fitnessben meghatározva). A hibasávok a 95%-os konfidencia intervallumot jelölik.

V.3. A funkcióvesztéses mutációk rendkívül elterjedtek

A megfigyelt pontmutációk, valamint kis (1-100 bázispár közötti) deléciók és inzerciók több, mint 27%-a korai stop kodont, a leolvasási keret eltolódását (frameshift), vagy a start kodon sérülését eredményezte (**13. ábra**). Ezek a mutációk valószínűsíthetően rosszul működő vagy inaktív fehérjék képződéséhez vezetnek. Ez az arány szignifikánsan magasabb, mint amit egy korábbi nagyszabású evolúciós kísérletben leírtak²⁰⁰, ahol az evolúció során magas hőmérséklettel szemben adaptáltatták a kólibaktériumot (90 funkcióvesztéses mutáció az összesen 329 mutációból (27%) szemben a 145 funkcióvesztéses mutációval az összesen 1030 mutációból (14%), Fisher-egzakt teszt, $P = 1,017 \times 10^{-7}$). Ráadásul az értelmetlen (nonszensz) mutációk gyakorisága a pontmutációk között háromszor akkora volt, mint amit a spontán mutációs ráta alapján egy mutáció akkumulációs kísérletet követően teljes-genom szekvenálással korábban

megállapítottak²⁰¹ (26 funkcióvesztés az összesen 258 mutációból szemben a 8 funkcióvesztéses mutációval az összesen 233 mutációból, Fisher-egzakt teszt, $P < 0,005$). Ez az eredmény arra enged következtetni, hogy adaptált vonalainkban a funkcióvesztéses mutációkkal szemben pozitív szelekció működött.



13. ábra. Az adaptált vonalakban azonosított mutációk típusok szerinti eloszlása, valamint a feltehetően funkcióvesztéses mutációk aránya az egyes típusok között.

Tovább vizsgálva a funkcióvesztéses mutációk szerepét az antibiotikum rezisztencia kialakulásában adatainkat egy korábban, Girgis és mtsai által publikált kemogenomikai adatsorral¹⁸⁰ vetettük össze. A kemogenomika egy olyan tudományág, amely rendszerszinten tanulmányozza egy biológiai célpont (például egy sejt vagy egy sejtfunció) egy adott kismolekulás könyvtár tagjaival szemben adott válaszát a genom és/vagy a proteom szintjén²⁰². A fent említett kemogenomikai adatsor, melyet Girgis és munkatársai publikáltak, 17 jól ismert antibiotikum hatását vizsgálta egy transzpozon-mutagenizált kólibaktérium könyvtárra. Girgis és mtsai a baktérium könyvtár minden egyes tagjában egy-egy génben hoztak létre funkcióvesztéses mutációt a transzpozon-mutagenézis által. Ily módon lehetővé vált, hogy tanulmányozzák az egyes gének funkcióvesztésének hatását a 17 antibiotikum mindegyikével szemben mutatott érzékenységre. A Girgis és mtsai által használt 17 antibiotikumból 9 egyezett meg az általunk használt antibiotikumokkal. A 9 megegyező antibiotikumra rendelkezésre álló adatok alapján saját eredményeinket a Girgis adatsorral összevetve kiderült, hogy a laboratóriumi evolúciónk végén azonosított, feltehetően funkcióvesztéssel járó mutációt hordozó gének inaktivációja általában a kemogenomikai vizsgálatban is növeli az antibiotikumokkal szembeni rezisztenciát (**4. táblázat**). Sok esetben a funkcióvesztéses mutációk nagyszámú antibiotikummal szemben biztosítottak rezisztenciát, mint például azok, melyek az antibiotikum-stressz válasz transzkripció represszorainak (például *acrR*, *marR*, *mprA*) egyikét érintették. Ezen mutációk rendszerint önmagukban is multidrog rezisztenciához vezettek.

4. táblázat. Az azonosított funkcióvesztéses mutációt hordozó gének összevetése *Girgis* és *mtsai* kemogenomikai adatsorával a két vizsgálatban átfedő 9 antibiotikum eredményeit összesítve. Az összevetés alapján az általunk azonosított, funkcióvesztéses mutációt hordozó gének között szignifikánsan feldúsultak azok a gének, melyek deléciója a *Girgis* kemogenomikai adatsor szerint rezisztenciát okoz (Fischer-egzakt teszt, $P < 10^{-5}$).

	A kemogenomika alapján deléciója rezisztenciát okoz	Összesen
Funkcióvesztéses mutációt hordozó gének	14	43
Vizsgált gének a kemogenomikában	321	3933

V.4. A párhuzamos evolúció bizonyítékai

A párhuzamos evolúció markánsan megjelenik a mutációt hordozó aminosavak, gének és funkcionális egységek szintjén egyaránt. Az összes azonosított pontmutáció 8%-a volt megtalálható legalább két párhuzamos adaptált vonalban. Kiemelkedő példája a molekuláris szintű párhuzamos evolúciónak az *acrB* gént érintő aminosav szubsztitúció (Val127Gly), mely 4 adaptált vonalban jelent meg, összesen 3 különböző antibiotikummal (CHL, AMP, FOX) szemben. Az *acrB* az AcrAB/TolC multidrog efflux pumpa belső membrán transzporter alegységét kódolja, mely a szubsztrát felismerésben és az energia transzdukcióban játszik kulcs szerepet²⁰³. Nem meglepő tehát, hogy az *acrB* mutációja rendszerint multidrog rezisztenciához vezet. Az *acrB* gént érintő mutációkat tovább vizsgálva azt láthatjuk, hogy a gének szintjén még elterjedtebb a párhuzamos evolúció: az *acrB* gén mutációja összesen 16 adaptált vonalban jelent meg valamilyen formában, összesen 6 különböző antibiotikummal (AMP, CHL, ERY, FOX, TET, TRM) szemben. A 16 vonalból 2 vonalban 2-2 mutációt is tartalmazott az *acrB* gén.

Széleskörű párhuzamos evolúció volt megfigyelhető a deléciós mutációs eseményekben is. A kis delécióknak (1-100 bázispárt érintenek) összesen 2%-a, azonban a nagy delécióknak (0.3-58 kilóbázispárt érintenek) már 75%-a azonos vagy közel azonos pozícióban volt jelen legalább két párhuzamos adaptált vonalban. Ezeket a nagy deléciókat többnyire IS-elemek határolják mindkét oldalról, így ezen szakaszok delécióját valószínűleg az IS-elemek közötti rekombinációs események hozták létre. Például az aminoglikozid antibiotikumokkal (KAN, TOB) szemben adaptáltatott 10 megszekvenált vonalból 9 hordozott részben átfedő nagy deléciót. Ezen deléciók ugyanabból az *insE* IS3 elem melletti pozícióból indulnak ki, azonban terjedelmük 4219-30712 bázispár között változik, ezzel részben vagy teljesen deletálva 4-29 gént (**14. ábra**). A delécióban szereplő géneket vizsgálva azt találtuk, hogy a 9-ből 8 esetben elveszett az *sbmA* transzportert

Az első meghatározó mintázat, hogy mindössze a laboratóriumi adaptált vonalak 49%-a hordozott mutációt az adott antibiotikum által célzott alrendszerben. A célgén mutációjának hiánya a vonalak több mint felében számos okra visszavezethető: egyrészt a hiány utalhat az adott célgén rezisztencia mutációjának rendkívül magas fitness költségre, vagy a megfelelő mutációk megjelenésének ritkaságára, vagy akár egy alternatív rezisztencia mechanizmus (pl.: efflux pumpa) rendkívüli hatékonyságára. További érdekesség, hogy olyan rezisztencia mutációk, melyek az antibiotikum enzimátikus módosításához vezetnek kizárólag a nitrofurantoinhoz (NIT) adaptált vonalakban jelentek meg széleskörben.

5. táblázat. Mutációt hordozó funkcionális egységek és azok mutációinak eloszlása az egyes antibiotikumokkal szemben adaptáltatott vonalak között. A számok a független mutációs események számát jelölik, melyek az adott antibiotikummal szemben adaptáltatott párhuzamos vonalakban az adott funkcionális egységben

Funkcionális kategória	Sejtfal szintézis gátlók		Giráz gátlók		Sokréttű	50s riboszóma alegység gátlók		30s riboszóma alegység gátlók		Folsav bioszintézis gátlók	Aminoglikozidok	
	AMP	FOX	CPR	NAL	NIT	CHL	ERY	DOX	TET	TRM	TOB	KAN
Az antibiotikum célpontjának módosítása	1	4	7	14	0	0	0	2	0	5	14	10
Az antibiotikum enzimátikus módosítása	1	0	0	0	8	0	0	0	0	0	0	0
Efflux pumpa működés	6	10	6	9	9	16	5	7	7	4	1	3
Sejtmembrán permeabilitás	6	12	6	0	13	1	3	0	1	3	6	4
A respiráció és/vagy a membránpotenciál módosítása	2	1	0	1	3	0	1	1	0	0	32	15
Membrán-stressz elleni védelem	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1
DNS-stressz elleni védelem	0	1	1	2	0	0	0	0	0	1	0	0
Éhezési-stressz elleni védelem	0	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Oxidatív stressz elleni védelem	0	0	3	1	2	0	2	0	0	2	7	3
Profág aktiváció	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1
Transzkripció	1	1	3	1	1	1	3	0	1	1	3	5
Sejt metabolizmus	3	2	3	3	5	1	0	1	1	0	2	6

Ezzel szemben a sejtmembrán permeabilitást befolyásoló, membrán transzportban, porin bioszintézisben, valamint a membrán permeabilitás szabályozásában résztvevő gének rendszeresen mutálódtak, különösen gyakran azokban a vonalakban, melyek a sejtfal szintézis gátlókkal (AMP, FOX) nitrofurantoinnal (NIT), illetve a kinolonokkal (CPR, NAL) szemben adaptálódtak. Még ennél is általánosabb elterjedés jellemezte az efflux pumpák működését befolyásoló mutációkat. Erős kontrasztként az aminoglikozid-adaptált vonalakban legsűrűbben a respirációt és a membránpotenciált módosító mutációk jelentek meg.

Harmadszor, a transzkripciós regulátor gének nagymértékben feldúsultak a mutációt hordozó gének között. Sokuk specifikus kétkomponensű jelátviteli rendszerhez tartozik, s

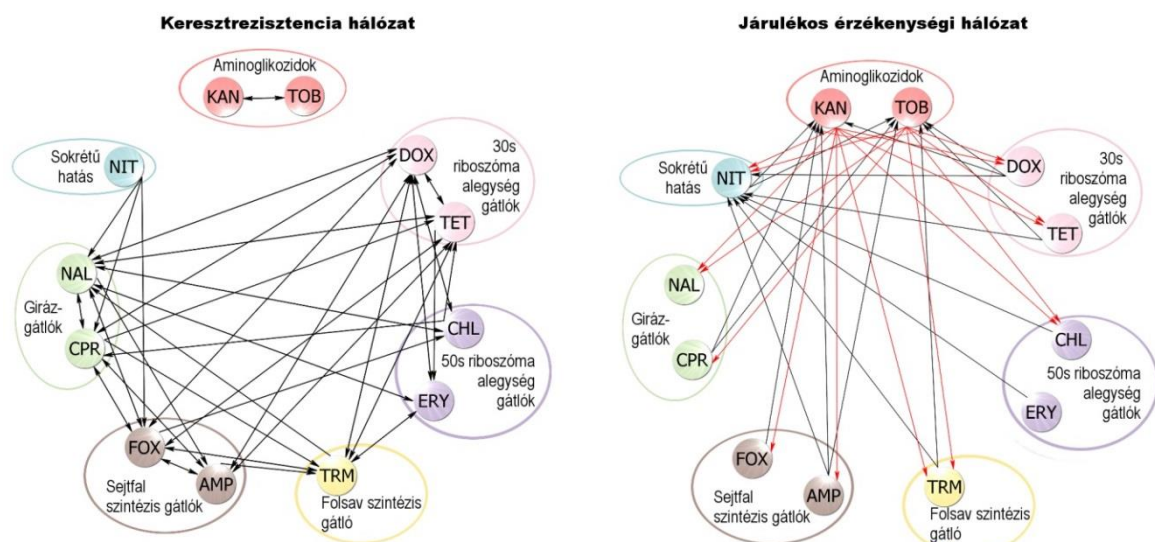
a sejt különböző stresszhatásokkal szembeni védekezési mechanizmusait szabályozza. Ilyen kétkomponensű rendszert érintő mutációk például az ozmotikus stresszre (OmpR/EnvZ, AcrR), acidikus stresszre (PhoQ), nehézfém stresszre (ComR), membrán stresszre (CpxR), valamint az antibiotikum-stresszre és oxidatív stresszre (MarA/SoxS/Rob regulon) adott választ befolyásoló fehérjéket kódoló gének mutációi. A kétkomponensű rendszerek mellett alkalmanként globális transzkripció regulátorokat kódoló gének is hordoztak mutációt (RpoC, Crp, Fis), melyek szerepe az antibiotikum toleranciában már részben ismert²¹².

Negyedrész, az éhezési és oxidatív stressz válasz útvonalakat érintő mutációk több antibiotikummal szemben is megjelentek. Korábbi antibiotikum tolerancia témájú tanulmányokkal megegyezően^{213,214}, az aminosav éhezési válasz (stringent response) központi elemei (SpoT és SspA) is hordoztak alkalmanként mutációkat. Az antibiotikum szelekció hatására mutálódtak az oxidatív stressz választ szabályozó gének (SoxR és AhpF) is, melyek az antioxidáns hatású putrescin és spermidin molekulák termelését szabályozzák^{29,215}. A DNS károsító antibiotikum stresszre válaszul pedig bizonyos adaptált vonalak az SOS regulon tagjaiban (*dinB*, *yafO* és *yafP*), valamint kriptikus profágokban (CP4-44) hordoztak mutációt. A profágok által a gazda baktérium sejt számára biztosított megnövekedett túlélés antibiotikum-stresszhatás alatt valóban egy már leírt jelenség²¹⁶.

V.5. Az adaptált vonalak antibiotikum rezisztencia spektrumának nagy áteresztőképességű szűrése.

További vizsgálataink első lépéseként egy saját fejlesztésű, nagy áteresztőképességű protokoll segítségével lemértük mind a 120 laboratóriumi adaptált, antibiotikum rezisztens vonal érzékenységének változását azzal a 11 antibiotikummal szemben, melyekkel az evolúciós kísérlet során nem találkozott. A protokoll során az adott antibiotikum minimális gátló koncentrációjához (MIC) közeli koncentrációkon monitoroztuk a populációk növekedési képességét optikai sűrűség (OD) formájában. A módszer alkalmas volt az enyhe változásokat is hatékonyan kimutatni, valamint az antibiotikum-mentes kontrollok növekedésén alapuló szigorú statisztikai eljárás lehetővé tette a fitness költség járulékos érzékenységtől való elkülönítését. A protokoll megfelelő működését két kontroll kísérlettel is igazoltuk. Egyrészt, a protokollt a kezdeti fázisban a protokollal párhuzamosan végzett, agar lemezekén mért kolónia méretek alapján optimalizáltuk. Másrészt, a protokoll keresztrezisztenciára vonatkozó eredményeit standard E-teszt csíkokkal mért minimális gátló koncentráció (MIC) méréssel erősítettük meg, mely alapján a téves pozitív arányt 5%-nak, míg a téves negatív arányt 16%-nak találtuk.

Az azonos antibiotikummal szemben adaptáltatott 10-10 párhuzamos vonal nagyon hasonló mintázatot mutatott a többi 11 antibiotikummal szembeni érzékenység változásában. Ez lehetővé tette számunkra, hogy a 10-10 párhuzamos vonal eredményeit összegezve megalkossuk a 12 antibiotikum evolúciós kölcsönhatásainak hálózatát, azaz járulékos érzékenységének (collateral sensitivity) és keresztrezisztenciájának hálózatait, az egyes kölcsönhatások gyakoriságára alapozva (**15. ábra**).

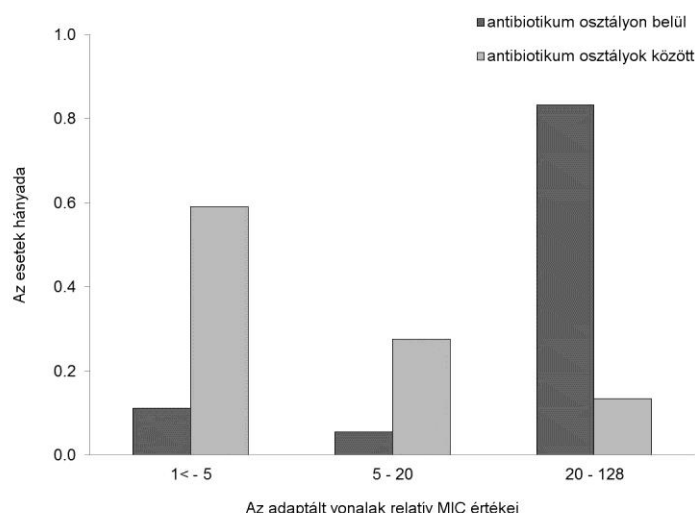


15. ábra. A 12 antibiotikum evolúciós kölcsönhatásainak hálózatai. A nyilak azon kölcsönhatásokat jelzik, melyeknél a nyíl kiindulási pontjában szereplő antibiotikummal szemben adaptáltatott 10 vonal legalább 50%-a keresztrezisztenciát (bal oldali panel) vagy járulékos érzékenységet (jobb oldali panel) mutatott a nyíl hegyénél szereplő antibiotikumra. A bal oldali panelen a kétirányú nyilak a szimmetrikus keresztrezisztencia kapcsolatokat jelzik. A jobb panelen a piros nyilak az aminoqlikozid-adaptált vonalak járulékos érzékenységét

V.6. Az egyetlen antibiotikummal történő kezelés is gyakran multidrog rezisztenciához vezet

A multidrog rezisztencia kialakulása még az antibiotikumok egyedi, monoterápiás alkalmazása mellett is gyakori volt: a vizsgált antibiotikum párok 52%-a mutatott legalább az egyik irányban keresztrezisztencia kölcsönhatást (**15. ábra, bal oldali panel**). A keresztrezisztencia mértéke azonban rendkívül változatosnak bizonyult, az enyhe 2-szeres minimális gátló koncentráció (MIC) növekedéstől az akár 128-szoros MIC növekedésig széles palettán mozgott (**16. ábra**). Az erős keresztrezisztencia kölcsönhatás nem

korlátozódott az azonos, vagy hasonló hatásmechanizmusú, azaz azonos osztályba tartozó antibiotikum párokra. A teljesen eltérő hatásmechanizmusú antibiotikum párok esetében is megjelentek kiugróan erős keresztrezisztencia kölcsönhatások, például a giráz gátló ciprofloxacinhoz (CPR) adaptáltatott populációk 48-68-szoros MIC növekedést mutattak a sejtfal szintézist gátló cefoxitinnal (FOX) szemben.

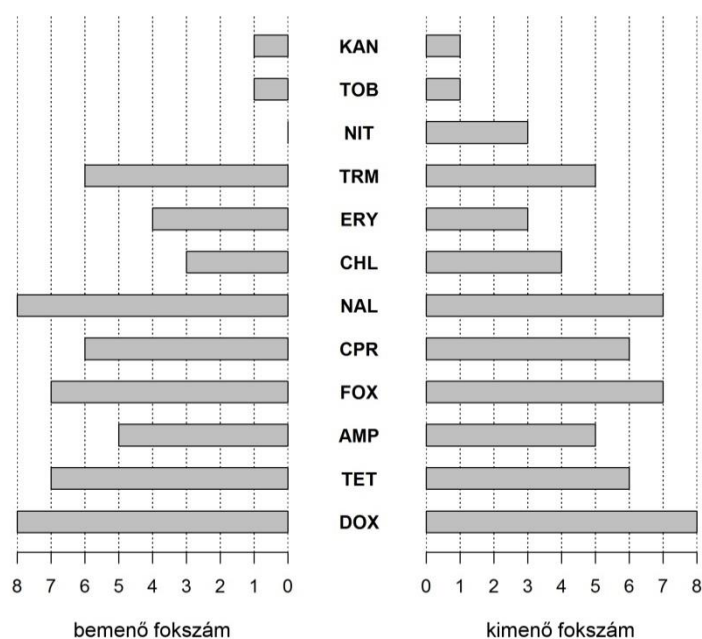


16. ábra. A keresztrezisztencia kölcsönhatások erősségének eloszlása az azonos és eltérő antibiotikum osztályokba tartozó antibiotikum párok esetében. A minimális gátló koncentráció (MIC) mérését E-teszttel végeztük.

A keresztrezisztencia kölcsönhatások erősségének változékonyságán túl jelentős különbségeket láttunk a keresztrezisztencia kölcsönhatások számában is. Míg bizonyos antibiotikumokhoz az adaptáció minden esetben nagymértékű multidrog rezisztenciához vezetett, például a doxiciklin (DOX) vagy a fluorokinolonok (CPR, NAL) esetében; más esetben, például az aminoglikozidoknál (KAN, TOB) kizárólag az aminoglikozid antibiotikumok között jelent meg keresztrezisztencia. Ahogy az várható volt, a későbbi teljes-genom szekvenálás előbbiekénél multidrog efflux pumpa mutációkat azonosított, míg az aminoglikozid-adaptált vonalak esetében egyedi, egyetlen másik antibiotikumra sem jellemző rezisztencia mutációkat mutatott ki, melyek részben az aminoglikozidok szokatlan sejtbe jutását tükrözik²¹⁷.

Jelentős különbségeket találtunk tehát abban, hogy egy adott antibiotikumhoz való adaptáció hány másik antibiotikummal szemben vezet keresztrezisztenciához (kimenő foksám a keresztrezisztencia hálózatban). Hasonlóan nagy különbségeket látunk azonban abban is, hogy hány másik antibiotikummal szembeni adaptáció vezet az adott

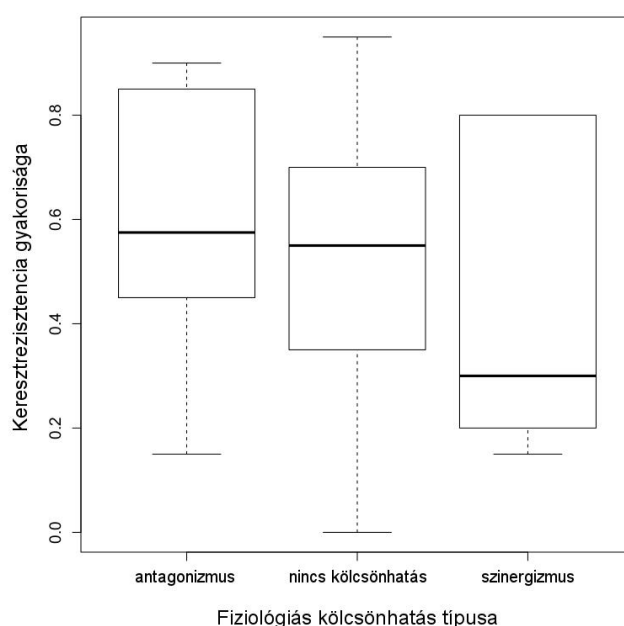
antibiotikummal szemben rezisztenciához (bemenő foksám a keresztrezisztencia hálózatban) (**17. ábra**). Ez utóbbi szempontból a doxiciklint (DOX) és a nitrofurantoint (NIT) összehasonlítva azt láthatjuk, hogy míg doxiciklin (DOX) rezisztenciához számos más antibiotikumhoz való adaptáció vezet, addig a több sejtfunkciót egyidejűleg támadó nitrofurantoinnal (NIT) szemben az összes más antibiotikumhoz adaptált vonal mindössze 3%-a mutat keresztrezisztenciát. Mindeközben a nitrofurantoinhoz (NIT) való adaptáció több antibiotikummal szemben is keresztrezisztenciához vezet. A nitrofurantoin (NIT) által mutatott érdekes mintázat hátterének megértéséhez további vizsgálatok szükségesek.



17. ábra. A keresztrezisztencia kölcsönhatások hálózatában szereplő 12 antibiotikum bemenő és kimenő fokszáma.

A keresztrezisztencia gyakorisága, erőssége és gyors megjelenése megkérdőjelezhetővé teszi az antibiotikumok kombinációban történő alkalmazását. Bár a kombinációs terápia egyik fő célja a rezisztencia kialakulásának elkerülése lenne¹⁹, eddig a legfőbb kutatások az antibiotikum párok közötti fiziológiás kölcsönhatásokra fókuszáltak. A sikeres kombinációs kezelésnek azonban két kulcsfontosságú szempontja is van. Egyrészt a két antibiotikum között kialakuló fiziológiás kölcsönhatás rendkívül fontos, hiszen két antibiotikum erősítheti (szinergizmus), de éppen gyengítheti (antagonizmus) is egymás hatását, azaz a kombinált hatásuk nagyobb vagy alacsonyabb lehet, mint ha a két antibiotikum egyedi hatását összeadnánk²¹⁸. Ugyanilyen fontos szempont azonban az is, hogy mennyire állnak rendelkezésre olyan mutációk, melyek mindkét antibiotikummal szemben egyaránt rezisztenciát okoznak. Beláthatjuk, hogy mindkét aspektus ugyanolyan fontos, így megvizsgáltuk, hogy vajon a keresztrezisztencia hálózatunk és egy az

irodalomban rendelkezésre álló, nagy áteresztőképességű kombinációs mérésen alapuló fiziológiás kölcsönhatás hálózat²¹⁹ között látunk-e bármiféle összefüggést. Mivel az aminoglikozidok egyáltalán nem mutattak más antibiotikum osztályokkal keresztrezisztencia kapcsolatot, valamint kiugróan sok szinergisztikus kölcsönhatást mutattak, így valószínűleg torzították volna az eredményeinket, ezért ezeket kizártuk az elemzésből. Az aminoglikozidok eltávolítását követően sem a szinergisztikus, sem az antagonisztikus antibiotikum párok nem mutattak feldúsulást keresztrezisztencia kapcsolatokban ($P=0.35$, $N=45$, Kruskal-Wallis teszt) (**18. ábra**). Megállapíthatjuk tehát, hogy a fiziológiás és evolúciós kölcsönhatások hálózata kevés átfedést mutat egymással, így a kombinációs terápiák fejlesztése során mindkét tényezőt egyaránt vizsgálni kell.

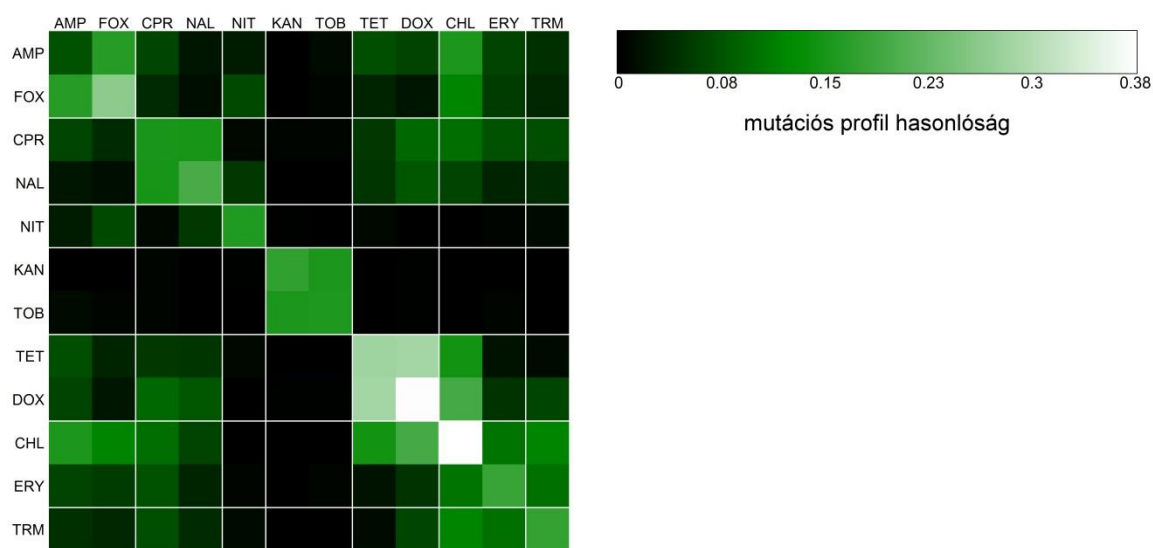


18. ábra. A keresztrezisztencia gyakorisága a fiziológiás kölcsönhatások függvényében.

V.7. A keresztrezisztencia kölcsönhatásokért részben a párhuzamos evolúció felel

Annak ellenére, hogy az általunk alkalmazott 12 antibiotikum az antibakteriális hatásmechanizmusok széles skáláját fedi le, az adaptációt követő teljes-genom szekvenálás során a párhuzamos evolúció számos példáját találtuk még távoli antibiotikum osztályok között is. Azt, hogy a párhuzamos evolúció széleskörű megjelenését az alkalmazott tápoldathoz történő adaptáció okozta, több okból is

kizárhatjuk: egyrészt a párhuzamosan megjelenő mutációk általában fitness költséggel rendelkeztek az adott tápoldatban antibiotikum-mentes környezetben; másrészt a párhuzamosan megjelenő mutációk jelentős része már jól ismert multidrog rezisztencia génekben jelent meg^{103,116,203,209,212}. Ezen okokból kifolyólag feltételeztük, hogy ezek a széles körben elterjedt mutációk jelentősen hozzájárulhatnak a keresztrezisztencia kapcsolatok kialakulásához. Ennek a feltételezésnek a megalapozottságát vizsgálva először is kiszámoltuk minden antibiotikum párra az átfedő mutációk átlagos hányadát az adott antibiotikummal szemben adaptáltatott 5-5 párhuzamos vonalban, s ezáltal meghatároztuk az egyes antibiotikum párok mutációs profil hasonlóságát (**19. ábra**).

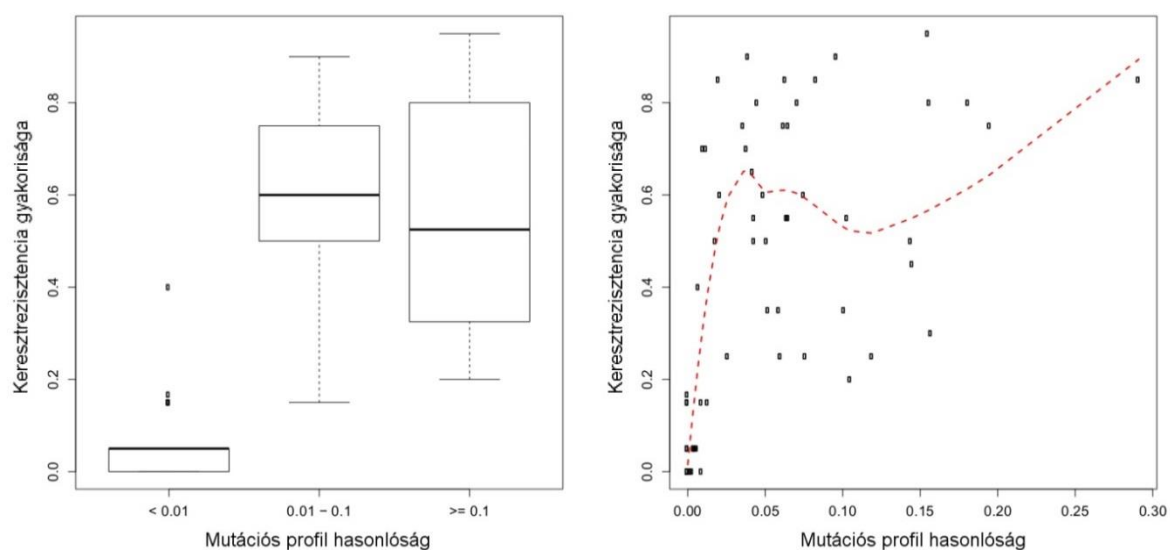


19. ábra. A 12 antibiotikum mutációs profil hasonlósága az antibiotikumonként 5-5 adaptált párhuzamos vonal teljes-genom szekvenálása alapján. A mutációs profil hasonlóságát az egyes adaptált törzsek között a Jaccard-együtthatóval határoztuk meg.

A mutációs profil hasonlósága még az azonos antibiotikummal szemben adaptált párhuzamos vonalak között is igen változatos képet mutatott. Ez alapján megállapíthatjuk, hogy bizonyos antibiotikumokkal szemben a lehetséges rezisztencia mechanizmusok széles tárháza állt rendelkezésre. Így például a nitrofurantoin-adaptált vonalakban az átlagos átfedés 16.5% volt a párhuzamos vonalak mutációs profiljában. Más antibiotikumokkal szemben azonban sokkal korlátozottabb evolúciós lehetőségek álltak a kólibaktérium rendelkezésére, így például a klóramfenikollal szemben is, hiszen a mutációs profil hasonlósága átlagosan 38% volt a klóramfenikol-adaptált vonalak esetében.

A mutációs profil hasonlóságának a keresztrezisztencia gyakoriságával mutatott összefüggését vizsgálva azt találtuk, hogy azok az antibiotikum párok, melyeknél a mutációs profil kevésbé volt hasonló, nagyon ritkán mutattak egymással

keresztrezisztencia kölcsönhatást (**20. ábra**; Wilcoxon-féle előjeles rang próba $N=66$, $P<10^{-10}$ amennyiben a 0,01-nél kisebb mutációs profil hasonlósággal rendelkező antibiotikum párokat vetjük össze az összes többi párral). Ez a mintázat nagymértékben, de nem kizárólag az aminoglikozid-adaptált vonalaknak köszönhető, melyek mutációs profilja szinte egyáltalán nem fed át egyik más antibiotikummal szemben adaptáltatott vonallal sem, miközben keresztrezisztencia kapcsolataik is csak az osztályon belül léteznek. Ennek ellenére az aminoglikozid-adaptált vonalakat a tesztből kizárva is szignifikáns összefüggést találtunk a kevésbé átfedő mutációs profil és a keresztrezisztencia hiánya között (Wilcoxon-féle előjeles rang próba $N=45$, $P < 0.005$).



20. ábra. A mutációs profil hasonlósága összefüggést mutat a keresztrezisztencia gyakoriságával.

A párhuzamos evolúció és a keresztrezisztencia kapcsolatát tovább vizsgálva 9 olyan mutációt választottunk ki további vizsgálatra, melyek egy vagy több adaptált vonalban megjelentek az antibiotikum adaptáció során (**6. táblázat**). A 9 kiválasztott mutáció 7 olyan gén egyikét érintette, melyek számos párhuzamos vonalban hordoztak mutációt, s akár több, teljesen eltérő hatásmechanizmusú antibiotikummal szemben adaptálódtak. Emellett a 7 gén változatos molekuláris funkciókat fedett le. A kiválasztott mutációkat a kiindulási törzsbe külön-külön visszaillesztve megvizsgáltuk az egyes mutációk által önmagukban okozott rezisztenciát a 12 antibiotikum mindegyikével szemben. A mutációk általában enyhe, de határozott rezisztenciát okoztak több antibiotikummal szemben is. A visszavitt mutációk között szerepelt például a *phoQ* gén Gly384Cys aminosav szubsztitúciója, mely gén egy kétkomponensű szabályozó rendszer tagja és a sav stresszel, valamint az alacsony Mg^{2+} ion koncentrációval szembeni toleranciáért felel. Bár a *phoQ* gén mutációi trimetoprim (TRM)- és nitrofurantoin (NIT)-adaptált vonalakban jelentek meg, mutációja a legtöbb vizsgált antibiotikummal szemben legalább enyhe rezisztenciát

okozott, s kifejezetten erős rezisztenciához vezetett a folsav szintézist gátló trimetoprim mellett a sejtfal szintézis gátló (AMP, FOX) antibiotikumokkal szemben is. A nagymértékű keresztrezisztencia mellett a 9 vizsgált mutációból 6 járt szignifikáns fitnessz költséggel antibiotikum-mentes környezetben²²⁰. További költséget jelentett az összes vizsgált rezisztencia mutáció számára, hogy több antibiotikummal szemben is járulékos érzékenységhez vezettek. A *trkH* gént érintő Thr350Lys aminosav szubsztitúciót vizsgálva például azt találtuk, hogy ez a mutáció drasztikus fitnessz költséggel jár antibiotikum-mentes környezetben, miközben az aminoglikozidokon kívül (melyekkel szemben a *trkH* gén mutációi megjelentek) minden más vizsgált antibiotikummal szemben nagymértékű járulékos érzékenységhez vezet. A *trkH* gén Thr350Lys mutációja tehát egy rendkívül költséges módja az aminoglikozid rezisztencia elérésének, mely jelentősen csökkenti a baktérium fitnesszét számos más, aminoglikozid-mentes környezetben. A részletesebben vizsgált 9 egyedi mutáció keresztrezisztencia profilja szignifikánsan hasonlít az ezeket a mutációkat hordozó adaptált vonalaknak a keresztrezisztencia profiljára (62%-os átfedést találtunk szemben a véletlen alapján várt 45%-os átfedéssel, randomizációs teszt N = 144, P = 0.002). Megállapíthatjuk tehát, hogy ezek a mutációk jelentősen hozzájárulnak az adaptált vonalakkal megfigyelhető keresztrezisztencia kölcsönhatások kialakulásához.

6. táblázat. A 9 egyedi mutáció fitnessz költsége, valamint keresztrezisztencia és járulékos érzékenység hálózata.

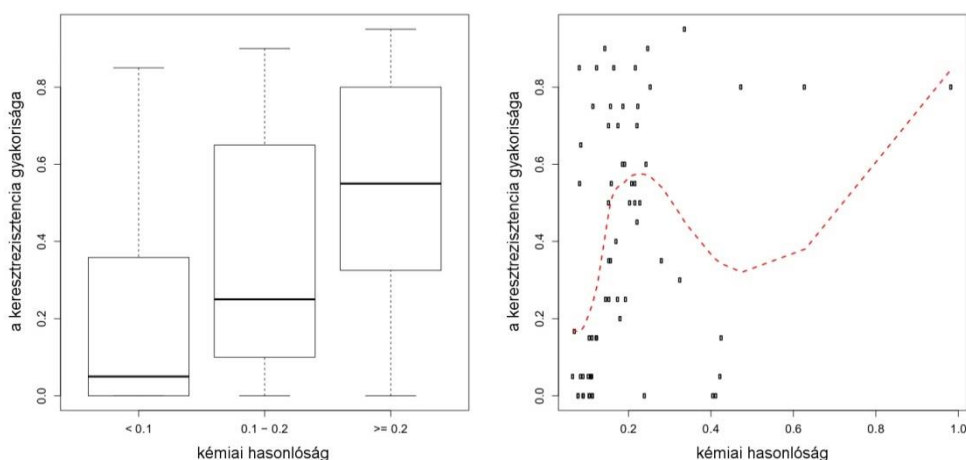
gén	aminosav csere	relatív fitnessz antibiotikum hiányában ± standard error	relatív MIC változás												antibiotikumok, melyekkel szemben az adaptáció során mutáció jelent meg az adott génben
			sejtfal szintézis gátlók		giráz gátlók		sokrévét	50s riboszóma alegység gátlók		30s riboszóma alegység gátlók		folsav bioszintézis gátlók	aminoglikozidok		
			AMP	FOX	CPR	NAL		NIT	CHL	ERY	DOX		TET	TRM	
<i>mprA</i>	Arg110Leu	0.99 ± 0.016	1.0	1.0	0.8	3.1	1.4	1.0	1.5	0.9	1.0	1.0	0.8	0.9	NIT, NAL
<i>marR</i>	Val84Glu	0.95 ± 0.008*	2.0	3.3	1.9	2.1	1.0	2.2	2.0	1.9	1.8	1.3	1.0	1.0	AMP, CHL, CPR, DOX, NAL, TET
<i>envZ</i>	Ala396Thr	0.90 ± 0.007*	1.7	2.7	2.2	1.0	0.9	1.0	1.2	0.8	1.3	0.8	0.7	0.6	AMP, CPR, ERY, FOX, NIT, TET
<i>envZ</i>	Val241Gly	0.87 ± 0.030*	2.6	2.7	2.6	0.8	1.0	1.5	1.6	0.5	1.0	0.8	0.7	0.6	AMP, CPR, ERY, FOX, NIT, TET
<i>soxR</i>	Leu139*	0.72 ± 0.023*	1.2	1.0	1.3	2.2	0.6	1.1	4.7	0.6	1.1	1.8	1.9	3.6	CPR, ERY, NAL, TRM
<i>phoQ</i>	Gly384Cys	0.94 ± 0.032*	2.0	1.7	1.3	0.7	1.0	1.1	1.4	1.0	1.3	2.3	1.4	1.4	NIT, TRM
<i>trkH</i>	Thr350Lys	0.57 ± 0.011*	0.5	0.8	0.6	0.3	0.8	0.6	0.9	0.5	0.5	0.6	3.4	2.1	KAN, TOB
<i>gyrA</i>	Ser83Leu	1.02 ± 0.025	1.0	1.0	7.7	30.1	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	CPR, NAL
<i>gyrA</i>	Asp87Gly	1.04 ± 0.006	1.8	1.3	7.7	30.1	0.9	1.0	1.0	0.8	1.0	1.0	1.4	1.9	CPR, NAL

* szignifikáns fitnessz különbség (p<0.05, N=14, t-teszt)

V.8. Az antibiotikumok sajátosságainak hatása a keresztrezisztencia kölcsönhatások kialakulására

Azzal a céllal, hogy kiderítsük hogy az egyedi antibiotikum tulajdonságok hasonlósága mennyiben járul hozzá a keresztrezisztencia kapcsolatokhoz, összeállítottunk egy adatsort

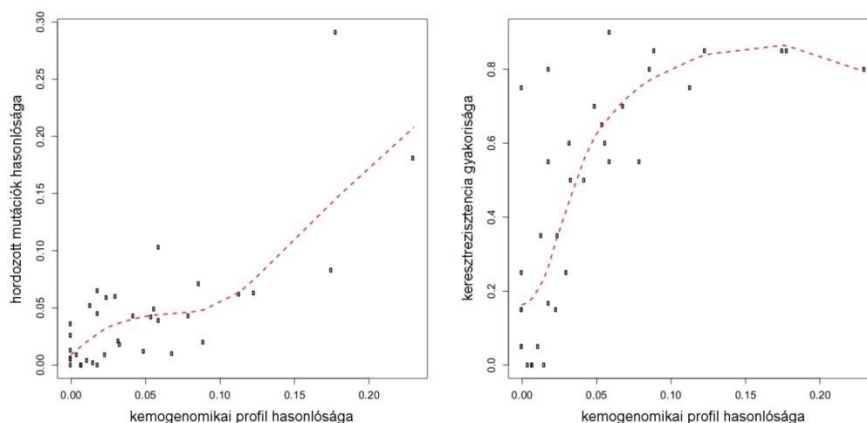
a 12 alkalmazott antibiotikum kémiai és funkcionális jellemzőiről, majd megvizsgáltuk a kémia struktúra és a hatásmechanizmus összefüggését a kialakult keresztrezisztencia kölcsönhatásokkal. Egyszerű választ adna a keresztrezisztencia kialakulásának okára az, ha a keresztrezisztencia főleg azon antibiotikumok között jelenne meg, melyek ugyanazt a sejtbeli alrendszert támadják. Ezzel szemben az adaptált vonalak több, mint fele nem tartalmazott a célgénben mutációt, így a keresztrezisztencia széleskörű elterjedéséért eleve nem felelhetnek kizárólag az azonos célgénben bekövetkezett mutációk. Ráadásul a keresztrezisztencia kölcsönhatások 88%-a olyan antibiotikumok között jelent meg, melyek eltérő sejtbeli célponttal rendelkeznek. Ezen előzetes ismereteinkkel összhangban, a kémiai struktúra hasonlósága (Tanimoto-hasonlóság, mely az egyes szerkezeti motívumok megléte vagy hiánya alapján készít kémiai ujjlenyomatot minden egyes antibiotikumról, majd ezeket az ujjlenyomatokat veti össze²²¹) csak minimális összefüggést mutatott a keresztrezisztencia kölcsönhatások megjelenésével (**21. ábra**; Spearman $r = 0,4$, $P < 10^{-3}$, $N = 66$). Ráadásul ez az elhanyagolható hatás teljesen megszűnik, ha kizárjuk az elemzésből az aminoglikozid-adaptált vonalakat (Spearman $r = 0,21$, $P = 0,17$, $N = 45$). Nem meglepő, hogy az aminoglikozid-adaptált vonalak ilyen erősen befolyásolják az összefüggés mértékét, hiszen az aminoglikozidok kémiai hasonlósága a többi 10 antibiotikummal minimális, miközben kizárólag egymással mutatnak keresztrezisztencia kölcsönhatást.



21. ábra. A kémiai hasonlóság szinte egyáltalán nem mutat összefüggést a keresztrezisztencia gyakoriságával.

Ezt követően megvizsgáltuk azt is, az antibiotikumok hatásmechanizmusbeli hasonlósága hogyan befolyásolja a keresztrezisztencia kölcsönhatások megjelenését. Az antibiotikumok hatásmechanizmusának profilját közvetett módon, a kólibaktérium rezisztómja²²² alapján készítettük el. A kólibaktérium rezisztómját azok a gének alkotják, melyek befolyásolják a baktérium antibiotikum érzékenységét, így megfelelő pontossággal következtethetünk belőle az adott antibiotikum hatásmechanizmusára²²³. A kólibaktérium

rezisztómiájának megállapításához a már korábban ismertetett, Girgis és munkatársai által elkészített nagy áteresztőképességű kemogenomikai vizsgálat eredményeit¹⁸⁰ használtuk fel. Az adatsor felhasználásával készítettük el az egyes antibiotikumok egyedi kemogenomikai profilját, mely profil az összes olyan kóli gént tartalmazza, melyek az adott antibiotikummal szemben befolyásolják az érzékenységet. Korábban pedig már elkészítettük az egyes antibiotikumok mutációs profilját az adaptált vonalakban mutációt hordozó gének listája alapján. Antibiotikum páronként a hordozott mutációk hasonlóságát összevetve a kemogenomikai profil hasonlóságával azt találtuk, hogy azon antibiotikum párok, melyek jelentős átfedést mutattak a kemogenomikai profiljukban egymáshoz nagyon hasonló mutációkat is szereztek a laboratóriumi adaptáció során (**22. ábra, bal oldali panel**; Spearman $r = 0,67$, $P < 10^{-5}$, $N = 36$), és gyakran mutattak keresztrezisztencia kölcsönhatást is (**22. ábra, jobb oldali panel**; Spearman $r = 0,78$, $P < 10^{-7}$, $N = 36$). Fontos kiemelni, hogy ezek az eredmények megmaradtak akkor is, ha azon antibiotikum párokat kizárjuk az elemzésből, melyek azonos sejtbéli célponttal rendelkeznek (Spearman $r = 0,59$, $P < 10^{-3}$, $N = 33$; valamint Spearman $r = 0,73$, $P < 10^{-5}$, $N = 33$). Hasonlóan változatlan az eredmény, amennyiben az aminoglikozid-adaptált vonalakt hagyjuk ki az elemzésből (Spearman $r = 0,57$, $P < 0.005$, $N = 28$; valamint $r = 0,75$, $P < 10^{-5}$, $N = 28$). Megállapíthatjuk tehát, hogy bár a kémiai hasonlóság nem, a kemogenomikai profil hasonlóság jelentős mértékben befolyásolja, hogy az adott antibiotikum pár között kialakul-e keresztrezisztencia kölcsönhatás.

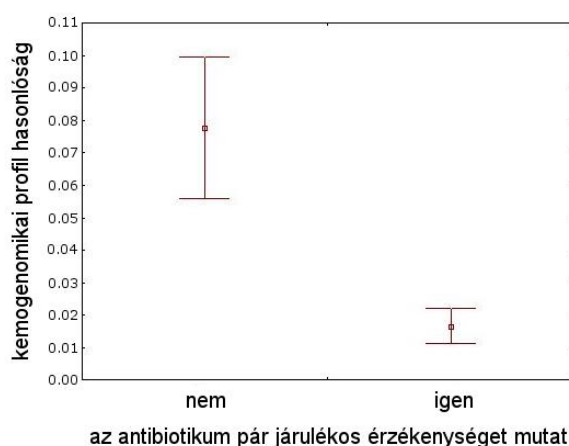


22. ábra. A hasonló kemogenomikai profillal rendelkező törzsek jelentős átfedést mutattak a laboratóriumi evolúció során szerzett mutációkban (bal oldali panel), valamint gyakran mutattak keresztrezisztencia kölcsönhatást (jobb oldali panel).

V.9. A multidrog rezisztens baktériumok Achilles-sarka, azaz a járulékos érzékenység

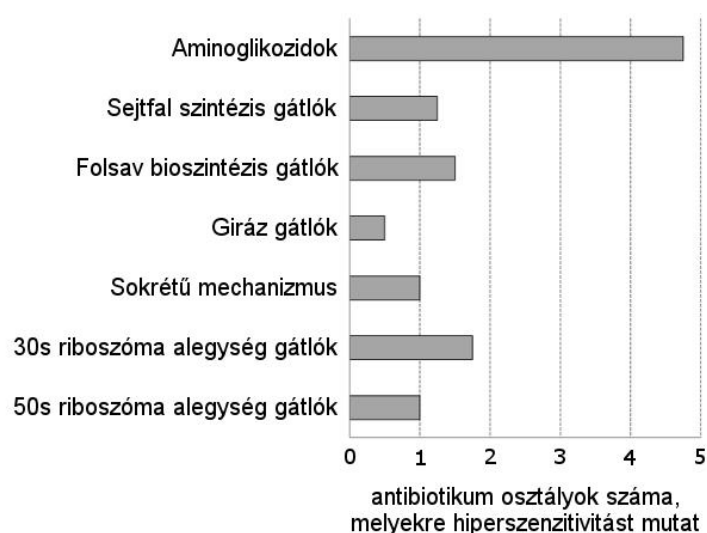
Az eddigi eredményeink tárgyalása során bebizonyítottuk, hogy akár egyetlen antibiotikumhoz adaptálódva is megjelenhet multidrog rezisztencia, hiszen az adaptáció számos keresztrezisztencia kölcsönhatáshoz vezet. Legalább ennyire fontos, vagy talán még izgalmasabb azonban az érme másik oldala. A keresztrezisztencia kialakulásával párhuzamosan ugyanis bizonyos más antibiotikumokkal szemben még érzékenyebbé, hiperérzékenyvé válhat az adaptálódó baktérium. Ezt a jelenséget nevezzük járulékos érzékenységgel (collateral sensitivity). A járulékos érzékenység kölcsönhatás meglepően gyakran bizonyult vizsgálatunkban, ahol az összes lehetséges antibiotikum pár 35%-a mutatott hiperérzékenységet legalább az egyik irányban (**15. ábra, jobb oldali panel**).

A járulékos érzékenység kölcsönhatás megjelenése nagyban függ az egyes antibiotikumok hatásmechanizmusától. Egyetlen esetben sem figyeltünk meg járulékos érzékenységet olyan antibiotikum párok között, melyek azonos hatásmechanizmussal rendelkeznek. A járulékos érzékenység kialakulása és az antibiotikum párok hatásmechanizmusbeli eltérése közötti összefüggésnek részletesebb elemzéséhez a keresztrezisztencia hátterének vizsgálatakor (a Girgis és munkatársai kemogenomikai szűrésének eredményei¹⁸⁰ alapján létrehozott) antibiotikumonkénti kemogenomikai profilt használtunk. Az egyes antibiotikumok kemogenomikai profilja azon gének készletét tartalmazza, melyek az adott antibiotikummal szemben befolyásolják a baktérium érzékenységét. A járulékos érzékenységi kölcsönhatások túlnyomó része olyan antibiotikum párok között jött létre, ahol a kemogenomikai profilban elhanyagolható volt az átfedés (N=120, Mann–Whitney U-test $P < 10^{-5}$) (**23. ábra**). A járulékos érzékenység tehát olyan antibiotikum párok között hajlamos megjelenni, melyeknek hatásmechanizmusa jelentős eltérést mutat.



23. ábra. A járulékos érzékenységet mutató antibiotikum párok kemogenomikai profiljai között elhanyagolható az átfedés.

Az antibiotikum osztályok közül az aminoglikozidok szembeötlően sok járulékos érzékenységi kölcsönhatást mutatnak, az összes járulékos érzékenységi kölcsönhatás 44%-ának egyik tagja aminoglikozid. Az aminoglikozid-adaptált vonalak szinte az összes többi vizsgált antibiotikummal szemben hiperérzékenynek bizonyultak, köztük a sejtfal szintézis gátlókkal és számos protein szintézis gátló antibiotikummal szemben is (**24. ábra**). A megfigyelt járulékos érzékenység általában 2-10-szeres minimális gátló koncentráció (MIC) csökkenést jelentett. Egy korábbi, a járulékos érzékenység (collateral sensitivity) fogalmát elsőként használó tanulmányban²¹ hasonló mértékű MIC változásról számoltak be. Ez a változás arányos a különböző multidrog efflux pumpa mutánsok esetében leírt, 2-8-szoros MIC növekedéssel²²⁴.



24. ábra. Az egyes antibiotikum osztályokkal szemben adaptáltatott vonalak hiperszenzitivitása a többi antibiotikum osztállyal szemben.

V.10. Többszintű mechanizmus az aminoglikozid rezisztencia hátterében

Az antibiotikum rezisztencia 3 legelterjedtebb mechanizmusa: 1) az antibiotikum inaktivációja az azt módosítani képes enzimek túltermelése által, 2) az antibiotikum célpontjának módosítása, 3) a membrán permeabilitás csökkentése, vagyis az antibiotikum membránon való átjutásának a nehezítése. Az antibiotikum membránon való átjutása igazi kuriózum az aminoglikozidok esetében a kismolekulás antibiotikumok között, hiszen passzív diffúzió helyett a baktérium membránpotenciálját felhasználva, aktív felvétellel jutnak az aminoglikozidok a sejtbe. Az aminoglikozid rezisztencia összetett mivoltát sugallja, hogy az aminoglikozid-adaptált vonalak jóval több, átlagosan 11,4

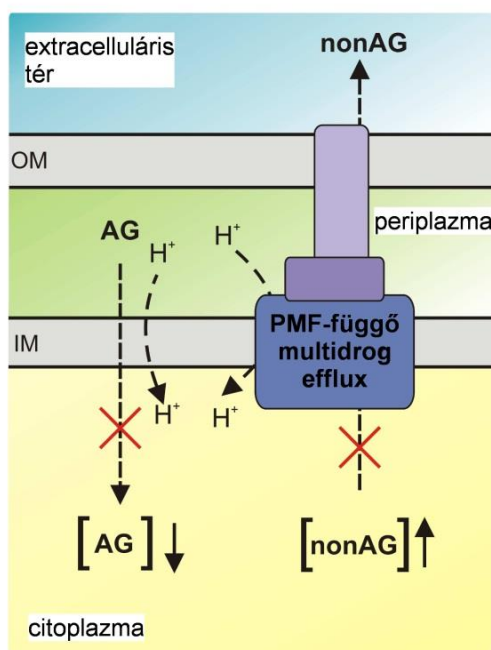
mutációra tettek szert, mint a többi antibiotikummal szemben adaptált vonalak, melyekben átlagosan 5,65 mutációt tudtunk azonosítani.

Az aminoglikozidok közvetlenül a riboszómát támadják, ám a fehérje szintézist nem gátolják, ehelyett misztranszlációhoz vezetnek. A misztranszláció folyamányaként hibás membrán fehérjék készülnek, melyeknek fontos szerepe van az aminoglikozidok által kiváltott oxidatív stresszben és azt követő sejthalálban²⁹. Az aminoglikozidok sejtbejutása aktív respirációt, azaz membránpotenciált igényel²¹⁷. Az aktív respirációhoz pedig szükséges a citokrómoknak és a légzési lánc többi komponensének a megfelelő működése²⁹. Ahhoz, hogy feltárjuk, mely egységeit érintik mutációk az aminoglikozid-adaptált vonalakban ennek az összetett mechanizmusnak, útvonal feldúsulási analízist²²⁵ végeztünk.

Az útvonal feldúsulási analízis feltárta számos biológiai folyamat felül reprezentáltságát az aminoglikozid-adaptált vonalak által felhalmozott mutációk között. A várakozásainknak megfelelően az egyik fő szelekciós célpont a transzlációs gépezet volt. A transzlációs gépezet résztvevői között egyaránt hordoztak mutációt riboszómális fehérjék (RpsL), elongációs faktorok (FusA) és tRNS szintetázok. Továbbá számos olyan gén is mutációt hordozott, melyek a membrán transzport folyamatokban, a foszfolipid bioszintézisben, valamint a sejtmembrán és a sejtfal homeosztázis fenntartásában vesznek részt. Kuriózusként a mutációt hordozó gének között szerepelt mind az oligopeptid transzporter OppF, melynek kulcsszerepe van a sejtfal fehérjék újrahasznosításában, mind a kétkomponensű, membrán stressz választ szabályozó CpxA²²⁶. A poliaminok, mint a putreszcin és a spermidin, bioszintézise szintén érintve volt. Ezek a molekulák csökkentik az aminoglikozid stressz következtében intracellulárisan termelődő reaktív oxigén gyökök termelődését²¹⁵, és ezáltal csökkentik a fehérje és DNS károsodás mértékét²⁹. Ezen felül a mutációt hordozó gének között igen elterjedtnek bizonyultak a közvetlen vagy közvetett módon a membrán elektrokémiai potenciálját befolyásoló gének. Ezen gének termékei részt vesznek az oxidatív foszforilációban, a proton-kálium szimportban (TrkH), az oxigénkötő hem bioszintézisében (HemA), valamint a citokróm terminális oxidáz komplexben (CyoB, CyoC). Emellett gyakran hordoznak mutációt az elektronszállítóként a respirációs elektrontranszport láncban résztvevő fehérjék is (IspA és a Nuo fehérje komplex), melyek hatással vannak a kinon készlet (quinone pool) alakulására is. Ez utóbbi csoportnak a legvalószínűbb a központi szerepe a járulékos érzékenység kialakulásában, már csak azért is, mert minden aminoglikozid-adaptált vonal hordozott legalább egy mutációt ebben az alrendszerben.

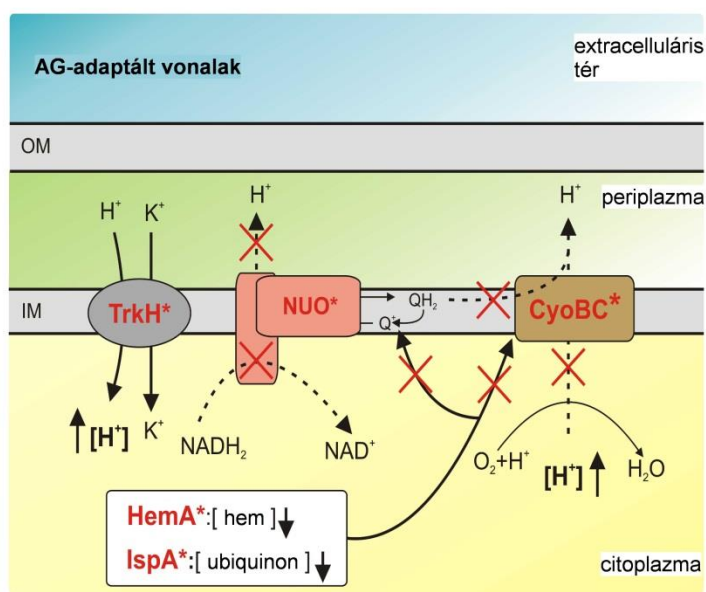
V.11. Az aminoglikozid-adaptált vonalak mutációinak kettős hatása a membrán permeabilitásra

Az aminoglikozid-adaptált vonalak által hordozott membránpotenciálra hatással levő mutációk mind az aminoglikozidok által kiváltott oxidatív stressznek, mind az aminoglikozidok felvételének a mértékét hivatottak csökkenteni. Azt feltételeztük ugyanakkor, hogy ez a csökkent membránpotenciál megnöveli számos más antibiotikummal szemben az érzékenységet. Feltételezésünk egyik alappillére, hogy az aminoglikozidok egyedülálló módon proton motoros erőt igényelnek a sejtbejutáshoz^{217,227}. Feltételezésünk másik alappillére pedig, hogy számos más antibiotikum aktív effluxa szintén proton motoros erőt igénylő folyamat²²⁸. Ezen ismeretek alapján egy olyan modellt javasoltunk, mely szerint a kólibaktérium a gyors, kismértékű aminoglikozid rezisztencia eléréséhez drasztikusan lecsökkenti a membránpotenciált. Az ehhez szükséges rezisztencia mutációk pedig járulékos hatásként jelentősen csökkentik a főbb proton motoros erő függő efflux pumpák működését (**25. ábra**). Modellünk megalapozottságának további alátámasztást ad az a korábbi két kísérletes munka, mely kimutatta, hogy a CCCP (mely az oxidatív foszforiláció kémiai gátlószere) csökkenti az aminoglikozidok sejten belüli felhalmozódását²²⁷, de emellett valószínűleg növeli az intracelluláris felhalmozódását számos más antibiotikumnak¹⁸⁶.



25. ábra. Az aminoglikozid-adaptált vonalak járulékos érzékenységet okozó mechanizmus sematikus ábrázolása. Az ábrán használt rövidítések: aminoglikozidok (AG), nem-aminoglikozid antibiotikumok (nonAG), külső sejtmembrán (OM), belső sejtmembrán (IM).

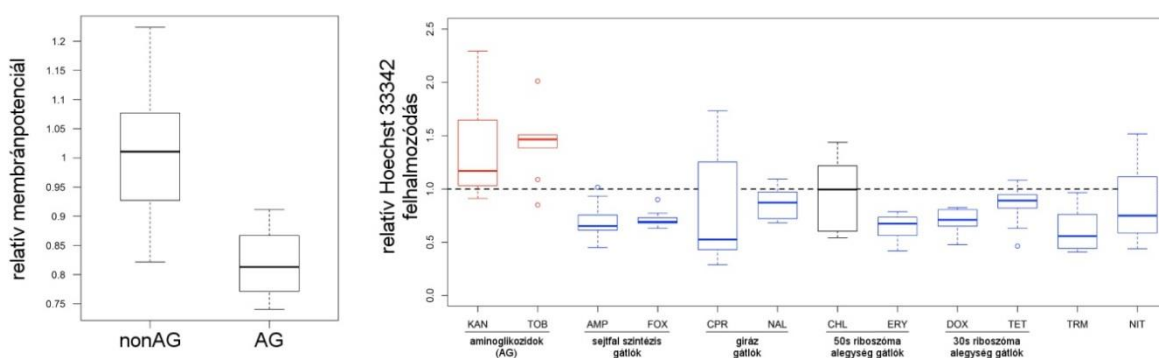
Első bizonyítékunkat a modellben javasolt mechanizmus meglétére az aminoglikozid-adaptált vonalakban azonosított mutációk biztosították, melyek jelentős része módosíthatja közvetlen vagy közvetett módon a baktérium membránpotenciálját (**26. ábra**). A mutációt hordozó gének között szerepel például négy olyan gén (*cyoB*, *ispA*, *nuoF* és *nuoE*) melyek figyelemre méltó tulajdonságokon osztoznak: 1) a funkcionális kapcsolatuk az elektron transzporthoz irodalmi adatokkal alátámasztható, 2) az ezekben a génekben megfigyelt mutációk 57%-a frame-shiftet vagy in frame stop kodont okoz, tehát valószínűleg nem működő, hibás fehérjék termelődéséhez vezet, 3) ezen gének deléciója a kemogenomikai adatsor alapján növeli az aminoglikozid rezisztenciát, míg más antibiotikumokkal szemben érzékenyít.



26. ábra. Az aminoglikozid-adaptált vonalak járulékos érzékenységét okozó mechanizmus hátterében azonosított mutációk. Az ábrán használt rövidítések: aminoglikozidok (AG), külső sejtmembrán (OM), belső sejtmembrán (IM).

A megfigyelt mutációkon túl további két biokémiai vizsgálat is alátámasztotta az általunk javasolt modellt. Első lépésként megmértük, hogy az aminoglikozid-adaptált vonalakban valóban csökkent-e a membránpotenciál. A membránpotenciált a dietiloxakarbocianin-jodid (DiOC2) membránpotenciál indikátor fluoreszcens festék segítségével határoztuk meg¹⁸⁴. Modellünket eredményeink maximálisan alátámasztották: a membránpotenciál jelentősen csökkent az aminoglikozid-adaptált vonalakban (**27. ábra, bal oldali panel**). További bizonyítékként az aminoglikozid-adaptált vonalak emelkedett intracelluláris Hoechst 33342 fluoreszcens festék felhalmozódást mutattak (**27. ábra, jobb oldali panel**), mely vagy a megnövekedett porin aktivitással, vagy az efflux pumpák csökkent működésével magyarázható¹⁸⁶. (A Hoechst 33342 festék a sejtbe jutva a DNS-hez kötve ad ki detektálható fluoreszcens jelet, így a sejtbeli felhalmozódása microtiter lemez

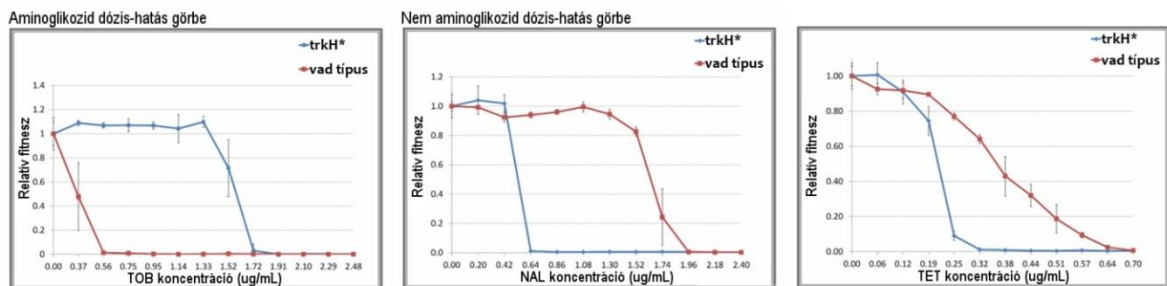
leolvasóval egyszerűen nyomon követhető. A festék a porin csatornákon jut a sejtbe és a multidrog efflux pumpák (pl.: AcrAB-Tolc) szubsztrátjaként aktív effluxszal tud távozni onnan.) Az aminoglikozid-adaptált vonalakkal szemben a többi antibiotikum osztály tagjaihoz adaptált vonalak csökkent Hoechst 33342 felhalmozódást mutattak a kiindulási törzshöz képest. Ez utóbbi mintázat összhangban van azzal a megfigyelésünkkel, hogy a nem-aminoglikozid antibiotikumokhoz adaptált vonalakban rendkívül elterjedtek az AcrAB-Tolc multidrog efflux pumpa expresszióját befolyásoló mutációk.



27. ábra. Az aminoglikozidokhoz (AG) és a nem aminoglikozidokhoz (nonAG) adaptált vonalak relatív membránpotenciálja (bal oldali panel), valamint az egyes antibiotikumokkal szemben adaptáltatott vonalak membrán permeabilitása (jobb oldali

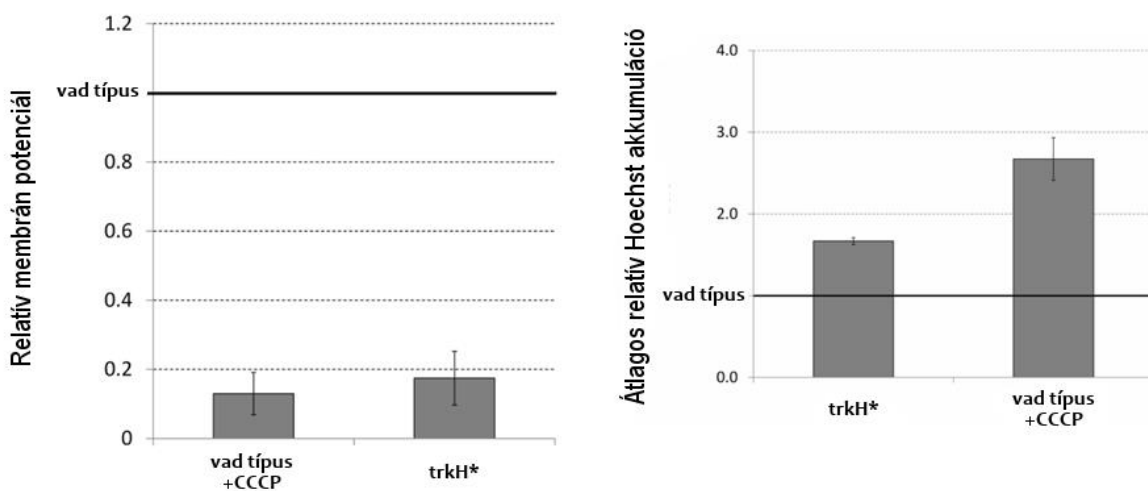
V.12. A *trkH* gén egyetlen pontmutációja is széleskörű járulékos érzékenységhez vezet

A legközvetlenebb bizonyítéka az egyes mutációk kettős hatásának a membrán permeabilitásra azon vizsgálatainkból következik, melyeket a *trkH* gént érintő mutációt hordozó egyedi mutáns *trkH** törzsön végeztünk, mely a *trkH* gént érintő pontmutációt leszámítva a vad típusú kiindulási törzssel azonos genotípussal rendelkezik. A TrkH a kálium ionok felvételével járul hozzá a megfelelő membránpotenciál kialakításához. Mutációi a szekvenált aminoglikozid-adaptált vonalak 64%-ában megtalálhatóak voltak. Az egyik ilyen azonosított mutáció egy az ioncsatornához közel eső aminosavban okozott szubsztitúciót (T350L), ezért ezt a mutációt választottuk ki visszaillesztésre és a járulékos érzékenység molekuláris hátterének részletesebb feltérképezésére. A visszaillesztett mutáció önmagában is enyhe aminoglikozid rezisztenciához vezetett, miközben számos más antibiotikummal szemben növelte a járulékos érzékenységet (5. táblázat és 28. ábra).



28. ábra. A *trkH** egyedi mutáns törzs keresztrezisztenciát mutat az aminoglikozidokra (például a tobramicinre, TOB), míg járulékos érzékenységet mutat számos más antibiotikumra (például a nalidixavra, NAL és a tetraciklinre, TET).

A *trkH** egyedi mutáns törzs csökkent membránpotenciálja, valamint megnövekedett Hoechst festék felhalmozása alátámasztotta elméletünket, miszerint a proton motoros erő áll a negatív csereviszony (trade-off) hátterében (**29. ábra**). További megerősítésként a kálium ion felvétel egyik regulátoráról már korábban leírták, hogy befolyással van mind a membránpotenciál, mind a multidrog érzékenység mértékére²²⁹.

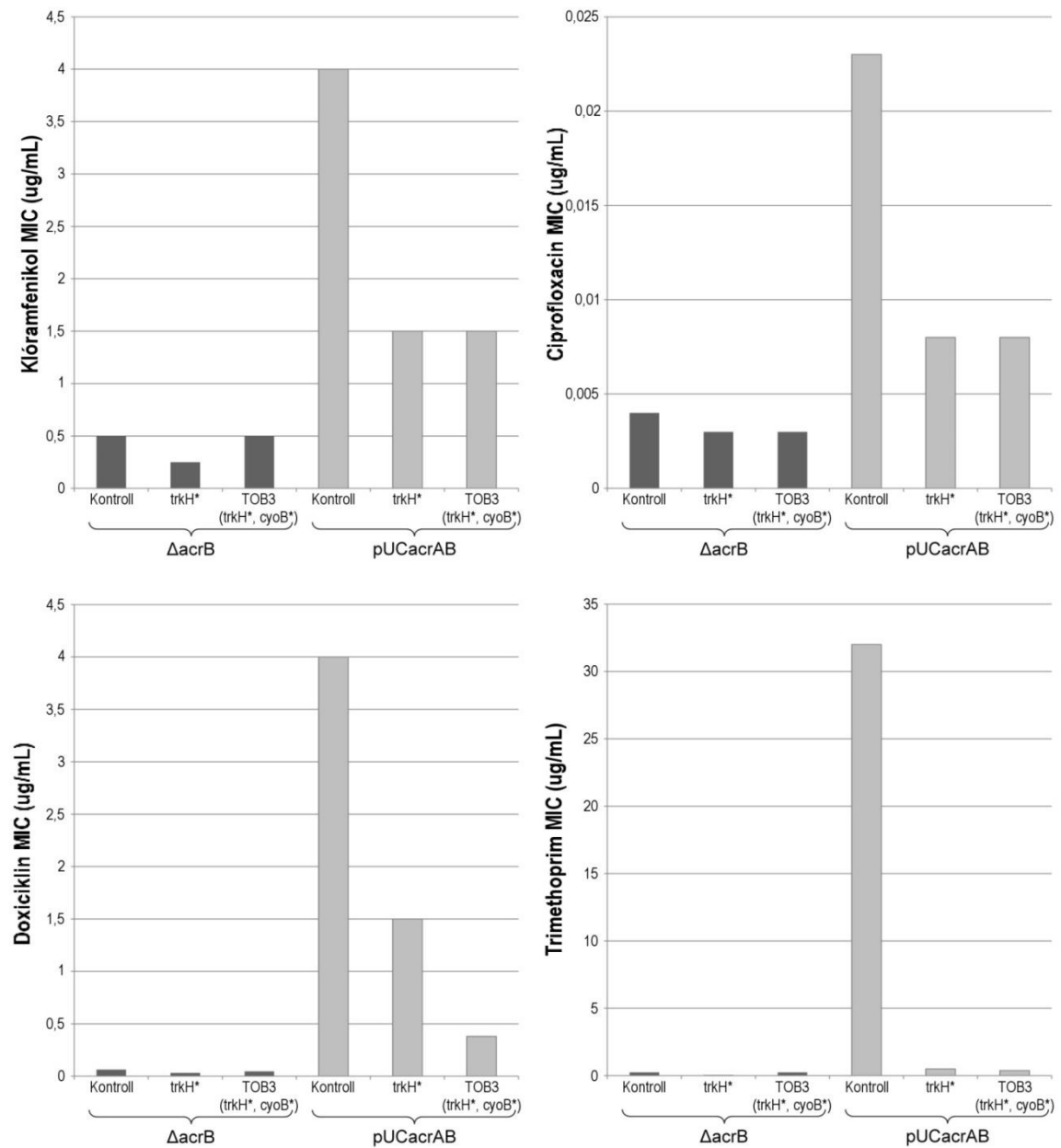


29. ábra. A *trkH** egyedi mutáns törzs membránpotenciálja jelentősen csökkent (bal oldali panel) és valószínűleg ezzel összefüggésben a membrán permeabilitása megnőtt (jobb oldali panel).

V.13. A járulékos érzékenység részben az AcrAB efflux rendszerhez köthető

A legfrissebb rendszerszintű kutatások sokat foglalkoztak a legfőbb antibiotikum transzporterek szubsztrát specificitásával deléciós, valamint overexpressziós könyvtárakat tesztelve az antibiotikumok széles palettájával szemben^{180,189,230,231}. Saját eredményeinket a korábbi kemogenomikai vizsgálatokkal összevetve azt találtuk, hogy az aminoglikozidokkal szemben járulékos érzékenységet okozó antibiotikumok 75%-a egyben az AcrAB efflux pumpa rendszer szubsztrátja is. Ennek az efflux pumpa rendszernek az overexpressziója a kólibaktérium esetében egyike a leggyakoribb multidrog rezisztencia mechanizmusoknak, overexpressziója számos antibiotikummal és detergenssel szemben okoz rezisztenciát, ellenben aminoglikozidokkal szemben nem^{103,189,208}. A sejtmembránon keresztül húzódó proton elektrokémiai potenciál grádiens a hajtóereje az AcrAB pumpa általi antibiotikum effluxnak.

Ezen tények alapján feltételeztük, hogy az AcrAB efflux rendszernek kulcsszerepe van a járulékos érzékenységi mintázat létrehozásában, melyet munkánk során megfigyeltünk. Pontosabban feltételeztük, hogy a membránpotenciált jelentősen csökkentő mutációk jelenléte miatt az AcrAB efflux rendszer az aminoglikozid-adaptált vonalakban feltehetően nem működik. Ennek a feltételezésnek a tesztelésére megvizsgáltuk az AcrAB efflux rendszer működését a *trkH* és *cyoB* géneket érintő mutációk jelenlétében és hiányában. Mint arról korábban már értekeztem, ezen gének gyakran hordoztak mutációt az aminoglikozid-adaptált vonalakban, valamint azt is be tudtuk bizonyítani, hogy ezekben a vonalakban a membránpotenciál valóban jelentősen csökkent. Vizsgálatainkhoz egy olyan többkópiás (multicopy) plazmidot alkalmaztunk, mely a kólibaktérium AcrAB transzportert kódoló génjeit hordozza, az azoknak megfelelő natív promóterekkel¹⁸⁹. Egy korábbi tanulmány módszerét követve a plazmidot betranszformáltuk a kiindulási törzsbe, valamint az aminoglikozid rezisztens, mutáns törzsekbe¹⁸⁹. Az így kapott törzsek érzékenységét négy olyan antibiotikummal szemben teszteltük, melyek az AcrAB efflux rendszer ismert szubsztrátjai. Azt találtuk, hogy azon törzsek, melyekből hiányzott az AcrAB efflux rendszer, fokozott érzékenységet mutattak mind a négy antibiotikummal szemben, a membránpotenciált érintő mutációk jelenlététől függetlenül (**30. ábra**). Az AcrAB overexpressziós plazmid mind a négy antibiotikummal szemben szignifikáns rezisztenciát biztosított a vad típusú kiindulási törzsben, azonban ugyanez a plazmid sokkal enyhébb rezisztenciát tudott biztosítani a mutációt hordozó törzsekben. Ezek az eredmények azt bizonyítják, hogy azon mutációk, melyek az aminoglikozid rezisztenciához a membránpotenciál csökkentésén keresztül járulnak hozzá, megnövelik az adott baktérium érzékenységét számos más antibiotikummal szemben, mivel akadályozzák az AcrAB efflux rendszer működését.



30. ábra. Az AcrAB efflux pumpa deléciójának (Δ acrB) és túltermelésének (pUCacrAB) hatása vad típusú (kontroll) és aminoglikozid-rezisztens (trkH*, TOB3) háttérben.

VI. Az eredmények megvitatása

A nagy áteresztőképességű laboratóriumi evolúciós kísérletet, teljes-genom szekvenálást, valamint az azt követő funkcionális analíziseket kombinálva feltérképeztük a kólibaktérium keresztrezisztencia, valamint járulékos érzékenység hálózatát, majd részletesen körbejártuk a főbb mechanizmusokat melyek a megfigyelt evolúciós kölcsönhatási mintázatokhoz vezettek. Eredményeink alapján az alábbi konklúziókat vonhatjuk le:

Először is, bemutattuk, hogy az egyetlen antibiotikum okozta szelekciós nyomás hatására spontán felhalmozódó mutációk is befolyásolják a sejt érzékenységét számos más antimikrobiális szerrel szemben is. Emellett azt is láthattuk, hogy az egyes antibiotikumok között jelentős különbségek lehetnek mind a rezisztens populációk növekedésének gátlásában, mind a multidrog rezisztencia kialakulásának segítésében. Az egyes antibiotikum párok közötti keresztrezisztencia kapcsolatok szinte teljesen függetlenek voltak attól, hogy a két antibiotikum szinergisztikusan hat-e kombinációban alkalmazva^{219,232}. Így megállapíthatjuk, hogy az evolúciós és a fiziológiás kölcsönhatások hálózatát eltérő mechanizmusok uralják. Mivel az evolúciós és a fiziológiás kölcsönhatások egyaránt befolyásolhatják hosszú távon az evolúciós útvonalat¹⁴ és ezáltal a kombinációs terápiás alkalmazás sikerét is, a két hálózat kombinációja különösen informatív lehet a jövőben az új antimikrobiális stratégiák fejlesztése során.

Másodszor, a párhuzamos evolúció jelentős mértéket öltött az eltérő antibiotikumokkal szemben adaptált vonalak között is, annak ellenére is, hogy az antibiotikum rezisztencia és a keresztrezisztencia hátterében álló molekuláris mechanizmusok nagy változatosságot mutattak. Munkánk során több olyan gént is azonosítottunk, melyeknek bizonyos mutációi számos antibiotikummal szemben biztosítottak rezisztenciát. Több esetben is (*phoQ*, *envZ*, *soxR* és *trkH*) ezen mutációk a multidrog rezisztencia kialakulásában és fenntartásában betöltött szerepének a megértéséhez további, klinikai izolátumokkal végzett vizsgálatok szükségesek. Várakozásainkkal ellentétben még azok a mutációk is képesek voltak számos más antibiotikummal szemben befolyásolni az érzékenységet, melyek az adott antibiotikum célpontját érintették. A fluorokinolon antibiotikumokhoz adaptált vonalak például szinte minden esetben hordoztak magukban egy, a topoizomerázt kódoló *gyrA* gént érintő mutációt. Ezen mutációk egyike, az A87G aminosav szubsztitúcióhoz vezető pontmutáció több más hatásmechanizmusú antibiotikummal szemben is megváltozott érzékenységhez vezetett. Ennek oka feltételezhetően az, hogy a mutációt hordozó GyrA a DNS szupertekeredést (supercoiling) befolyásolva a globális stressz válasz útvonal expressziójára is hatással van²³³. További meglepetést okozott, hogy több olyan mutációt is azonosítottunk, melyek önmagukban is járulékos érzékenységhez vezettek több antibiotikummal szemben is, ezzel bemutattva,

hogy a negatív csereviszony (trade-off) elterjedt jelenség az antibiotikumok okozta szelekciós nyomás alatt is^{21,234–236}.

Harmadszor, a megfigyelt mutációk 27%-a vezetett feltehetően működésképtelen vagy hibásan működő fehérjék termelődéséhez. Miközben a funkcióvesztéses mutációk potenciális szerepe az antibiotikum rezisztencia evolúcióban már korábban is felmerült^{103,237,238}, a mi munkánk bizonyította először a funkcióvesztéses mutációk más mutációkhoz viszonyított szerepét a genomi mutációk által történő adaptáció során. A gyakoriságukat és a potenciális előnyös hatásukat figyelembe véve a funkcióvesztéses mutációknak kiemelten fontos szerepe lehet a rezisztencia evolúció kezdeti fázisában²³⁹.

Negyedszer, az antibiotikumok közötti keresztrezisztencia gyakorisága és a kemogenomikai profil hasonlósága között erős összefüggést találtunk. A rendszerszintű kemogenomikai tanulmányok tehát nem csupán az antibiotikum hatásmechanizmusok feltérképezésében²⁴⁰, hanem a rezisztencia evolúció általános irányvonalainak megértésében is segítségünkre lehetnek.

Összegezve az eddig tárgyalt eredményeket, vizsgálataink bemutatták, hogy a rezisztencia evolúciót rendkívül pleiotróp mutációk uralják. A pleiotróp hatású mutációk széleskörű elterjedése arra utal, hogy a keresztrezisztencia jelensége sokkal általánosabb, s több, az antibiotikumoktól független stressz környezetre is kiterjedhet²⁴¹. Valóban, az általunk azonosított mutációt hordozó gének készletében feldúsulást mutatott több olyan kólibaktérium gén is, melyek a toxikus fémekkel (például réz és nikkel) és a detergenssekkel szembeni érzékenységet is befolyásolják. Azon tanulmányokat alapul véve, melyek a nehézfém szennyezés és az antibiotikum rezisztencia mintázatok közötti összefüggéseket vizsgálják a természetben²⁴², a jövőbeni kutatásoknak feltétlenül ki kell majd térnie arra is, hogy laboratóriumi körülmények között megvizsgálja, milyen gyakran és milyen mechanizmusok által valósul meg a nehézfémekre és az antibiotikumokra történő együttes szelekció. Rendkívül fontos lesz továbbá azt is megvizsgálni, mennyire konzerváltak a keresztrezisztencia kölcsönhatások az egyes baktérium fajok között, különös tekintettel a patogén baktériumokra. Emellett fontos jövőbeni célunk a horizontális géntranszfer által szerzett rezisztencia kölcsönhatások konzerváltságának feltérképezése is. Mivel számos adaptált vonal mutatott jelentős fitness költséget antibiotikum-mentes tápoldatban, fontos további célunk megvizsgálni, hogy az elérhető kompenzációs mutációk milyen mértékben tudják a rezisztencia költségét ellensúlyozni.

Munkánk második felében bemutattuk, hogy a járulékos érzékenység jelensége igen gyakori. Különösen érdekesnek bizonyult, hogy az aminoglikozid-adaptált vonalak szinte az összes többi antibiotikummal szemben fokozott érzékenységet mutattak (2-10-szeres csökkenés a minimális gátló koncentrációban). A teljes-genom szekvenálás több, együttesen megjelenő aminoglikozid rezisztencia mechanizmus megjelenését tárta fel.

Ahogy az várható volt, a legfőbb célpontjai a mutációknak a transzlációs gépezet, a membrán transzport, a foszfolipid szintézis, valamint a sejtmembrán és sejtfa homeosztázisát fenntartó gének voltak. Meglepő módon azonban számos olyan mutációt is találtunk, melyek a membrán elektrokémiai potenciálját fenntartó géneket érintette. Fontos megjegyezni, hogy ezekhez hasonló mutációk jelenlétét már leírták klinikai izolátumokban, valamint más kísérletes munkákban is²⁴³. Az elektrokémiai potenciált érintő mutációk általában a klinikumban egy jellegzetes fenotípus, a kis kolóniás variánsok (small colony variants, SCV) megjelenéséhez vezet. Az SCV fenotípust mutató fertőzések különösen veszélyesek, mivel lassú növekedésüknek köszönhetően sokáig képesek perzisztálni a szervezetben és ezzel visszatérő, krónikus fertőzéseket hoznak létre²¹⁰.

A *trkH* mutáció aminoglikozid rezisztenciában betöltött szerepét vizsgálva megerősítettük, hogy az aminoglikozid rezisztencia elérhető a proton motoros erő csökkentése által is^{210,244}. Jelen munkánkban azt is bebizonyítottuk, hogy a proton motoros erő csökkenése áll az aminoglikozid-adaptált vonalak járulékos érzékenysége mögött, részben a proton motoros erőtől függő fő multidrog efflux pumpák működésének akadályozottsága miatt. Még az egyik legjelentősebb multidrog efflux pumpa, az AcrAB pumpa overexpressziója is csak igen enyhe, jelentéktelen mértékű rezisztenciát tud biztosítani olyan genetikai háttérben, mely a proton motoros erőt nagymértékben lecsökkentette. A proton motoros erőtől függő efflux pumpák a klinikumban gyakran horizontális géntranszfer által jutnak a sejtbe, és kritikus szerepük van a multidrog rezisztencia kialakulásában és gyors terjedésében számos bakteriális fertőzés esetében^{228,245,246}. Ebből kifolyólag rendkívül széleskörű haszna lehet annak a megfigyelésünknek, hogy a genomi mutációk által biztosított rezisztencia mechanizmus akár akadályozhatja is a plazmidokon terjedő efflux pumpák működését. Ez alapján pedig a rezisztencia egy antibiotikummal szemben nem csupán járulékos érzékenységet okozhat más szerekkel szemben, hanem befolyásolhatja a hosszútávú alkalmazkodási képességet is¹⁴.

Összefoglalva, járulékos érzékenységi vizsgálataink főbb eredményei azt mutatják, hogy a sejten belüli antibiotikum koncentrációt meghatározó főbb tulajdonságok az aminoglikozid és nem aminoglikozid antibiotikumok esetében ellentétes irányban képesek a változásra. Természetesen az általunk felvázolt mechanizmus minden valószínűség szerint nem az egyetlen mechanizmus, amely az aminoglikozid-adaptált vonalak járulékos érzékenységének a hátterében áll. Az általunk felvázolt mechanizmust azonban mind a kemogenomikai, mind a kísérletes, mind pedig az irodalmi eredmények teljes mértékben alátámasztják. Egy további érdekes mechanizmus lehet például az elongációs faktort kódoló *fusA* gént érintő mutációk következményeinek vizsgálata. A *fusA* gén mutációja rendszeresen megjelent az aminoglikozid-adaptált vonalainkban. Korábbi vizsgálatokban már kimutatták, hogy a *fusA* gén mutációi *Salmonella* baktériumban nagyobb érzékenységet okoztak más antimikrobiális szerekkel szemben, miközben meglepő módon, ezek a mutációk is csökkentették a hem bioszintézist, valamint a respirációs aktivitást²³⁵.

Általánosságban elmondhatjuk, hogy a változatos környezetekben megfigyelhető genomi szintű adaptáció fitnessben mérhető következményeinek a megértése továbbra is az evolúcióbiológia egyik fontos kihívása marad²⁴⁷. A legújabb informatikai eszközök és laboratóriumi technikák lehetővé teszik, hogy a genomi evolúció bizonyos aspektusait előre jelezhessük²⁴⁸. Az ebben a munkában bemutatott munkafolyamat ötvözi a kísérletes evolúció, a rendszerbiológia valamint a genomika módszereit. Hasonló vizsgálatok folytatásával közelebb kerülhetünk az evolúciós csereviszonyok (trade-off) hátterében meghúzódó mechanizmusok általános szabályszerűségeinek megértéséhez.

VII. Gyakorlati következtetések: lehetőségek a multidrog rezisztencia megfékezésére

A jelenleg használt antibiotikumok egyre nagyobb mértékben veszítik el hatékonyságukat a multidrog rezisztencia terjedésének köszönhetően. Az új antimikrobiális szerek kifejlesztése tehát rendkívül sürgős lenne, azonban az antibiotikum fejlesztés az utóbbi években lelassult, zsákutcába jutott. A rezisztencia gyors megjelenése miatt az antibiotikum fejlesztés gazdaságilag nem kifizetődő befektetés. Ennél is nagyobb probléma, hogy szinte az összes ma használatban lévő, valamint a fejlesztés alatt álló antibiotikumok nagy része is az 1940-es, 1960-as években azonosított antibiotikumok származéka; rendkívül kevés az új hatásmechanizmussal rendelkező, új kémiai struktúrán alapuló gyógyszer, gyógyszerjelölt.

Ennek következtében az új antibiotikumok fejlesztése mellett előtérbe került olyan stratégiák kifejlesztése, melyekkel egyrészt késleltethetnénk a rezisztencia megjelenését az új fejlesztésű szerekkel szemben, másrészt a már meglévő antibiotikum eszköztárunkat lennének képesek ismét hatékonyan alkalmazni a multidrog rezisztens fertőzésekkel szemben. Ezen stratégiák alapjául kettő vagy több antibiotikum együttes kombinált vagy ciklikusan váltott alkalmazása szolgálhat.

A kombinációs stratégiák (tehát kettő vagy több gyógyszer együttes alkalmazása) már igen elterjedtek számos fertőző megbetegedés, például HIV, malária vagy akár tuberkulózis esetében, azonban bakteriális fertőzések kezelésére rendkívül ritka a kombinációs terápia alapvető alkalmazása^{249–251}. A kombinált alkalmazáshoz azonban több fontos feltételnek is teljesülnie kell. Egyrészt rendkívül előnyös, ha az együttesen alkalmazott szerek felerősítik egymás hatását, azaz szinergizmust mutatnak. A szinergizmus által maximalizálható a baktériumok elpusztításának hatékonysága, miközben csökkenthető az alkalmazott dózis és ezáltal a mellékhatások is mérsékelhetőek. A szinergizmus bizonyos esetekben akár a multidrog rezisztens fertőzésekkel szemben is hatékonyvá teheti olyan szerek kombinációját, melyek egyedi alkalmazása hatástalan. Önmagában azonban a szinergizmus nem biztosítja az antibiotikumok hosszútávú alkalmazhatóságát, hiszen nem akadályozza meg a rezisztencia kialakulását. Ahhoz, hogy a rezisztencia kialakulása késleltethető legyen, egy második feltételnek is érvényesülnie kell: az alkalmazott antibiotikumoknak reciprok járulékos érzékenységet kell mutatniuk egymás irányába. A reciprok járulékos érzékenység esetében a rezisztencia mutációk többsége csak az egyik alkalmazott antibiotikumra biztosít rezisztenciát, miközben a másik antibiotikummal szemben még további hiperérzékenységhez vezet. A járulékos érzékenység ezáltal képes megakadályozni a rezisztencia mutációk elterjedését a populációban, és így késlelteti a rezisztencia megjelenését. Mivel kutatásunkban nem találtunk összefüggést a szinergizmus és a járulékos érzékenység megléte között, ezért kiemelten fontos a

kombinációs terápiák fejlesztésekor mindkét jelenség átfogó vizsgálata, hiszen mind a szinergizmus, mind a járulékos érzékenység kulcsfontosságú a kombináció hosszútávú alkalmazhatóságának szempontjából^{26,206}.

A jelen munkánkat követően több tanulmány is alátámasztotta a járulékos érzékenység klinikai hasznosíthatóságát. A malária parazita *Plasmodium falciparum* esetében például bemutatták, hogy egy erős szinergizmust és járulékos érzékenységet mutató új gyógyszer páros együttes alkalmazása hogyan tudta meggátolni a rezisztencia kialakulását *in vitro* evolúciós kísérletben¹⁶⁵. A szinergizmus és a járulékos érzékenység hatását a rezisztencia evolúcióra később rendszerszinten is vizsgálták: a kólibaktériummal 5 antibiotikummal és azok kombinációival szemben végeztek laboratóriumi evolúciót²⁰⁶. Várakozásainknak megfelelően a kísérletben nem találtak összefüggést a fiziológiás (szinergikus, additív, antagonisztikus) kölcsönhatás és a kialakult rezisztencia mértéke között, ráadásul maguk a fiziológiás kölcsönhatások is változtak az evolúció során²⁰⁶. Ezzel szemben a járulékos érzékenység robusztus előrejelzője volt a rezisztencia evolúció lelassulásának²⁰⁶. Ezek az *in vitro* eredmények is igazolják tehát, hogy habár a szinergizmus segíthet a patogének gyorsabb kiirtásában a kezelés kezdetén, a rezisztencia evolúció sebességét leginkább a járulékos érzékenység megléte befolyásolja.

Egy másik lehetőség a járulékos érzékenység hasznosítására két vagy több antibiotikum ciklikus, időben váltott alkalmazása^{27,206}. A ciklikus alkalmazás kulcsa, hogy bár az önmagában alkalmazott antibiotikumra a kezelés során kialakulhat a rezisztencia, a következő ciklusban a járulékos érzékenységet mutató antibiotikum kiírja a rezisztens baktériumokat a populációból. Egy a ciklikus kezelésekre irányuló *in vitro* kutatásban számos reciprok járulékos érzékenységet mutató antibiotikum párt azonosítottak, majd bebizonyították az antibiotikum párok egyikét ciklikusan alkalmazva, hogy az azt alkotó antibiotikumokat felváltva alkalmazva hosszútávon a rezisztencia mindkét antibiotikumra elkerülhető²⁷. Egy másik kutatásban rövid, 1 napos váltásokat alkalmaztak a járulékos érzékenységet mutató antibiotikum pár tagjai között, s ezáltal sikeresen gátolták a rezisztencia mutációk elterjedését²⁵². A ciklikus terápiák tehát szintén jelentősen hozzájárulhatnak a jövőben az antibiotikum rezisztencia kialakulásának megakadályozásához.

Habár az utóbbi években hatalmas előrelépések történtek a járulékos érzékenység vizsgálatában, számos kérdés maradt még nyitott. Mivel a legtöbb rendszerszintű vizsgálat felépítéséből adódóan egyetlen modell törzsre tud fókuszálni, a járulékos érzékenység fajok közötti konzerváltságáról nincsenek ismereteink. Az aminoglikozid antibiotikumok és az antimikrobiális peptidek jellegzetes és egyben rendkívül hasonló sejtfelvételi mechanizmusa arra enged következtetni, hogy eredményeink egyetemesebb érvényűek lehetnek²⁵³. Legalább 3 olyan fehérjében (ArnC, SbmA, Trk) azonosítottunk mutációkat, melyek befolyásolhatják az antimikrobiális peptidokkal szemben érzékenységet. Ezen felül a hem bioszintézis útvonal mutációi *Salmonella* törzs

esetében rezisztenciát biztosítanak mind a kis peptidekkel, mind az aminoglikozidokkal szemben, miközben növelik az érzékenységet más, nem aminoglikozid antibiotikumokkal szemben²⁴⁴. Az antimikrobiális peptidek bevonása a járulékos érzékenységi vizsgálatokba jelentősen megnövelheti az ismert reciprok járulékos érzékenységet mutató antimikrobiális szer kombinációk számát és ezáltal segítheti a minél hatékonyabb kombinációs terápiák kidolgozását.

Legutolsósorban, fontos megemlítenünk munkánk hiányosságait. Egyrészt, számos járulékos érzékenység kölcsönhatás, melyben az aminoglikozidok nem érintettek, magyarázatra vár. Másodsorban, munkánk szinte teljes mértékben mellőzte a horizontális géntranszfer által szereshető mutációk vizsgálatát. Harmadrészt, klinikai rendszerszintű vizsgálatok hiányában nincs tudomásunk a klinikai izolátumokban megfigyelhető proton motoros erőt módosító mutációk gyakoriságáról. Ez utóbbi okból az általunk részletesen leírt járulékos érzékenység kölcsönhatás közvetlen terápiás következményeit nem áll módunkban tárgyalni. Továbbra is ellentmondásos, hogy vajon két antibiotikum együttes vagy váltakozó alkalmazásával lassítható-e hatékonyabban a rezisztencia kialakulása^{19,152}. A fenti stratégiák sikerességét valószínűleg a választott antibiotikumok mibenléte, valamint a köztük fenálló fiziológiás és evolúciós kölcsönhatások (keresztrezisztencia vagy járulékos érzékenység) rendkívüli módon befolyásolják.

Köszönetnyilvánítás

Először is szeretném megköszönni témavezetőmnek, Pál Csabának a lehetőséget, hogy a csoportjában dolgozhatok, a problémakör felvetését, a kéziratok megírásában nyújtott segítségét, a stabil és inspiráló munkakörnyezetet, és hogy minden lehetőséget megadott arra, hogy a maximumot hozzam ki magamból.

Külön köszönettel tartozom korábbi mentoromnak, Lázár Viktóriának a nagy áteresztőképességű kísérleti protokollok kifejlesztéséért, valamint hogy mindig számíthattam és a mai napig számíthatok segítségére és tanácsaira.

Hálás köszönettel tartozom a projekt összes résztvevőjének a kísérletekben, a kiértékelésben és a kéziratok megírásában nyújtott segítségéért:

- Lázár Viktóriának és Hrtyan Mónikának a projekt alapjául szolgáló nagy áteresztőképességű mérési protokollok kidolgozásáért és optimalizálásáért;
- Méhi Orsolyának, Bogos Baláznak és Csörgő Bálintnak a molekuláris biológiai módszerekben nyújtott segítségükért. Külön hálával tartozom nekik, amiért bár többnyire eltérő projekteken dolgoztunk, mégis bármikor és bármiben számíthattam a segítségükre, tanácsaikra és ötleteikre;
- Lázár Viktóriának, Fekete Gergelynek, Szappanos Baláznak, Györkei Ádámnak, Gajinder Pal Singh-nek, Busa-Fekete Róbertnek és Kégl Baláznak az adatalemzésben nyújtott segítségükért és munkájukért;
- Kollaborátorainknak: Nagy Istvánnak, Horváth Baláznak és Vörös Andreának a teljes-genom szekvenálás elvégzéséért és az adatok részletekbe menő kiértékeléséért;
- Valamint Papp Baláznak és Pál Csabának a projekt koordinálásáért, a mentorálásért és a kézirat megírásában nyújtott segítségéért.

Köszönettel tartozom továbbá a Kísérleti Evolúcióbiológiai Csoport és a Számítógépes Rendszerbiológiai Csoport összes jelenlegi és volt tagjának, amiért mindig fordulhattam hozzájuk kérdéssel, kéréssel és számíthattam a segítségükre, bármilyen probléma is adódott a labor munka vagy az eredmények kiértékelése során. Külön köszönöm volt és jelenlegi „szobatársaimnak” a vidám légkört, az inspiráló ötleteket és a folyamatos bátorítást.

Köszönöm az MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpontnak a doktori ösztöndíját, valamint Pál Csabának az ERC (H2020-ERC-2014-CoG) és GINOP EVOMER (GINOP-2.3.2-15-2016-00014) pályázatokból nyújtott anyagi támogatást.

Köszönöm Kereszt Attilának és Kovács T. Ákosnak, hogy elvállalták a dolgozatom bírálatát a házi védelemre és észrevételeikkel hozzájárultak, hogy egy valóban koherens, olvasmányos dolgozat kerüljön nyomtatásra.

Végezetül köszönöm a családomnak, hogy mindig hittek bennem, mellettem álltak és támogattak, még akkor is, amikor a disszertáció megírása alatt hosszú hetekig többnyire csak fizikailag voltam jelen az otthonunkban.

VIII. Szakirodalmi hivatkozások

1. Hancock, R. E. W. Collateral damage. *Nat. Biotechnol.* **32**, 66–68 (2014).
2. World Health Organization. Research for universal health coverage: World health report 2013. (2013).
3. Clatworthy, A. E., Pierson, E. & Hung, D. T. Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy. *Nat. Chem. Biol.* **3**, 541–548 (2007).
4. Palumbi, S. R. Humans as the world's greatest evolutionary force. *Science* **293**, 1786–1790 (2001).
5. Alizon, S. & Méthot, P.-O. Reconciling Pasteur and Darwin to control infectious diseases. *PLOS Biol.* **16**, e2003815 (2018).
6. Abramson, M. A. & Sexton, D. J. Nosocomial methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* primary bacteremia: at what costs? *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **20**, 408–411 (1999).
7. Lewis, K. Platforms for antibiotic discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **12**, 371–387 (2013).
8. Ventola, C. L. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P T Peer-Rev. J. Formul. Manag.* **40**, 277–283 (2015).
9. Bartlett, J. G., Gilbert, D. N. & Spellberg, B. Seven ways to preserve the miracle of antibiotics. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **56**, 1445–1450 (2013).
10. Piddock, L. J. V. The crisis of no new antibiotics--what is the way forward? *Lancet Infect. Dis.* **12**, 249–253 (2012).
11. Gould, I. M. & Bal, A. M. New antibiotic agents in the pipeline and how they can help overcome microbial resistance. *Virulence* **4**, 185–191 (2013).
12. Payne, D. J., Gwynn, M. N., Holmes, D. J. & Pompliano, D. L. Drugs for bad bugs: confronting the challenges of antibacterial discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **6**, 29–40 (2007).
13. Wright, G. D. Something old, something new: revisiting natural products in antibiotic drug discovery. *Can. J. Microbiol.* **60**, 147–154 (2014).

14. Palmer, A. C. & Kishony, R. Understanding, predicting and manipulating the genotypic evolution of antibiotic resistance. *Nat. Rev. Genet.* **14**, 243–248 (2013).
15. Baquero, F. Low-level antibacterial resistance: a gateway to clinical resistance. *Drug Resist. Updat. Rev. Comment. Antimicrob. Anticancer Chemother.* **4**, 93–105 (2001).
16. Goldstein, F. The potential clinical impact of low-level antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* **59**, 1–4 (2006).
17. Gullberg, E. *et al.* Selection of resistant bacteria at very low antibiotic concentrations. *PLoS Pathog.* **7**, e1002158 (2011).
18. Toprak, E. *et al.* Evolutionary paths to antibiotic resistance under dynamically sustained drug selection. *Nat. Genet.* **44**, 101–105 (2011).
19. Chait, R., Craney, A. & Kishony, R. Antibiotic interactions that select against resistance. *Nature* **446**, 668–671 (2007).
20. Pena-Miller, R. *et al.* When the most potent combination of antibiotics selects for the greatest bacterial load: the smile-frown transition. *PLoS Biol.* **11**, e1001540 (2013).
21. Szybalski, W. & Bryson, V. Genetic studies on microbial cross resistance to toxic agents. I. Cross resistance of *Escherichia coli* to fifteen antibiotics. *J. Bacteriol.* **64**, 489–499 (1952).
22. Gagneux, S. *et al.* The competitive cost of antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* **312**, 1944–1946 (2006).
23. Pluchino, K. M., Hall, M. D., Goldsborough, A. S., Callaghan, R. & Gottesman, M. M. Collateral sensitivity as a strategy against cancer multidrug resistance. *Drug Resist. Updat.* **15**, 98–105 (2012).
24. Pál, C., Papp, B. & Lázár, V. Collateral sensitivity of antibiotic-resistant microbes. *Trends Microbiol.* **23**, 401–407 (2015).
25. Lazar, V. *et al.* Bacterial evolution of antibiotic hypersensitivity. *Mol. Syst. Biol.* **9**, 700–700 (2014).
26. Lázár, V. *et al.* Genome-wide analysis captures the determinants of the antibiotic cross-resistance interaction network. *Nat. Commun.* **5**, (2014).

27. Imamovic, L. & Sommer, M. O. A. Use of collateral sensitivity networks to design drug cycling protocols that avoid resistance development. *Sci. Transl. Med.* **5**, 204ra132 (2013).
28. Oz, T. *et al.* Strength of Selection Pressure Is an Important Parameter Contributing to the Complexity of Antibiotic Resistance Evolution. *Mol. Biol. Evol.* **31**, 2387–2401 (2014).
29. Kohanski, M. A., Dwyer, D. J. & Collins, J. J. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, 423–435 (2010).
30. Hans Von Döhren. Antibiotics: Actions, origins, resistance, by C. Walsh. 2003. Washington, DC: ASM Press. 345 pp. \$99.95 (hardcover). *Protein Sci.* **13**, 3059–3060 (2009).
31. Tomasz, A. The Mechanism of the Irreversible Antimicrobial Effects of Penicillins: How the Beta-Lactam Antibiotics Kill and Lyse Bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **33**, 113–137 (1979).
32. Edmund M. Wise Jr. & James T. Park. Penicillin: its basic site of action as an inhibitor of a peptide cross-linking reaction in cell wall mucopeptide synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **54**, 75–81 (1965).
33. Donald J. Tipper & Jack L. Strominger. Mechanism of action of penicillins: a proposal based on their structural similarity to acyl-D-alanyl-D-alanine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **54**, 1133–1141 (1965).
34. Kresse, H., Belsey, M. J. & Rovini, H. The antibacterial drugs market. *Nat. Rev. Drug Discov.* **6**, 19–20 (2007).
35. Drlica, K., Malik, M., Kerns, R. J. & Zhao, X. Quinolone-Mediated Bacterial Death. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 385–392 (2008).
36. *Quinolone Antimicrobial Agents, Third Edition.* (American Society of Microbiology, 2003). doi:10.1128/9781555817817
37. William A. Goss, William H. Deitz & Thomas M. Cook. Mechanism of action of nalidixic acid on Escherichia coli. II. Inhibition of deoxyribonucleic acid synthesis. *J. Bacteriol.* **89**, 1068–1074 (1965).
38. M. Snyder & K. Drlica. DNA gyrase on the bacterial chromosome: DNA cleavage induced by oxolinic acid. *J. Mol. Biol.* **131**, 287–302

39. Chen, C.-R., Malik, M., Snyder, M. & Drlica, K. DNA Gyrase and Topoisomerase IV on the Bacterial Chromosome: Quinolone-induced DNA Cleavage. *J. Mol. Biol.* **258**, 627–637 (1996).
40. Piddock, L. J., Walters, R. N. & Diver, J. M. Correlation of quinolone MIC and inhibition of DNA, RNA, and protein synthesis and induction of the SOS response in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**, 2331–2336 (1990).
41. Sandegren, L., Lindqvist, A., Kahlmeter, G. & Andersson, D. I. Nitrofurantoin resistance mechanism and fitness cost in *Escherichia coli*. *J. Antimicrob. Chemother.* **62**, 495–503 (2008).
42. Guay, D. R. An update on the role of nitrofurans in the management of urinary tract infections. *Drugs* **61**, 353–364 (2001).
43. Bryant, D. W., McCalla, D. R., Leeksa, M. & Laneuville, P. Type I nitroreductases of *Escherichia coli*. *Can. J. Microbiol.* **27**, 81–86 (1981).
44. McCalla, D. R., Kaiser, C. & Green, M. H. Genetics of nitrofurazone resistance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **133**, 10–16 (1978).
45. Tu, Y. & McCalla, D. R. Effect of activated nitrofurans on DNA. *Biochim. Biophys. Acta* **402**, 142–149 (1975).
46. Kahlmeter, G. The ECO.SENS Project: a prospective, multinational, multicentre epidemiological survey of the prevalence and antimicrobial susceptibility of urinary tract pathogens—interim report. *J. Antimicrob. Chemother.* **46 Suppl 1**, 15–22; discussion 63-65 (2000).
47. Chopra, I. & Roberts, M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* **65**, 232-260 ; second page, table of contents (2001).
48. Chopra, I., Hawkey, P. M. & Hinton, M. Tetracyclines, molecular and clinical aspects. *J. Antimicrob. Chemother.* **29**, 245–277 (1992).
49. Noah, J. W., Dolan, M. A., Babin, P. & Wollenzien, P. Effects of Tetracycline and Spectinomycin on the Tertiary Structure of Ribosomal RNA in the *Escherichia coli* 30 S Ribosomal Subunit. *J. Biol. Chem.* **274**, 16576–16581 (1999).
50. Schnappinger, D. & Hillen, W. Tetracyclines: antibiotic action, uptake, and resistance mechanisms. *Arch. Microbiol.* **165**, 359–369 (1996).

51. Tenson, T., Lovmar, M. & Ehrenberg, M. The Mechanism of Action of Macrolides, Lincosamides and Streptogramin B Reveals the Nascent Peptide Exit Path in the Ribosome. *J. Mol. Biol.* **330**, 1005–1014 (2003).
52. Katz, L. & Ashley, G. W. Translation and protein synthesis: macrolides. *Chem. Rev.* **105**, 499–528 (2005).
53. Patel, U. *et al.* Oxazolidinones mechanism of action: inhibition of the first peptide bond formation. *J. Biol. Chem.* **276**, 37199–37205 (2001).
54. Olliaro, P. Mode of action and mechanisms of resistance for antimalarial drugs. *Pharmacol. Ther.* **89**, 207–219 (2001).
55. Brogden, R. N., Carmine, A. A., Heel, R. C., Speight, T. M. & Avery, G. S. Trimethoprim: a review of its antibacterial activity, pharmacokinetics and therapeutic use in urinary tract infections. *Drugs* **23**, 405–430 (1982).
56. Bolin, J. T., Filman, D. J., Matthews, D. A., Hamlin, R. C. & Kraut, J. Crystal structures of *Escherichia coli* and *Lactobacillus casei* dihydrofolate reductase refined at 1.7 Å resolution. I. General features and binding of methotrexate. *J. Biol. Chem.* **257**, 13650–13662 (1982).
57. Robert Ferone. Folate metabolism in malaria. *Bull. World Health Organ.* **55**, 291–298 (1977).
58. Davies, J., Gorini, L. & Davis, B. D. Misreading of RNA codewords induced by aminoglycoside antibiotics. *Mol. Pharmacol.* **1**, 93–106 (1965).
59. Karimi, R. & Ehrenberg, M. Dissociation rate of cognate peptidyl-tRNA from the A-site of hyper-accurate and error-prone ribosomes. *Eur. J. Biochem.* **226**, 355–360 (1994).
60. Fourmy, D., Recht, M. I., Blanchard, S. C. & Puglisi, J. D. Structure of the A site of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA complexed with an aminoglycoside antibiotic. *Science* **274**, 1367–1371 (1996).
61. Pape, T., Wintermeyer, W. & Rodnina, M. V. Conformational switch in the decoding region of 16S rRNA during aminoacyl-tRNA selection on the ribosome. *Nat. Struct. Biol.* **7**, 104–107 (2000).
62. Davis, B. D., Chen, L. L. & Tai, P. C. Misread protein creates membrane channels: an essential step in the bactericidal action of aminoglycosides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**, 6164–6168 (1986).

63. Ruiz, N. & Silhavy, T. J. Sensing external stress: watchdogs of the Escherichia coli cell envelope. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**, 122–126 (2005).
64. Liu, X. & De Wulf, P. Probing the ArcA-P modulon of Escherichia coli by whole genome transcriptional analysis and sequence recognition profiling. *J. Biol. Chem.* **279**, 12588–12597 (2004).
65. Hancock, R. E., Farmer, S. W., Li, Z. S. & Poole, K. Interaction of aminoglycosides with the outer membranes and purified lipopolysaccharide and OmpF porin of Escherichia coli. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**, 1309–1314 (1991).
66. Arrow, A. S. & Taber, H. W. Streptomycin accumulation by Bacillus subtilis requires both a membrane potential and cytochrome aa3. *Antimicrob. Agents Chemother.* **29**, 141–146 (1986).
67. Bryan, L. E. & Kwan, S. Roles of ribosomal binding, membrane potential, and electron transport in bacterial uptake of streptomycin and gentamicin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **23**, 835–845 (1983).
68. Hancock, R. Uptake of ¹⁴C-streptomycin by some microorganisms and its relation to their streptomycin sensitivity. *J. Gen. Microbiol.* **28**, 493–501 (1962).
69. Kogut, M., Lightbrown, J. W. & Isaacson, P. STREPTOMYCIN ACTION AND ANAEROBIOSIS. *J. Gen. Microbiol.* **39**, 155–164 (1965).
70. Anand, N. & Davis, B. D. Damage by streptomycin to the cell membrane of Escherichia coli. *Nature* **185**, 22–23 (1960).
71. Anand, N., Davis, B. D. & Armitage, A. K. Uptake of streptomycin by Escherichia coli. *Nature* **185**, 23–24 (1960).
72. Blair, J. M. A., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O. & Piddock, L. J. V. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* **13**, 42–51 (2014).
73. Tsuchido, T. & Takano, M. Sensitization by heat treatment of Escherichia coli K-12 cells to hydrophobic antibacterial compounds. *Antimicrob. Agents Chemother.* **32**, 1680–1683 (1988).
74. Walsh, C. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature* **406**, 775–781 (2000).

75. Kojima, S. & Nikaido, H. Permeation rates of penicillins indicate that *Escherichia coli* porins function principally as nonspecific channels. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, E2629–E2634 (2013).
76. Vargiu, A. V. & Nikaido, H. Multidrug binding properties of the AcrB efflux pump characterized by molecular dynamics simulations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 20637–20642 (2012).
77. Delcour, A. H. Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* **1794**, 808–816 (2009).
78. Nikaido, H. Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**, 593–656 (2003).
79. Vaara, M. Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiol. Rev.* **56**, 395–411 (1992).
80. Nikaido, H. & Thanassi, D. G. Penetration of lipophilic agents with multiple protonation sites into bacterial cells: tetracyclines and fluoroquinolones as examples. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**, 1393–1399 (1993).
81. Thanassi, D. G., Suh, G. S. & Nikaido, H. Role of outer membrane barrier in efflux-mediated tetracycline resistance of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **177**, 998–1007 (1995).
82. Cohen, S. P., McMurry, L. M. & Levy, S. B. *marA* locus causes decreased expression of OmpF porin in multiple-antibiotic-resistant (Mar) mutants of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **170**, 5416–5422 (1988).
83. Chapman, J. S. & Georgopapadakou, N. H. Routes of quinolone permeation in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **32**, 438–442 (1988).
84. Hirai, K., Aoyama, H., Irikura, T., Iyobe, S. & Mitsuhashi, S. Differences in susceptibility to quinolones of outer membrane mutants of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **29**, 535–538 (1986).
85. Cowan, S. W. *et al.* Crystal structures explain functional properties of two *E. coli* porins. *Nature* **358**, 727–733 (1992).
86. Nikaido, H. Porins and specific diffusion channels in bacterial outer membranes. *J. Biol. Chem.* **269**, 3905–3908 (1994).
87. Baslé, A., Rummel, G., Storici, P., Rosenbusch, J. P. & Schirmer, T. Crystal structure of osmoporin OmpC from *E. coli* at 2.0 Å. *J. Mol. Biol.* **362**, 933–942 (2006).

88. Webber, M. A. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* **51**, 9–11 (2003).
89. Lomovskaya, O. *et al.* Identification and Characterization of Inhibitors of Multidrug Resistance Efflux Pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: Novel Agents for Combination Therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 105–116 (2001).
90. Saier, Jr, M. H. & Paulsen, I. T. Phylogeny of multidrug transporters. *Semin. Cell Dev. Biol.* **12**, 205–213 (2001).
91. Li, X. Z., Livermore, D. M. & Nikaido, H. Role of efflux pump(s) in intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to tetracycline, chloramphenicol, and norfloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**, 1732–1741 (1994).
92. Wang, H., Dzink-Fox, J. L., Chen, M. & Levy, S. B. Genetic Characterization of Highly Fluoroquinolone-Resistant Clinical *Escherichia coli* Strains from China: Role of *acrR* Mutations. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 1515–1521 (2001).
93. Webber, M. A. & Piddock, L. J. V. Absence of Mutations in *marRAB* or *soxRS* in *acrB*-Overexpressing Fluoroquinolone-Resistant Clinical and Veterinary Isolates of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 1550–1552 (2001).
94. Alekshun, M. N. & Levy, S. B. Regulation of chromosomally mediated multiple antibiotic resistance: the *mar* regulon. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**, 2067–2075 (1997).
95. Pomposiello, P. J. & Demple, B. Identification of SoxS-regulated genes in *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *J. Bacteriol.* **182**, 23–29 (2000).
96. Blair, J. M., Richmond, G. E. & Piddock, L. J. Multidrug efflux pumps in Gram-negative bacteria and their role in antibiotic resistance. *Future Microbiol.* **9**, 1165–1177 (2014).
97. Ma, D., Alberti, M., Lynch, C., Nikaido, H. & Hearst, J. E. The local repressor AcrR plays a modulating role in the regulation of *acrAB* genes of *Escherichia coli* by global stress signals. *Mol. Microbiol.* **19**, 101–112 (1996).
98. Westbrook-Wadman, S. *et al.* Characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* efflux pump contributing to aminoglycoside impermeability. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 2975–2983 (1999).

99. Livermore, D. M. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **34**, 634–640 (2002).
100. Du, D. *et al.* Structure of the AcrAB–TolC multidrug efflux pump. *Nature* **509**, 512–515 (2014).
101. Ma, D. *et al.* Molecular cloning and characterization of *acrA* and *acrE* genes of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **175**, 6299–6313 (1993).
102. White, D. G., Goldman, J. D., Demple, B. & Levy, S. B. Role of the *acrAB* locus in organic solvent tolerance mediated by expression of *marA*, *soxS*, or *robA* in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **179**, 6122–6126 (1997).
103. Okusu, H., Ma, D. & Nikaido, H. AcrAB efflux pump plays a major role in the antibiotic resistance phenotype of *Escherichia coli* multiple-antibiotic-resistance (Mar) mutants. *J. Bacteriol.* **178**, 306–308 (1996).
104. Philippon, A., Labia, R. & Jacoby, G. Extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**, 1131–1136 (1989).
105. Shaw, K. J., Rather, P. N., Hare, R. S. & Miller, G. H. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol. Rev.* **57**, 138–163 (1993).
106. Hawkey, P. M. Mechanisms of quinolone action and microbial response. *J. Antimicrob. Chemother.* **51**, 29–35 (2003).
107. Avison, M. B. New approaches to combating antimicrobial drug resistance. *Genome Biol.* **6**, 243 (2005).
108. Huovinen, P., Sundström, L., Swedberg, G. & Sköld, O. Trimethoprim and sulfonamide resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**, 279–289 (1995).
109. Coates, A., Hu, Y., Bax, R. & Page, C. The future challenges facing the development of new antimicrobial drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* **1**, 895–910 (2002).
110. Davin-Regli, A. *et al.* Membrane Permeability and Regulation of Drug Influx and Efflux; in Enterobacterial Pathogens. *Curr. Drug Targets* **9**, 750–759 (2008).
111. Viveiros, M. *et al.* Antibiotic stress, genetic response and altered permeability of *E. coli*. *PLoS One* **2**, e365 (2007).

112. George, A. M. & Levy, S. B. Amplifiable resistance to tetracycline, chloramphenicol, and other antibiotics in *Escherichia coli*: involvement of a non-plasmid-determined efflux of tetracycline. *J. Bacteriol.* **155**, 531–540 (1983).
113. George, A. M. & Levy, S. B. Gene in the major cotransduction gap of the *Escherichia coli* K-12 linkage map required for the expression of chromosomal resistance to tetracycline and other antibiotics. *J. Bacteriol.* **155**, 541–548 (1983).
114. Kern, W. V., Oethinger, M., Jellen-Ritter, A. S. & Levy, S. B. Non-target gene mutations in the development of fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 814–820 (2000).
115. Cohen, S. P., McMurry, L. M., Hooper, D. C., Wolfson, J. S. & Levy, S. B. Cross-resistance to fluoroquinolones in multiple-antibiotic-resistant (Mar) *Escherichia coli* selected by tetracycline or chloramphenicol: decreased drug accumulation associated with membrane changes in addition to OmpF reduction. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**, 1318–1325 (1989).
116. Alekshun, M. N. & Levy, S. B. The mar regulon: multiple resistance to antibiotics and other toxic chemicals. *Trends Microbiol.* **7**, 410–413 (1999).
117. Poole, K. Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* **56**, 20–51 (2005).
118. Jana, S. & Deb, J. K. Molecular understanding of aminoglycoside action and resistance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **70**, 140–150 (2006).
119. Davies, J. & Wright, G. D. Bacterial resistance to aminoglycoside antibiotics. *Trends Microbiol.* **5**, 234–240 (1997).
120. Zembower, T. R., Noskin, G. A., Postelnick, M. J., Nguyen, C. & Peterson, L. R. The utility of aminoglycosides in an era of emerging drug resistance. *Int. J. Antimicrob. Agents* **10**, 95–105 (1998).
121. Fluit, A. C. & Schmitz, F. J. Class 1 integrons, gene cassettes, mobility, and epidemiology. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol.* **18**, 761–770 (1999).
122. Neu, H. C. The crisis in antibiotic resistance. *Science* **257**, 1064–1073 (1992).
123. Pezzella, C., Ricci, A., DiGiannatale, E., Luzzi, I. & Carattoli, A. Tetracycline and streptomycin resistance genes, transposons, and plasmids in *Salmonella enterica* isolates from animals in Italy. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 903–908 (2004).

124. Levings, R. S., Partridge, S. R., Lightfoot, D., Hall, R. M. & Djordjevic, S. P. New Integron-Associated Gene Cassette Encoding a 3-N-Aminoglycoside Acetyltransferase. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 1238–1241 (2005).
125. Rosenberg, E. Y., Ma, D. & Nikaido, H. AcrD of Escherichia coli is an aminoglycoside efflux pump. *J. Bacteriol.* **182**, 1754–1756 (2000).
126. Garneau-Tsodikova, S. & Labby, K. J. Mechanisms of resistance to aminoglycoside antibiotics: overview and perspectives. *MedChemComm* **7**, 11–27 (2016).
127. McCoy, L. S., Xie, Y. & Tor, Y. Antibiotics that target protein synthesis. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **2**, 209–232 (2011).
128. Wilson, D. N. Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* **12**, 35–48 (2014).
129. Holberger, L. E. & Hayes, C. S. Ribosomal Protein S12 and Aminoglycoside Antibiotics Modulate A-site mRNA Cleavage and Transfer-Messenger RNA Activity in Escherichia coli. *J. Biol. Chem.* **284**, 32188–32200 (2009).
130. Maravić, G. Macrolide resistance based on the Erm-mediated rRNA methylation. *Curr. Drug Targets Infect. Disord.* **4**, 193–202 (2004).
131. Galimand, M., Sabtcheva, S., Courvalin, P. & Lambert, T. Worldwide disseminated armA aminoglycoside resistance methylase gene is borne by composite transposon Tn1548. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 2949–2953 (2005).
132. Lenski, R. E. Experimental evolution and the dynamics of adaptation and genome evolution in microbial populations. *ISME J.* **11**, 2181–2194 (2017).
133. Charles Darwin. *On the Origin of Species by Means of Natural Selection, or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life.*
134. Lenski, R. E. What is adaptation by natural selection? Perspectives of an experimental microbiologist. *PLOS Genet.* **13**, e1006668 (2017).
135. Kawecki, T. J. *et al.* Experimental evolution. *Trends Ecol. Evol.* **27**, 547–560 (2012).
136. Arjan G., J. Diminishing Returns from Mutation Supply Rate in Asexual Populations. *Science* **283**, 404–406 (1999).
137. Halligan, D. L. & Keightley, P. D. Spontaneous Mutation Accumulation Studies in Evolutionary Genetics. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* **40**, 151–172 (2009).

138. Fry, J. D. DETECTING ECOLOGICAL TRADE-OFFS USING SELECTION EXPERIMENTS. *Ecology* **84**, 1672–1678 (2003).
139. Roff, D. A. & Fairbairn, D. J. The evolution of trade-offs: where are we? *J. Evol. Biol.* **20**, 433–447 (2007).
140. Ying, B.-W. *et al.* Evolutionary Consequence of a Trade-Off between Growth and Maintenance along with Ribosomal Damages. *PLOS ONE* **10**, e0135639 (2015).
141. Bennett, A. F. & Lenski, R. E. EVOLUTIONARY ADAPTATION TO TEMPERATURE II. THERMAL NICHE OF EXPERIMENTAL LINES OF *ESCHERICHIA COLI*. *Evolution* **47**, 1–12 (1993).
142. Blount, Z. D., Borland, C. Z. & Lenski, R. E. Historical contingency and the evolution of a key innovation in an experimental population of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 7899–7906 (2008).
143. Leyer, G. J. & Johnson, E. A. Acid adaptation induces cross-protection against environmental stresses in *Salmonella typhimurium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 1842–1847 (1993).
144. Richard E. Lenski, Michael R. Rose, Suzanne C. Simpson & Scott C. Tadler. Long-Term Experimental Evolution in *Escherichia coli*. I. Adaptation and Divergence During 2,000 Generations. *Am. Nat.* **138**, 1315–1341 (1991).
145. Good, B. H., McDonald, M. J., Barrick, J. E., Lenski, R. E. & Desai, M. M. The dynamics of molecular evolution over 60,000 generations. *Nature* **551**, 45–50 (2017).
146. Baym, M. *et al.* Spatiotemporal microbial evolution on antibiotic landscapes. *Science* **353**, 1147–1151 (2016).
147. Weinreich, D. M. Darwinian Evolution Can Follow Only Very Few Mutational Paths to Fitter Proteins. *Science* **312**, 111–114 (2006).
148. Lee, H. H., Molla, M. N., Cantor, C. R. & Collins, J. J. Bacterial charity work leads to population-wide resistance. *Nature* **467**, 82–85 (2010).
149. Spellberg, B. & Shlaes, D. Prioritized current unmet needs for antibacterial therapies. *Clin. Pharmacol. Ther.* **96**, 151–153 (2014).
150. Bush, K. *et al.* Tackling antibiotic resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* **9**, 894–896 (2011).

151. Ling, L. L. *et al.* A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. *Nature* **517**, 455–459 (2015).
152. Bonhoeffer, S., Lipsitch, M. & Levin, B. R. Evaluating treatment protocols to prevent antibiotic resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**, 12106–12111 (1997).
153. Kieran Hand. Tuberculosis - pharmacological management. *Pharm. J.* (2006).
154. Mocroft, A. *et al.* Changing patterns of mortality across Europe in patients infected with HIV-1. *The Lancet* **352**, 1725–1730 (1998).
155. WHO. *WHO guidelines for the treatment of malaria, 2nd edition.* (2010).
156. Ocampo, P. S. *et al.* Antagonism between Bacteriostatic and Bactericidal Antibiotics Is Prevalent. *Antimicrob. Agents Chemother.* **58**, 4573–4582 (2014).
157. Cottarel, G. & Wierzbowski, J. Combination drugs, an emerging option for antibacterial therapy. *Trends Biotechnol.* **25**, 547–555 (2007).
158. Hegreness, M., Shores, N., Damian, D., Hartl, D. & Kishony, R. Accelerated evolution of resistance in multidrug environments. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 13977–13981 (2008).
159. Acar, J. F. ANTIBIOTIC SYNERGY AND ANTAGONISM. *Med. Clin. North Am.* **84**, 1391–1406 (2000).
160. Baym, M., Stone, L. K. & Kishony, R. Multidrug evolutionary strategies to reverse antibiotic resistance. *Science* **351**, aad3292–aad3292 (2016).
161. Cunha, B. A. Therapeutic Implications of Antibacterial Resistance in Community-Acquired Respiratory Tract Infections in Children. *Infection* **32**, 98–108 (2004).
162. Gadamski, G., Ciarka, D., Gressel, J. & Gawronski, S. W. Negative cross-resistance in triazine-resistant biotypes of *Echinochloa crus-galli* and *Conyza canadensis*. *Weed Sci.* **48**, 176–180 (2000).
163. J. Gressel & L. A. Segel. Negative cross-resistance; a possible key to atrazine resistance management: A call for whole plant data. *Z Naturforsch* 470–473 (1990).
164. Hastings, M. D. & Sibley, C. H. Pyrimethamine and WR99210 exert opposing selection on dihydrofolate reductase from *Plasmodium vivax*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 13137–13141 (2002).

165. Lukens, A. K. *et al.* Harnessing evolutionary fitness in *Plasmodium falciparum* for drug discovery and suppressing resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 799–804 (2014).
166. Deeks, S. G. Treatment of antiretroviral-drug-resistant HIV-1 infection. *The Lancet* **362**, 2002–2011 (2003).
167. Elena, S. F. & Lenski, R. E. Evolution experiments with microorganisms: the dynamics and genetic bases of adaptation. *Nat. Rev. Genet.* **4**, 457–469 (2003).
168. Kitagawa, M. *et al.* Complete set of ORF clones of *Escherichia coli* ASKA library (a complete set of *E. coli* K-12 ORF archive): unique resources for biological research. *DNA Res. Int. J. Rapid Publ. Rep. Genes Genomes* **12**, 291–299 (2005).
169. Baba, T. *et al.* Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol. Syst. Biol.* **2**, (2006).
170. Tacconelli, E. *et al.* Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect. Dis.* (2017). doi:10.1016/S1473-3099(17)30753-3
171. Kaper, J. B., Nataro, J. P. & Mobley, H. L. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**, 123–140 (2004).
172. Orlen, H. & Hughes, D. Weak Mutators Can Drive the Evolution of Fluoroquinolone Resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 3454–3456 (2006).
173. Ondov, B. D. *et al.* An alignment algorithm for bisulfite sequencing using the Applied Biosystems SOLiD System. *Bioinformatics* **26**, 1901–1902 (2010).
174. Jin, D. J. & Gross, C. A. Mapping and sequencing of mutations in the *Escherichia coli* *rpoB* gene that lead to rifampicin resistance. *J. Mol. Biol.* **202**, 45–58 (1988).
175. Hall, B. M., Ma, C.-X., Liang, P. & Singh, K. K. Fluctuation Analysis CalculatOR: a web tool for the determination of mutation rate using Luria-Delbruck fluctuation analysis. *Bioinformatics* **25**, 1564–1565 (2009).
176. Warringer, J. & Blomberg, A. Automated screening in environmental arrays allows analysis of quantitative phenotypic profiles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast Chichester Engl.* **20**, 53–67 (2003).
177. Carl Edward Rasmussen & Christopher K. I. Williams. *Gaussian Processes for Machine Learning*. (the MIT Press, 2006).

178. Efron B & Tibshirani R. *An Introduction to the Bootstrap*. (Chapman & Hall, 1994).
179. Steinbeck, C. *et al.* The Chemistry Development Kit (CDK): an open-source Java library for Chemo- and Bioinformatics. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **43**, 493–500 (2003).
180. Girgis, H. S., Hottes, A. K. & Tavazoie, S. Genetic Architecture of Intrinsic Antibiotic Susceptibility. *PLoS ONE* **4**, e5629 (2009).
181. Fehér, T. *et al.* Scarless engineering of the Escherichia coli genome. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **416**, 251–259 (2008).
182. Pósfai, G., Kolisnychenko, V., Berczki, Z. & Blattner, F. R. Markerless gene replacement in Escherichia coli stimulated by a double-strand break in the chromosome. *Nucleic Acids Res.* **27**, 4409–4415 (1999).
183. Wang, H. H. *et al.* Programming cells by multiplex genome engineering and accelerated evolution. *Nature* **460**, 894–898 (2009).
184. Novo, D. J., Perlmutter, N. G., Hunt, R. H. & Shapiro, H. M. Multiparameter flow cytometric analysis of antibiotic effects on membrane potential, membrane permeability, and bacterial counts of Staphylococcus aureus and Micrococcus luteus. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 827–834 (2000).
185. Novo, D., Perlmutter, N. G., Hunt, R. H. & Shapiro, H. M. Accurate flow cytometric membrane potential measurement in bacteria using diethyloxacarbocyanine and a ratiometric technique. *Cytometry* **35**, 55–63 (1999).
186. Coldham, N. G., Webber, M., Woodward, M. J. & Piddock, L. J. V. A 96-well plate fluorescence assay for assessment of cellular permeability and active efflux in Salmonella enterica serovar Typhimurium and Escherichia coli. *J. Antimicrob. Chemother.* **65**, 1655–1663 (2010).
187. Wiegand, I., Hilpert, K. & Hancock, R. E. W. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat. Protoc.* **3**, 163–175 (2008).
188. Marley, E. F., Mohla, C. & Campos, J. M. Evaluation of E-Test for determination of antimicrobial MICs for Pseudomonas aeruginosa isolates from cystic fibrosis patients. *J. Clin. Microbiol.* **33**, 3191–3193 (1995).
189. Nishino, K. & Yamaguchi, A. Analysis of a Complete Library of Putative Drug Transporter Genes in Escherichia coli. *J. Bacteriol.* **183**, 5803–5812 (2001).

190. W G Hale, Venetia A Saunders & J P Margham. *Collins dictionary of biology*. (Collins, 2005).
191. Kohanski, M. A., DePristo, M. A. & Collins, J. J. Sublethal antibiotic treatment leads to multidrug resistance via radical-induced mutagenesis. *Mol. Cell* **37**, 311–320 (2010).
192. Grenier, F., Matteau, D., Baby, V. & Rodrigue, S. Complete Genome Sequence of Escherichia coli BW25113. *Genome Announc.* **2**, (2014).
193. Blattner, F. R. *et al.* The complete genome sequence of Escherichia coli K-12. *Science* **277**, 1453–1462 (1997).
194. Sniegowski, P. D., Gerrish, P. J. & Lenski, R. E. Evolution of high mutation rates in experimental populations of E. coli. *Nature* **387**, 703–705 (1997).
195. Matic, I. *et al.* Highly variable mutation rates in commensal and pathogenic Escherichia coli. *Science* **277**, 1833–1834 (1997).
196. Wiegand, I. *et al.* Mutator genes giving rise to decreased antibiotic susceptibility in Pseudomonas aeruginosa. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 3810–3813 (2008).
197. Denamur, E. Intermediate Mutation Frequencies Favor Evolution of Multidrug Resistance in Escherichia coli. *Genetics* **171**, 825–827 (2005).
198. Schofield, M. J. & Hsieh, P. DNA mismatch repair: molecular mechanisms and biological function. *Annu. Rev. Microbiol.* **57**, 579–608 (2003).
199. Cox, E. C. & Horner, D. L. DNA sequence and coding properties of mutD(dnaQ) a dominant Escherichia coli mutator gene. *J. Mol. Biol.* **190**, 113–117 (1986).
200. Tenaillon, O. *et al.* The molecular diversity of adaptive convergence. *Science* **335**, 457–461 (2012).
201. Lee, H., Popodi, E., Tang, H. & Foster, P. L. Rate and molecular spectrum of spontaneous mutations in the bacterium Escherichia coli as determined by whole-genome sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, E2774–2783 (2012).
202. Bredel, M. & Jacoby, E. Chemogenomics: an emerging strategy for rapid target and drug discovery. *Nat. Rev. Genet.* **5**, 262–275 (2004).
203. Pos, K. M. Drug transport mechanism of the AcrB efflux pump. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* **1794**, 782–793 (2009).

204. Andersson, D. I., Hughes, D. & Kubicek-Sutherland, J. Z. Mechanisms and consequences of bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Drug Resist. Updat. Rev. Comment. Antimicrob. Anticancer Chemother.* **26**, 43–57 (2016).
205. Mattiuzzo, M. *et al.* Role of the Escherichia coli SbmA in the antimicrobial activity of proline-rich peptides. *Mol. Microbiol.* **66**, 151–163 (2007).
206. Munck, C., Gumpert, H. K., Wallin, A. I. N., Wang, H. H. & Sommer, M. O. A. Prediction of resistance development against drug combinations by collateral responses to component drugs. *Sci. Transl. Med.* **6**, 262ra156 (2014).
207. Piddock, L. J. V. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* **19**, 382–402 (2006).
208. Alekshun, M. N. & Levy, S. B. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell* **128**, 1037–1050 (2007).
209. Stephan, J., Mailaender, C., Etienne, G., Daffé, M. & Niederweis, M. Multidrug resistance of a porin deletion mutant of Mycobacterium smegmatis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 4163–4170 (2004).
210. Proctor, R. A. *et al.* Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. *Nat. Rev. Microbiol.* **4**, 295–305 (2006).
211. Cui, L. *et al.* An RpoB mutation confers dual heteroresistance to daptomycin and vancomycin in Staphylococcus aureus. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 5222–5233 (2010).
212. Hansen, S., Lewis, K. & Vulić, M. Role of global regulators and nucleotide metabolism in antibiotic tolerance in Escherichia coli. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 2718–2726 (2008).
213. Nguyen, D. *et al.* Active starvation responses mediate antibiotic tolerance in biofilms and nutrient-limited bacteria. *Science* **334**, 982–986 (2011).
214. Gilbert, P., Collier, P. J. & Brown, M. R. Influence of growth rate on susceptibility to antimicrobial agents: biofilms, cell cycle, dormancy, and stringent response. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**, 1865–1868 (1990).
215. Tkachenko, A. G., Akhova, A. V., Shumkov, M. S. & Nesterova, L. Y. Polyamines reduce oxidative stress in Escherichia coli cells exposed to bactericidal antibiotics. *Res. Microbiol.* **163**, 83–91 (2012).

216. Wang, X. *et al.* Cryptic prophages help bacteria cope with adverse environments. *Nat. Commun.* **1**, 147 (2010).
217. Taber, H. W., Mueller, J. P., Miller, P. F. & Arrow, A. S. Bacterial uptake of aminoglycoside antibiotics. *Microbiol. Rev.* **51**, 439–457 (1987).
218. Bliss, C. I. THE TOXICITY OF POISONS APPLIED JOINTLY¹. *Ann. Appl. Biol.* **26**, 585–615 (1939).
219. Yeh, P., Tschumi, A. I. & Kishony, R. Functional classification of drugs by properties of their pairwise interactions. *Nat. Genet.* **38**, 489–494 (2006).
220. Andersson, D. I. The biological cost of mutational antibiotic resistance: any practical conclusions? *Curr. Opin. Microbiol.* **9**, 461–465 (2006).
221. Andrew R. Leach & V. J. Gillet. *An introduction to chemoinformatics*. (Springer, 2007).
222. Wright, G. D. The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nat. Rev. Microbiol.* **5**, 175–186 (2007).
223. Jansen, G. *et al.* Chemogenomic profiling predicts antifungal synergies. *Mol. Syst. Biol.* **5**, 338 (2009).
224. Piddock, L. J. V. Multidrug-resistance efflux pumps - not just for resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* **4**, 629–636 (2006).
225. Carbon, S. *et al.* AmiGO: online access to ontology and annotation data. *Bioinforma. Oxf. Engl.* **25**, 288–289 (2009).
226. Kohanski, M. A., Dwyer, D. J., Wierzbowski, J., Cottarel, G. & Collins, J. J. Mistranslation of membrane proteins and two-component system activation trigger antibiotic-mediated cell death. *Cell* **135**, 679–690 (2008).
227. Allison, K. R., Brynildsen, M. P. & Collins, J. J. Metabolite-enabled eradication of bacterial persisters by aminoglycosides. *Nature* **473**, 216–220 (2011).
228. Paulsen, I. T., Brown, M. H. & Skurray, R. A. Proton-dependent multidrug efflux systems. *Microbiol. Rev.* **60**, 575–608 (1996).
229. Castañeda-García, A., Do, T. T. & Blázquez, J. The K⁺ uptake regulator TrkA controls membrane potential, pH homeostasis and multidrug susceptibility in *Mycobacterium smegmatis*. *J. Antimicrob. Chemother.* **66**, 1489–1498 (2011).

230. Liu, A. *et al.* Antibiotic sensitivity profiles determined with an Escherichia coli gene knockout collection: generating an antibiotic bar code. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 1393–1403 (2010).
231. Nichols, R. J. *et al.* Phenotypic landscape of a bacterial cell. *Cell* **144**, 143–156 (2011).
232. Morton Klein & Sonia E. Schorr. The role of bacterial resistance in antibiotic synergism and antagonism. *J. Bacteriol.* 454–465 (1952).
233. Webber, M. A. *et al.* Clinically relevant mutant DNA gyrase alters supercoiling, changes the transcriptome, and confers multidrug resistance. *mBio* **4**, (2013).
234. Perichon, B. & Courvalin, P. Synergism between β -Lactams and Glycopeptides against VanA-Type Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus and Heterologous Expression of the vanA Operon. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 3622–3630 (2006).
235. Macvanin, M. & Hughes, D. Hyper-susceptibility of a fusidic acid-resistant mutant of Salmonella to different classes of antibiotics. *FEMS Microbiol. Lett.* **247**, 215–220 (2005).
236. Goulart, C. P. *et al.* Designing Antibiotic Cycling Strategies by Determining and Understanding Local Adaptive Landscapes. *PLoS ONE* **8**, e56040 (2013).
237. Jeong, J. Y. *et al.* Sequential inactivation of rdxA (HP0954) and frxA (HP0642) nitroreductase genes causes moderate and high-level metronidazole resistance in Helicobacter pylori. *J. Bacteriol.* **182**, 5082–5090 (2000).
238. McKeegan, K. S., Borges-Walmsley, M. I. & Walmsley, A. R. Microbial and viral drug resistance mechanisms. *Trends Microbiol.* **10**, S8-14 (2002).
239. Hottes, A. K. *et al.* Bacterial Adaptation through Loss of Function. *PLoS Genet.* **9**, e1003617 (2013).
240. Kapitzky, L. *et al.* Cross-species chemogenomic profiling reveals evolutionarily conserved drug mode of action. *Mol. Syst. Biol.* **6**, (2010).
241. Dragosits, M., Mozhayskiy, V., Quinones-Soto, S., Park, J. & Tagkopoulos, I. Evolutionary potential, cross-stress behavior and the genetic basis of acquired stress resistance in Escherichia coli. *Mol. Syst. Biol.* **9**, 643 (2013).
242. Baker-Austin, C., Wright, M. S., Stepanauskas, R. & McArthur, J. V. Co-selection of antibiotic and metal resistance. *Trends Microbiol.* **14**, 176–182 (2006).

243. Miskinyte, M. *et al.* The Genetic Basis of *Escherichia coli* Pathoadaptation to Macrophages. *PLoS Pathog.* **9**, e1003802 (2013).
244. Pr nting, M. & Andersson, D. I. Mechanisms and physiological effects of protamine resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *J. Antimicrob. Chemother.* **65**, 876–887 (2010).
245. Mine, T., Morita, Y., Kataoka, A., Mizushima, T. & Tsuchiya, T. Expression in *Escherichia coli* of a new multidrug efflux pump, MexXY, from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 415–417 (1999).
246. Norman, A., Hansen, L. H., She, Q. & S rensen, S. J. Nucleotide sequence of pOLA52: a conjugative IncX1 plasmid from *Escherichia coli* which enables biofilm formation and multidrug efflux. *Plasmid* **60**, 59–74 (2008).
247. Cooper, V. S. & Lenski, R. E. The population genetics of ecological specialization in evolving *Escherichia coli* populations. *Nature* **407**, 736–739 (2000).
248. Papp, B., Notebaart, R. A. & P l, C. Systems-biology approaches for predicting genomic evolution. *Nat. Rev. Genet.* **12**, 591–602 (2011).
249. Thompson, M. A. *et al.* Antiretroviral Treatment of Adult HIV Infection: 2012 Recommendations of the International Antiviral Society–USA Panel. *JAMA* **308**, (2012).
250. Gogtay, N., Kannan, S., Thatte, U. M., Oliaro, P. L. & Sinclair, D. Artemisinin-based combination therapy for treating uncomplicated *Plasmodium vivax* malaria. *Cochrane Database Syst. Rev.* (2013). doi:10.1002/14651858.CD008492.pub3
251. Mitchison, D. A. Prevention of drug resistance by combined drug treatment of tuberculosis. *Handb. Exp. Pharmacol.* 87–98 (2012). doi:10.1007/978-3-642-28951-4_6
252. Kim, S., Lieberman, T. D. & Kishony, R. Alternating antibiotic treatments constrain evolutionary paths to multidrug resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 14494–14499 (2014).
253. Moore, R. A. & Hancock, R. E. Involvement of outer membrane of *Pseudomonas cepacia* in aminoglycoside and polymyxin resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **30**, 923–926 (1986).

Saját publikációk jegyzéke

1. A DOKTORI ELJÁRÁS ALAPJÁT KÉPEZŐ 2 DB KÖZLEMÉNY

Lázár V*, Nagy I*, **Spohn R***, Csörgő B, Györkei Á, Nyerges Á, Horváth B, Vörös A, Busa-Fekete R, Hrtyan M, Bogos B, Méhi O, Fekete G, Szappanos B, Kégl B, Papp B, Pál Cs **Genome-wide analysis captures the determinants of the antibiotic cross-resistance interaction network** NATURE COMMUNICATIONS Jul 8;5:4352. (2014) IF: 11.470

* megosztott első szerzők

Lázár V, Pal Singh G, **Spohn R**, Nagy I, Horváth B, Hrtyan M, Busa-Fekete R, Bogos B, Méhi O, Csörgő B, Pósfai Gy, Fekete G, Szappanos B, Kégl B, Papp B, Pál Cs **Bacterial evolution of antibiotic hypersensitivity** MOLECULAR SYSTEMS BIOLOGY Oct 29;9:700. (2013) IF: 14.099

2. REFERÁLT FOLYÓIRATBAN MEGJELENT KÖZLEMÉNYEK

Lázár V*, Nagy I*, **Spohn R***, Csörgő B, Györkei Á, Nyerges Á, Horváth B, Vörös A, Busa-Fekete R, Hrtyan M, Bogos B, Méhi O, Fekete G, Szappanos B, Kégl B, Papp B, Pál Cs **Genome-wide analysis captures the determinants of the antibiotic cross-resistance interaction network** NATURE COMMUNICATIONS Jul 8;5:4352. (2014) IF: 11.470

* megosztott első szerzők

Lázár V, Pal Singh G, **Spohn R**, Nagy I, Horváth B, Hrtyan M, Busa-Fekete R, Bogos B, Méhi O, Csörgő B, Pósfai Gy, Fekete G, Szappanos B, Kégl B, Papp B, Pál Cs **Bacterial evolution of antibiotic hypersensitivity** MOLECULAR SYSTEMS BIOLOGY Oct 29;9:700. (2013) IF: 14.099

Notebaart RA, Szappanos B, Kintsés B, Pál F, Györkei Á, Bogos B, Lázár V, **Spohn R**, Csörgő B, Wagner A, Ruppín E, Pál Cs, Papp B **Network-level architecture and the evolutionary potential of underground metabolism** PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA Aug 12; 111(32): 11762–11767. (2014) IF: 9.674

Lázár V, Martins A, **Spohn R**, Daruka L, Grézal G, Fekete G, Számel M, Jangir PK, Kintsés B, Csörgő B, Nyerges Á, Györkei Á, Kincses A, Dér A, Walter FR, Deli MA, Urbán E, Hegedűs Zs, Olajos G, Méhi O, Bálint B, Nagy I, Martinek TA, Papp B, Pál Cs **Antibiotic-resistant bacteria show widespread collateral sensitivity to antimicrobial peptides** NATURE MICROBIOLOGY May 24; 3(6): 718-731. (2018) IF: NA

Az impakt faktorok összege: 35.243

3. EGYÉB SZAKMAI ANYAGOK – KONFERENCIA RÉSZVÉTEL

Lázár V., Martins A., **Spohn R.**, Daruka L., Fekete G., Grézel G., Csörgő B., Olajos G., Martinek T., Papp B., Pál Cs. **Antibiotic-resistant bacteria show widespread collateral sensitivity to antimicrobial peptides** 7th International Meeting on Antimicrobial Peptides (IMAP), 2017. Augusztus 25.-27. University of Copenhagen, Dánia, *konferencia poszter*

Lázár V., Martins A., **Spohn R.**, Daruka L., Fekete G., Grézel G., Csörgő B., Györkei Á., Kincses A., Hegedűs Zs., Olajos G., Bálint B., Nagy I., Martinek T., Papp B., Pál Cs. **Antibiotic-resistant bacteria show widespread collateral sensitivity to antimicrobial peptides** EMBO/EMBL Symposium, New Approaches and Concepts in Microbiology, 2017. Június 27.-30. Heidelberg, Németország, *konferencia poszter*

Spohn R., Lázár V., Nagy I., Csörgő B., Györkei Á., Nyerges Á., Horváth B., Vörös A., Busa-Fekete R., Hrtyan M., Bogos B., Méhi O., Fekete G., Szappanos B., Kégl B., Papp B., Pál Cs. **Systems-level analysis of the antibiotic cross-resistance network** SMBE Annual Meeting of the Society for Molecular Biology and Evolution, 2015. Július 12.-16. Bécs, Ausztria, *konferencia poszter*

Spohn R., Lázár V., Martins A., Bódi Z., Papp B., Pál Cs. **Bacterial evolution of resistance is limited against certain antimicrobial peptides** Gordon Research Conferences - Antimicrobial Peptides, 2015. Május 3.-8. Lucca (Barga), Olaszország, *konferencia poszter*

Spohn R., Lázár V., Nagy I., Csörgő B., Györkei Á., Nyerges Á., Horváth B., Vörös A., Busa-Fekete R., Hrtyan M., Bogos B., Méhi O., Fekete G., Szappanos B., Kégl B., Papp B., Pál Cs. **Genome-wide analysis captures the determinants of the antibiotic cross-resistance interaction network** EMBO Young Investigator PhD Course, 2014. December 1.-6. Heidelberg, Németország, *konferencia poszter és részvétel a 6 napos tudománykommunikációs kurzuson*

Spohn R., Lázár V., Nagy I., Csörgő B., Györkei Á., Nyerges Á., Horváth B., Vörös A., Busa-Fekete R., Hrtyan M., Bogos B., Méhi O., Fekete G., Szappanos B., Kégl B., Papp B., Pál Cs. **Genome-wide analysis captures the determinants of the antibiotic cross-resistance interaction network** 1st ASM Conference on Experimental Microbial Evolution, 2014. Június 19.-22. Washington DC, Egyesült Államok, *konferencia poszter*

Spohn R., Lázár V., Kintses B., Pál Cs. **Genetic adaptation to a single antibiotic has a large impact on evolvability** EMBO/EMBL Symposium, New Approaches and Concepts in Microbiology, 2013. Október 14.-16. Heidelberg, Németország, *konferencia poszter*

Spohn R., Lázár V., Singh GP., Nagy I., Horváth B., Hrtyan M., Busa-Fekete R., Bogos B., Méhi O., Csörgő B., Pósfai Gy., Fekete G., Szappanos B., Bellay J., Myers C., Sahuquillo-Arce JM., Perpignan H., Kégl B., Papp B., Pál Cs **The network of antibiotic cross-resistance**

interactions is predictable 5th Congress of The Federation of European Microbiological Societies (FEMS), 2013. Július 21.-25. Lipcse, Németország, *konferencia poszter*

Lázár V., Singh GP., **Spohn R.**, Nagy I., Horváth B., Hrtyan M., Busa-Fekete R., Bogos B., Méhi O., Csörgő B., Pósfai G., Fekete G., Szappanos B., Kégl B., Papp B., Pál Cs. **Evolution of antibiotic hypersensitivity** Hungarian Molecular Life Sciences, 2013. Április 5.-7. Siófok, Magyarország, *konferencia előadás*

Összefoglalás

A multidrog rezisztens baktériumok terjedése egyre égetőbb problémát jelent az egészségügy számára napjainkban. A kezelhetetlen multidrog rezisztens fertőzések, melyekkel szemben egyetlen jelenleg alkalmazott antibiotikum sem hatásos, a közeljövőben a vezető halálokok közé kerülhetnek. Ezt a rendkívüli problémát felismerve az Egészségügyi Világszervezet (World Health Organization, WHO) 2017-ben egy olyan prioritási listát adott ki, mely azokat a multidrog rezisztens baktériumokat sorolja fel, melyekre a legsürgetőbb megoldást találni mind az alap kutatás, mind az alkalmazott kutatás, gyógyszerfejlesztés szintjén. Az *Enterobacteriaceae* baktériumokat, melyek közé az általunk vizsgált kólibaktérium is tartozik, a lista legmagasabb prioritású, kritikus csoportjában tüntették fel. Kiemelten fontos tehát megértenünk, miként befolyásolja a kólibaktérium más antibiotikumokkal szembeni érzékenységét a kórokozó alkalmazkodása egy meghatározott antibiotikumhoz. Azáltal ugyanis, hogy a baktérium rezisztenciát szerez, tehát alkalmazkodik egy adott antibiotikumhoz, más antibiotikumokkal szemben is megváltozik érzékenysége, megnőhet rezisztenciája (keresztrezisztencia), vagy akár érzékenyebbé, hiperérzékennyé is válhat (járulékos érzékenység).

A keresztrezisztencia és járulékos érzékenység kialakulásának hátterében álló molekuláris mechanizmusok és általános törvényszerűségek rendszerszintű feltérképezésének céljával nagy áteresztőképességű evolúciós kísérletbe kezdtünk 12 széles körben alkalmazott, változatos hatásmechanizmusokkal rendelkező antibiotikummal szemben. A kólibaktérium az evolúciós kísérlet során a 12 antibiotikum egyikének egyre növekvő koncentrációjával találta szemben magát. A kísérlet során mind a 12 antibiotikummal szemben nagymértékű, klinikai szintű rezisztenciát sikerült elérnünk. A kialakult rezisztencia hátterében álló genetikai módosulásokat újgenerációs teljes genom szekvenálási módszerrel térképeztük fel, majd a rezisztens kólibaktériumok érzékenységét a többi 11, számukra ismeretlen antibiotikummal szemben programozható automatizált laboratóriumi eszközök segítségével derítettük fel. Az érzékenységi szűrés alapján felvázoltuk a kólibaktérium keresztrezisztencia és járulékos érzékenység hálózatát a 12 vizsgált antibiotikumra.

A keresztrezisztencia kapcsolatok hátterében felfedezhető általános törvényszerűségeket vizsgálva azt találtuk, hogy a multidrog rezisztencia kialakulása akár egyetlen alkalmazott antibiotikum mellett is rendkívül gyakori. Az általánosan elterjedt nézettel szemben tehát nem feltétele a multidrog rezisztencia megjelenésének az, hogy a baktérium többféle antibiotikummal is találkozzon. Bemutattuk továbbá, hogy az alkalmazott antibiotikumtól függetlenül az esetek túlynomó részében konvergens molekuláris evolúció figyelhető meg. Az eltérő antibiotikummal szemben megjelenő mutációk konvergenciájához jelentősen hozzájárult, hogy az adaptált vonalak több mint fele a célpont mutációja nélkül ért el nagymértékű rezisztenciát. A megfigyelt mutációk 27%-a ráadásul inaktivációhoz

vezet, ami azt sugallja, hogy az antibiotikum rezisztencia részben új funkciók megjelenése nélkül is elérhető. További érdekesség, hogy rendszeresen jelentek meg adaptív mutációk olyan génekben, melyeket nem lehet ismert antibiotikum rezisztencia mechanizmushoz kötni. Ezek a mutációk túlnyomórészt transzkripciót szabályozó fehérjéket kódoló génekben jelentek meg és feltehetően a stresszválasz útvonalak transzkripciós újrarahuzalozása (re-wiring) által biztosítanak rezisztenciát. Bár a transzkripciót szabályozó fehérjéket kódoló géneket érintő mutációk esetében magától értetődő, hogy széleskörű pleiotróp hatásokra számíthatunk, azonban a pleiotróp hatások közel sem korlátozódtak a mutációt hordozó gének ezen csoportjára. Az egyik legmegdöbbentőbb példánk, hogy még a fluorokinolonok célpontjának, a DNS giráznak egy bizonyos kanonikus mutációja is jelentősen befolyásolta a baktérium érzékenységét számos nem-fluorokinolon antibiotikummal szemben. Ezen eredményeink is alátámasztják tehát, hogy a multidrog rezisztencia terjedésének megfékezése igen összetett feladat, s az egyik legalapvetőbb lépés az antibiotikumok felelős használatának szigorú szabályozása lenne.

A már széleskörben elterjedt multidrog rezisztens baktériumok megfékezésére és az új rezisztencia mechanizmusok megjelenésének megakadályozására jelenthet megoldást a járulékos érzékenység általános törvényszerűségeinek feltérképezése és a jelenség kiaknázása a klinikumban. Az általunk felvázolt járulékos érzékenység hálózatból látható, hogy a járulékos érzékenység a keresztrezisztenciához hasonlóan igen elterjedt jelenség. A hálózatból kiemelkednek az aminoglikozid antibiotikumok, melyek bármelyikéhez alkalmazkodva a baktérium szinte az összes többi antibiotikummal szemben hiperérzékennyé vált. Az aminoglikozid-adaptált vonalakban vonalanként átlagosan 11,4 mutációt azonosítottunk, míg a többi antibiotikummal szemben vonalanként átlagosan 5,65 mutáció jelent meg. Az aminoglikozidokkal szemben tehát sokkal összetettebb mechanizmusok szükségesek az adaptációhoz, többek között szükségesnek bizonyult a membránpotenciál csökkenésének elérése változatos mutációk kombinációja által. Feltételezésünk szerint a membránpotenciál csökkenése jelentősen hozzájárul a megfigyelt járulékos érzékenység kialakulásához azáltal, hogy ellehetetleníti a membránpotenciál-függő fő multidrog efflux pumpák, például az AcrAB efflux pumpa működését. Az aminoglikozid-adaptált vonalak járulékos érzékenységének hátterében azonosított evolúciós csereviszony (trade-off) tehát azon alapul, hogy a baktérium nem képes a membránpotenciálját mind az aminoglikozidokkal, mind a nem-aminoglikozid antibiotikumokkal szemben egyaránt optimalizálni, hiszen míg az aminoglikozid rezisztencia alacsony membránpotenciált, a nem-aminoglikozid antibiotikumokkal szembeni rezisztencia magas membránpotenciált igényel. Az általunk részletesen feltárt, az aminoglikozid és nem-aminoglikozid antibiotikum közötti járulékos érzékenység mechanizmusa az egyike az elsőként leírt járulékos érzékenységi kölcsönhatásoknak. Bár a járulékos érzékenység egy igen ígéretes alapja lehet a kombinációs terápiás stratégiák fejlesztésének, az erre épülő stratégiák kidolgozását nagyban gátolja az ismert kétirányú, azaz reciprok járulékos érzékenységet mutató antibiotikum párok elenyésző száma.

Kiemelten fontos eredményünk továbbá az új, antibiotikum kombinációs terápiák fejlesztése szempontjából, hogy nem találtunk összefüggést a fiziológiás és evolúciós kölcsönhatások között. Ahhoz, hogy a kombinációs terápia, tehát két vagy több antibiotikum együttes alkalmazása sikeres legyen, számos feltételnek kell teljesülnie, többek között megfelelő fiziológiás és evolúciós kölcsönhatást kell mutatniuk a kombinációban alkalmazott szereknek. A megfelelő fiziológiás kölcsönhatás azért fontos, mert abban az esetben, ha a kombinációban alkalmazott antibiotikumok felerősítik egymás egyedi hatását, tehát szinergizmust mutatnak, a kezelés hatékonysága jelentősen megnő, miközben az alkalmazott dózis csökkenthető, s ezáltal a mellékhatások is mérsékelhetőek. Az evolúciós kölcsönhatásoknak eközben a kombináció hosszútávú alkalmazhatóságában van szerepe: az erős, reciprok keresztrezisztenciát mutató antibiotikumok együttes alkalmazása ugyanis kimondottan a multidrog rezisztencia gyors megjelenésére szelektál, míg a reciprok járulékos érzékenység minimalizálhatja a rezisztencia megjelenésének valószínűségét. A járulékos érzékenység esetében ugyanis a kombinációban alkalmazott antibiotikumok egyikével szemben rendelkezésre álló rezisztencia mutációk többsége hiperérzékenységet okoz a másik antibiotikummal szemben és fordítva, így ezen rezisztencia mutációk a két antibiotikum együttes alkalmazása során összességében olyan mértékű fitness hátrányt okoznak a baktérium számára, amely akadályozza az elterjedésüket a populációban. Mivel a fiziológiás és evolúciós kölcsönhatások között nem találtunk összefüggést, így rendkívül fontos, hogy az új kombinációs terápiák alkalmazhatóságának vizsgálata kitérjen mind a fiziológiás, mind az evolúciós kölcsönhatások vizsgálatára, hiszen mindkét kölcsönhatás jelentősen befolyásolja az antibiotikum kombinációs terápiás alkalmazásának hosszútávú sikerét.

Summary

The spread of multidrug-resistant pathogenic bacteria is an increasingly urgent public health threat. The untreatable multidrug-resistant infections that are not sensitive to any of the currently available antibiotics could soon become one of the leading causes of death. In response to the increasing threat the World Health Organization (WHO) published a priority list in 2017 containing those multidrug-resistant bacteria to which it is crucial to quickly find a solution in basic and applied research as well as in pharmaceutical development. The *Enterobacteriaceae*, including *Escherichia coli* (our model organism) belongs to the highest priority group of the WHO list entitled „Priority 1: CRITICAL“. Thus it would be crucial to understand how sensitivity of *Escherichia coli* to different antibiotics changes when acquiring resistance to a given antibiotic. Specifically, when bacteria acquire resistance to a single antibiotic, susceptibility to other antibiotics is changing as well. Susceptibility can either decrease to other antibiotics simultaneously, leading to multidrug-resistance (or cross-resistance) or susceptibility can also increase, leading to hypersensitivity (or collateral sensitivity).

In order to systematically investigate the molecular mechanisms and general patterns behind the emergence of cross-resistance and collateral sensitivity, we started a high-throughput evolutionary experiment towards 12 widely employed, conventional antibiotics with diverse modes of action. During the evolutionary experiment, parallel populations of *Escherichia coli* were facing increasing concentrations of one of the 12 antibiotics. By the end of the experiment we could reach a very high, clinically significant level of resistance for all of the 12 antibiotics applied. Next, we investigated the genetic background of resistance by a next-generation whole-genome sequencing protocol. The susceptibility of all adapted lines was measured towards those 11 antibiotics which were not encountered by the line beforehand by applying a programmable liquid handling robotic system. Based on this susceptibility screen we were able to draw the map of cross-resistance and collateral sensitivity interactions of *Escherichia coli* between the 12 antibiotics.

While investigating the general patterns behind cross-resistance interactions, we found that even adaptation to a single antibiotic can frequently lead to multidrug resistance. Thus contrarily to the common belief, encountering several antibiotics is not a criterion for the development of multidrug resistance. In addition, we often found convergent molecular evolution independently of the antibiotic applied. This result is less surprising if we consider that more than 50% of the adapted lines reached high level of resistance without acquiring a mutation in the target gene of the antibiotic. Moreover, 27% of the observed mutations led to putative inactivation, which suggests that antibiotic resistance could be partially established without acquiring novel functions. A further interesting result is that we repeatedly found mutations in genes unrelated to known resistance mechanisms. These mutations are mostly found in genes encoding transcriptional regulators and presumably provide resistance through the transcriptional re-wiring of

stress response pathways. Although widespread pleiotropic effects are evident in case of mutations in genes coding for transcriptional regulators, pleiotropic effects were not restricted to mutations in these genes. A striking finding of ours is that a canonic mutation of the gene encoding DNA gyrase, that is the target of fluoroquinolone antibiotics, influenced the susceptibility of *E coli* to many non-fluoroquinolone antibiotics as well. These results support that restraining the spread of multidrug resistance is a very complex task and thus the basic step would be the strict regulation and responsible management of antibiotics.

Understanding the general patterns of collateral sensitivity and exploiting this knowledge in the clinics could help our fight to stop the spread of multidrug-resistant bacteria as well as to prevent the rise of new resistance mechanisms. Our networks of evolutionary interactions suggest that collateral sensitivity is almost as frequent as cross-resistance. From the network of collateral sensitivity, lines resistant to aminoglycosides stand out. Adaptation to any of the aminoglycosides caused collateral sensitivity towards almost all other antibiotics tested. We identified an average of 11.4 mutations per line in aminoglycoside-adapted lines, while an average of 5.65 mutations per line were seen in bacteria adapted to non-aminoglycoside antibiotics. These results suggest that adaptation to aminoglycosides requires more complex resistance mechanisms, such as lowering the membrane potential through the combination of a variety of mutations. We assume that lowering the membrane potential significantly contribute to the observed collateral sensitivity interactions by inhibiting the activity of the membrane potential dependent major multidrug efflux pumps, like that of the AcrAB efflux pump. To summarize, the evolutionary trade-off behind collateral sensitivity relies on the fact that bacteria cannot optimize their membrane potential for both aminoglycoside and non-aminoglycoside antibiotics, as while aminoglycoside resistance requires low membrane potential, resistance to non-aminoglycoside antibiotics requires high membrane potential. This mechanism of collateral sensitivity between aminoglycoside and non-aminoglycoside antibiotics is the first collateral sensitivity mechanism that is described in details. Although collateral sensitivity could be a promising basis for the development of combination therapy strategies, the elaboration of these strategies is impeded by the limited number of antibiotic pairs known to show reciprocal collateral sensitivity.

From the point of view of the development of novel antibiotic combination therapies another important aspect of our work is that we did not see any correlation between the physiological and evolutionary interactions. Therefore, to assure the efficiency of a combination of two or more antibiotics; both physiological and evolutionary interactions should be optimal. The optimal physiological interaction is synergism, when the two or more antibiotics applied simultaneously strengthen each other's individual effect, thus increasing the efficiency of the treatment, while decreasing the dose applied and therefore moderating the side-effects. Meanwhile, evolutionary interactions play a key role in the long-term applicability of combinations: simultaneous application of antibiotics

showing strong cross-resistance clearly selects for the fast evolution of multidrug resistance. On the other hand, reciprocal collateral sensitivity can minimize the chances of resistance evolution. When a combination of antibiotics showing reciprocal collateral sensitivity is applied, most resistance mutations available for one of the antibiotics cause hypersensitivity to the other and vice versa, and therefore most resistance mutations have such high fitness cost for the bacteria in the presence of the combination that prevents the spread of these mutations in the population. Due to the fact that we did not find any correlations between the physiological and evolutionary interactions and both kinds of interactions are of key importance for the applicability of a novel combination therapy, it is a must to investigate both of these interactions before deciding on the application of a novel combination therapy.

Függelék

1. függelék. Egyoldalú p-értékek a járulékos érzékenység kapcsolatokra. A táblázatban szereplő, bootstrap elemzésből származó p-értékek azt jelölik, hogy az adott antibiotikumra adaptáltatott 10 párhuzamos törzs egy csoportként szignifikánsabban rosszabbul nőtt-e a tesztelt antibiotikum jelenlétében, mint a 10 adaptált kontroll törzs. A nagy áteresztőképességű antibiotikum érzékenységi szűrés független kísérleti futásokból származó eredményeinek p-értékeit antibiotikumonként Fisher-féle kombinált teszttel (Fisher's combined probability test) egyesítettük.

	Az érzékenységi szűrésben tesztelt antibiotikum											
Az evolúcióban szereplő antibiotikum	AMP	CHL	CPR	DOX	ERY	FOX	KAN	NAL	NIT	TET	TOB	TRM
AMP	0.997	0.695	1.000	0.251	0.676	0.999	0.000	0.847	0.001	0.825	0.000	0.853
CHL	0.901	0.962	0.991	0.984	0.678	0.799	0.404	0.966	0.000	0.964	0.056	0.925
CPR	0.926	0.234	0.709	0.943	0.690	1.000	0.003	0.759	0.000	0.699	0.003	0.511
DOX	1.000	1.000	1.000	0.845	1.000	1.000	0.002	1.000	0.000	0.999	0.000	1.000
ERY	0.617	0.707	0.585	0.950	1.000	0.706	0.595	0.931	0.001	0.672	0.644	0.969
FOX	0.994	0.957	0.983	0.999	0.878	0.987	0.022	0.998	0.041	0.997	0.118	1.000
KAN	0.010	0.000	0.000	0.000	0.014	0.000	0.505	0.000	0.000	0.000	0.219	0.016
NAL	0.975	0.965	1.000	1.000	1.000	0.995	0.519	0.999	0.095	0.996	0.678	0.742
NIT	0.661	0.701	0.998	0.170	0.437	0.999	0.006	0.990	0.429	0.644	0.000	0.674
TET	0.839	0.836	0.647	0.999	0.630	0.993	0.594	0.777	0.000	0.976	0.002	1.000
TOB	0.104	0.000	0.000	0.000	0.002	0.001	0.498	0.000	0.000	0.000	0.145	0.012
TRM	0.628	0.704	0.793	0.952	0.898	0.969	0.580	0.964	0.000	0.747	0.004	1.000

2. függelék. A relatív fitness különbségek (RF) az adaptált kontroll törzsek és az antibiotikum-rezisztens törzsek között az egyes antibiotikumok jelenlétében. A negatív értékek járulékos érzékenységet jeleznek.

	Az érzékenységi szűrésben tesztelt antibiotikum												
Törzsek	DOX	TET	KAN	CHL	CPR	AMP	NIT	ERY	NAL	FOX	TOB	TRM	Antibiotikum-mentes
TOB_1	-0.39	-0.34	0.27	-0.80	-0.03	0.49	-1.02	-0.26	-0.25	0.34	NA	-0.79	-0.28
TOB_2	-0.99	-1.05	-0.23	-0.91	-0.76	-0.41	-1.07	-0.78	-1.07	-0.28	NA	-1.01	-0.60
TOB_3	-0.91	-1.01	-0.19	-0.91	-0.78	-0.35	-1.06	-0.88	-1.05	-0.25	NA	-1.04	-0.59
TOB_4	-1.10	-1.11	0.04	-0.91	-0.85	-0.88	-1.07	-1.01	-1.06	-0.89	NA	-1.09	-0.61
TOB_5	-0.41	-0.95	-0.20	-0.84	-0.70	0.13	-1.08	-0.96	-0.83	-0.35	NA	-1.13	-0.64
TOB_6	-0.58	-0.87	-0.21	-0.95	-0.81	-0.90	-1.02	-0.60	-0.74	-0.82	NA	-1.02	-0.62
TOB_7	-0.90	-0.94	-0.25	-0.99	-0.88	-1.10	-1.00	-0.46	-0.87	-1.00	NA	-0.98	-0.54
TOB_8	-0.91	-0.97	0.07	-0.90	-0.81	-1.07	-0.96	-0.49	-0.87	-0.99	NA	-0.88	-0.46
TOB_9	-0.80	-0.86	-0.66	-1.01	-0.79	-1.03	-0.93	-0.60	-0.74	-0.97	NA	-0.85	-0.58
TOB_10	-0.65	-0.85	-0.48	-1.01	-0.56	-0.90	-0.92	-0.51	-0.77	-0.75	NA	-0.79	-0.60
KAN_1	-0.53	-0.71	NA	-0.93	-0.84	-0.76	-1.02	-0.58	-0.85	-0.61	-0.22	-1.01	-0.57
KAN_2	-0.78	-1.00	NA	-1.01	-0.71	-1.01	-0.97	-0.43	-0.79	-0.98	-0.31	-0.87	-0.53
KAN_3	-0.02	-0.57	NA	-1.03	-0.22	0.11	-0.97	-0.48	-0.39	-0.25	-0.19	-0.63	-0.51
KAN_6	-0.77	-0.87	NA	-0.85	-0.43	-0.70	-0.90	-0.77	-0.74	-0.59	-0.74	-0.95	-0.48
KAN_7	-0.83	-0.84	NA	-0.83	-0.42	-0.95	-0.93	-0.69	-0.70	-0.79	-0.65	-0.96	-0.48
KAN_8	-0.90	-0.91	NA	-0.88	-0.65	-1.00	-0.97	-0.73	-0.72	-0.82	-0.62	-0.99	-0.64
KAN_9	-0.91	-0.93	NA	-0.86	-0.78	-1.01	-0.98	-0.76	-0.75	-0.81	-0.28	-0.92	-0.55
KAN_10	-0.74	-0.86	NA	-0.98	-0.65	-0.85	-0.98	-0.46	-0.59	-0.83	-0.19	-0.95	-0.58
KAN_4	-0.85	-0.92	NA	-1.02	-0.92	-1.13	-0.97	-0.41	-0.85	-1.07	-0.20	-0.93	-0.51
KAN_5	-0.57	-0.61	NA	-0.99	-0.48	-0.08	-0.92	-0.36	-0.78	-0.07	-0.18	-0.80	-0.48
CPR_1	0.42	0.00	-0.73	-0.03	NA	0.33	-0.35	0.03	0.25	0.48	-1.30	-0.48	-0.26
CPR_2	0.22	-0.15	-0.91	-0.29	NA	0.30	-0.44	-0.95	0.03	0.35	-1.29	-0.77	-0.38
CPR_3	0.54	0.34	-0.76	0.24	NA	0.55	-0.21	0.15	0.27	0.61	-0.99	0.59	-0.34
CPR_4	0.28	0.25	-0.72	0.12	NA	0.47	-0.41	0.33	0.13	0.49	-0.90	0.23	-0.11
CPR_5	-0.35	-0.37	-0.79	-0.32	NA	-0.05	-0.90	-0.42	-0.09	0.27	-0.80	-0.15	-0.53
CPR_6	0.48	0.08	-0.32	-0.11	NA	0.48	-0.38	0.38	0.35	0.55	-0.17	0.01	-0.09
CPR_7	0.27	0.17	-0.97	-0.20	NA	0.33	-0.33	0.19	0.22	0.43	-0.69	-0.15	-0.23
CPR_8	-0.28	-0.12	-1.12	-0.84	NA	-0.51	-0.67	0.07	-0.03	-0.43	-0.83	-0.09	-0.38
CPR_9	0.38	0.28	-1.03	0.09	NA	0.45	-0.08	0.32	0.31	0.51	-0.65	0.21	-0.14
CPR_10	0.32	0.06	-0.75	-0.13	NA	0.39	-0.37	-0.28	0.21	0.45	-1.10	-0.56	-0.30
ERY_1	0.38	0.59	-0.89	0.23	0.47	0.34	-0.64	NA	0.38	0.24	-0.78	0.45	0.01
ERY_2	0.61	0.62	0.33	0.43	0.24	0.49	-0.29	NA	0.53	0.49	0.22	0.71	-0.02
ERY_3	0.19	-0.48	-0.67	-0.64	-0.10	-0.43	-0.36	NA	0.24	-0.86	-0.63	0.30	-0.17
ERY_4	0.49	-0.57	-0.01	-0.12	-0.26	-0.43	-0.37	NA	0.10	-0.66	0.21	0.27	-0.12
ERY_5	0.45	-0.20	-0.59	-0.42	0.37	-0.35	-0.29	NA	0.47	-0.86	-0.68	-0.07	-0.07
ERY_6	0.62	0.49	0.35	0.23	0.45	0.48	-0.63	NA	0.54	0.46	0.14	0.67	-0.15
ERY_7	0.29	-0.11	-0.09	-0.27	0.16	-0.31	-0.50	NA	0.44	0.12	-0.24	-0.92	-0.11
ERY_8	0.52	0.54	0.40	0.21	0.46	0.51	-0.01	NA	0.53	0.32	0.38	0.65	-0.11
ERY_9	-0.53	-0.27	0.04	-0.64	0.37	-0.64	-0.66	NA	-0.25	-0.51	-0.12	-0.15	-0.11
ERY_10	-0.32	-0.37	-0.08	-0.42	-0.54	-0.82	-0.80	NA	-0.55	-0.28	-0.33	-0.60	-0.13
TRM_1	-0.18	0.09	-1.02	-0.26	-0.48	-0.34	-0.75	-0.83	0.23	0.37	-0.93	NA	-0.20
TRM_2	0.57	0.48	-0.09	0.01	0.48	0.35	-0.10	0.61	0.40	0.24	-0.32	NA	-0.06
TRM_3	0.24	-0.36	0.02	-0.50	0.23	0.22	-0.46	-0.13	0.40	0.25	-0.29	NA	-0.24

	Az érzékenységi szűrésben tesztelt antibiotikum												
Törzsek	DOX	TET	KAN	CHL	CPR	AMP	NIT	ERY	NAL	FOX	TOB	TRM	Antibiotikum- mentes
TRM_6	0.61	0.25	0.08	0.10	0.35	0.50	-0.47	0.44	0.49	0.39	-0.34	NA	0.10
TRM_7	0.19	-0.57	0.35	-0.09	-0.35	0.43	-0.94	-0.57	0.53	0.38	-0.18	NA	0.04
TRM_8	0.47	0.51	0.01	0.32	0.56	0.09	-0.17	0.64	0.53	0.10	-0.72	NA	0.20
TRM_9	0.39	0.56	-0.60	0.27	0.55	0.05	-0.57	0.69	0.33	0.43	-0.84	NA	0.02
TRM_10	0.52	0.38	0.12	0.11	0.35	0.34	-0.22	0.54	0.49	0.47	-0.57	NA	0.11
TRM_4	-0.83	-0.03	-0.01	-0.37	-0.06	-0.18	-0.34	-0.09	0.26	0.16	-0.45	NA	-0.18
TRM_5	0.41	0.53	-0.08	-0.05	0.55	-1.19	-0.41	0.63	0.47	0.09	-0.18	NA	-0.35
TET_1	0.54	NA	-0.78	0.09	0.33	0.47	-0.50	0.47	0.49	0.34	-0.73	0.44	-0.22
TET_2	0.55	NA	-0.40	0.15	0.30	0.45	-0.75	0.41	0.41	0.37	-0.61	0.52	-0.07
TET_3	0.53	NA	-0.01	0.15	0.23	0.29	-0.71	0.27	0.36	0.44	-0.32	0.51	-0.30
TET_4	0.09	NA	0.07	0.01	0.42	0.29	-0.06	-1.41	-0.73	0.38	-0.30	-0.16	-0.04
TET_5	0.48	NA	-0.54	0.07	0.22	0.23	-0.60	0.25	0.27	0.28	-0.62	0.34	-0.01
TET_6	0.44	NA	-0.12	-0.03	0.13	0.24	-0.64	0.23	0.15	0.28	-0.45	0.60	-0.06
TET_7	0.58	NA	-0.06	0.21	0.24	0.38	-0.56	0.46	0.36	0.40	-0.33	0.58	-0.16
TET_8	0.48	NA	-0.20	0.15	0.34	0.38	-0.69	0.47	0.33	0.36	-0.39	0.61	-0.11
TET_9	0.25	NA	-0.32	0.18	0.40	0.24	-0.58	-0.79	-0.68	0.41	-0.73	0.56	-0.13
TET_10	0.14	NA	-0.19	-0.16	0.02	-0.17	-0.91	-0.50	-0.55	-0.01	-0.73	-0.52	0.13
DOX_1	NA	0.52	-0.27	0.48	0.72	0.59	-0.68	0.46	0.59	0.54	-0.96	0.66	-0.04
DOX_2	NA	0.47	-0.25	0.41	0.71	0.54	-0.61	0.43	0.55	0.53	-0.90	0.63	-0.25
DOX_3	NA	0.41	-0.59	0.33	0.66	0.48	-0.79	0.42	0.41	0.40	-0.96	0.61	-0.11
DOX_4	NA	0.55	-0.75	0.43	0.70	0.58	-0.89	0.42	0.56	0.49	-0.96	0.63	-0.06
DOX_5	NA	0.45	-0.84	0.47	0.74	0.57	-0.65	0.41	0.50	0.46	-0.95	0.59	-0.17
DOX_6	NA	0.41	-0.71	0.46	0.70	0.48	-0.83	0.40	0.44	0.53	-0.87	0.66	-0.04
DOX_7	NA	0.44	-0.54	0.52	0.65	0.52	-0.94	0.32	0.48	0.52	-0.88	0.68	-0.05
DOX_8	NA	0.31	-0.87	0.35	0.65	0.41	-0.68	0.32	0.35	0.48	-0.90	0.63	-0.11
DOX_9	NA	0.42	-0.69	0.40	0.66	0.53	-0.94	0.44	0.44	0.55	-0.96	0.55	-0.37
DOX_10	NA	0.45	-0.45	0.37	0.55	0.47	-0.93	0.37	0.34	0.52	-0.70	0.71	-0.47
NIT_1	-0.66	-0.56	-1.07	-0.43	0.45	-0.51	NA	-0.66	-0.05	0.20	-1.03	-0.91	-0.59
NIT_2	0.06	0.35	0.09	0.00	0.73	0.05	NA	0.26	0.54	0.47	-0.79	-0.17	-0.10
NIT_3	-0.72	-0.07	-0.98	-0.32	0.75	-0.64	NA	-0.87	0.52	0.60	-0.98	-0.49	0.02
NIT_6	0.35	0.42	-0.07	-0.44	0.71	0.57	NA	0.25	0.51	0.57	-0.59	0.63	0.18
NIT_7	-0.25	0.02	0.04	-0.11	0.71	0.61	NA	0.43	0.59	0.68	-0.26	0.59	0.09
NIT_8	-0.59	-0.29	-0.57	-0.55	0.23	0.08	NA	-0.37	0.41	0.45	-0.86	-0.13	-0.25
NIT_9	-1.00	-0.46	-0.71	-0.57	-1.27	-1.09	NA	-0.95	0.47	0.58	-0.90	-0.15	-0.17
NIT_10	-0.53	-0.15	-0.96	0.10	0.40	0.22	NA	-0.11	0.11	0.47	-0.96	-0.23	-0.51
NIT_4	0.13	0.28	-0.81	0.24	0.70	0.45	NA	0.06	0.42	0.56	-0.91	0.57	-0.05
NIT_5	-1.05	-0.49	-0.91	-0.73	0.39	0.23	NA	-0.44	0.02	0.30	-0.95	-0.47	-0.25
AMP_1	-0.24	0.25	-0.81	-0.19	0.60	NA	-0.19	-0.09	0.29	0.48	-1.02	0.27	-0.10
AMP_2	-0.06	0.15	-0.91	-0.27	0.60	NA	-0.32	-0.35	0.29	0.44	-0.99	0.20	-0.06
AMP_3	-0.02	0.18	-0.99	-0.19	0.54	NA	-0.44	-0.39	0.29	0.48	-0.98	0.24	-0.17
AMP_4	-0.10	0.06	-0.71	-0.09	0.42	NA	-0.62	0.00	0.04	0.22	-0.76	0.27	-0.60
AMP_5	0.04	0.09	-0.42	0.10	0.48	NA	-0.85	-0.11	0.16	0.23	-0.76	0.29	-0.44
AMP_6	0.28	0.23	-0.50	0.30	0.67	NA	-0.57	0.24	0.39	0.56	-0.83	0.42	-0.02
AMP_7	0.32	0.37	0.08	0.32	0.73	NA	0.08	0.32	0.55	0.67	-0.17	0.35	0.04
AMP_8	-0.50	0.19	-1.07	0.04	0.62	NA	-0.35	-0.24	0.11	0.47	-0.97	0.48	-0.14
AMP_9	0.21	0.18	-1.10	0.16	0.56	NA	-0.36	0.18	0.19	0.44	-0.92	0.63	-0.17
AMP_10	-0.13	0.06	-0.96	-0.21	0.41	NA	-0.53	-0.19	0.15	0.38	-0.96	0.25	-0.29
CHL_1	0.19	0.52	-0.87	NA	0.50	0.45	-1.03	-0.29	0.39	0.10	-1.04	0.14	-0.21
CHL_2	0.39	0.60	0.40	NA	0.63	0.65	-0.98	0.00	0.54	0.39	-0.11	0.38	-0.33

	Az érzékenységi szűrésben tesztelt antibiotikum												
Törzsek	DOX	TET	KAN	CHL	CPR	AMP	NIT	ERY	NAL	FOX	TOB	TRM	Antibiotikum- mentes
CHL_3	0.55	0.62	-0.03	NA	0.67	0.65	-0.27	-0.07	0.62	0.39	-0.33	0.56	0.06
CHL_4	0.23	0.45	-0.98	NA	0.53	0.53	-1.04	-0.28	0.41	-0.04	-0.99	0.24	-0.31
CHL_5	0.52	0.64	-0.47	NA	0.59	0.56	-0.97	0.14	0.62	0.03	-0.60	-0.35	-0.34
CHL_6	0.09	0.13	-0.92	NA	-0.13	0.42	-0.56	-0.17	0.19	-0.03	-0.85	-0.07	-0.17
CHL_7	0.57	0.50	0.45	NA	0.38	0.62	-0.52	0.13	0.55	0.40	0.26	0.59	0.09
CHL_8	0.04	0.30	-0.84	NA	0.36	0.43	-0.64	-0.08	0.33	0.17	-0.82	0.24	-0.21
CHL_9	0.55	0.50	0.37	NA	0.48	0.58	-0.08	0.15	0.58	0.38	0.09	0.57	0.05
CHL_10	-0.10	0.19	-0.94	NA	-0.14	0.13	-0.45	-0.09	0.24	-0.09	-0.91	0.18	-0.27
FOX_1	0.72	0.73	-0.05	0.63	0.45	0.75	-0.04	0.42	0.71	0.56	0.28	0.67	0.40
FOX_2	0.47	0.53	-0.99	0.47	0.58	0.74	0.26	0.34	0.70	0.47	-0.65	0.50	0.34
FOX_3	0.37	0.41	-0.81	-0.08	0.24	0.37	-0.50	-0.30	0.36	0.10	-0.71	0.23	-0.33
FOX_6	0.42	0.66	-0.80	0.53	0.64	0.80	0.17	0.37	0.65	0.52	-0.69	0.66	0.37
FOX_7	0.58	0.66	-0.58	0.53	0.64	0.77	-0.07	0.46	0.65	0.50	-0.54	0.56	0.20
FOX_8	-0.27	0.52	-0.47	0.33	0.44	0.61	-0.52	0.12	0.57	0.36	-0.30	0.52	0.21
FOX_9	0.30	0.22	-0.73	-0.10	0.17	0.54	-0.40	0.01	0.42	0.17	-0.87	0.26	-0.09
FOX_10	0.60	0.46	-0.53	0.36	0.25	0.58	-0.37	0.09	0.53	0.27	-0.58	0.59	0.17
FOX_4	-0.32	0.35	-0.37	0.12	0.20	0.56	-0.25	0.07	0.44	0.20	-0.64	0.17	0.06
FOX_5	0.54	0.43	-0.65	0.45	0.33	0.67	-0.21	0.16	0.57	0.27	-0.25	0.55	0.23
NAL_1	0.34	-0.08	-0.16	0.29	0.72	0.66	-0.25	0.47	NA	0.26	0.11	-0.67	0.12
NAL_2	0.18	0.22	-0.26	-0.06	0.73	0.41	-0.13	0.46	NA	0.04	-0.33	-0.24	0.18
NAL_3	0.64	0.69	0.32	0.57	0.64	0.71	-0.14	0.44	NA	0.41	0.41	0.28	0.30
NAL_4	0.56	0.76	-0.83	0.31	0.60	0.59	-0.53	0.47	NA	0.36	-0.81	0.19	0.09
NAL_5	-0.27	-0.15	-0.03	0.09	0.72	-0.08	-0.12	0.18	NA	0.04	-0.06	-0.25	-0.03
NAL_6	0.65	0.63	-0.96	0.55	0.64	0.70	0.02	0.52	NA	0.51	-0.62	0.51	0.38
NAL_7	0.66	0.72	-0.78	0.63	0.70	0.72	-0.27	0.60	NA	0.56	-0.21	-0.36	0.40
NAL_8	0.51	0.69	-0.13	0.46	0.65	0.75	-0.11	0.43	NA	0.50	-0.29	0.52	0.24
NAL_9	0.50	0.61	-0.66	0.45	0.47	0.60	-0.64	0.31	NA	0.34	-0.72	0.50	0.13
NAL_10	0.64	0.59	0.28	0.48	0.65	0.65	0.04	0.44	NA	-0.17	0.10	0.25	0.35

3. függelék. Azon FDR korrekciót követő p-értékek, melyek azt jelölik, hogy a 2. függelékben szereplő relatív fitness különbségek (RF) alacsonyabbak-e az antibiotikumot tartalmazó környezetben, mint az antibiotikummentes környezetben, tehát valódi járulékos érzékenységről beszélünk-e és nem csupán általános fitness költségről. Ezt a tesztet csak azokra az esetekre végeztük el, ahol az 1. függelékben szignifikáns eltérést mutattak.

	Az érzékenységi szűrésben tesztelt antibiotikum											
Az evolúcióban szereplő antibiotikum	AMP	CHL	CPR	DOX	ERY	FOX	KAN	NAL	NIT	TET	TOB	TRM
AMP	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0.003	NA	0.022	NA	0.000	NA
CHL	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0.001	NA	NA	NA
CPR	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0.000	NA	0.107	NA	0.001	NA
DOX	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0.000	NA	0.000	NA	0.000	NA
ERY	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0.001	NA	NA	NA
FOX	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0.000	NA	NA	NA	NA	NA
KAN	0.015	0.000	0.192	0.006	0.456	0.022	NA	0.002	0.000	0.000	NA	0.000
NAL	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
NIT	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0.030	NA	NA	NA	0.000	NA
TET	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0.000	NA	0.000	NA
TOB	NA	0.000	0.008	0.030	0.272	0.230	NA	0.001	0.000	0.001	NA	0.000
TRM	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0.002	NA	0.001	NA

4. függelék. A keresztrezisztencia kapcsolatok validálásának eredménye E-teszt csíkokkal végzett MIC mérésekkel. A relatív MIC értékeket az adott antibiotikum-rezisztens törzs MIC értékét a kiindulási törzs MIC értékével elosztva kaptuk meg. A relatív MIC értékek alapján a nagy áteresztőképességű antibiotikum érzékenységi szűrés fals pozitív rátája 5%, míg a fals negatív rátája 16%.

Relatív MIC	Sejtfal szintézis gátlók		Giráz gátlók		Sokrétű hatás	50S riboszóma alegység gátlók		30S riboszóma alegység gátlók		Folsav szintézis gátlók	Aminoglikozidok	
	AMP	FOX	CPR	NAL		CHL	ERY	DOX	TET		TOB	KAN
Törzsek												
AMP2	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-
AMP7	64	>128	2.7	0.67	1.5	2	3	1.33	1.33	0.375	1	-
AMP8	64	>128	7.8	-	-	4	-	0.17	2.67	1	-	-
FOX2	64	>128	2.7	1	2	8	-	0.5	2	1	-	-
FOX7	85.3	>128	5.3	1.33	-	32	6	2	2.67	1	-	1
CPR3	-	-	-	-	-	16	-	-	-	-	-	-
CPR4	16	48	333.3	16	-	-	>8	2	4	1.5	1	1
CPR6	21.3	64	>266 7	>85. 3	1	-	1.5	5.3	5.3	4	-	-
NAL3	5.3	8	20.8	>85. 3	-	6	4	2.67	2	0.75	1.5	1.33
NAL8	10.7	12	83.3	>85. 3	1	12	6	5.3	2.67	1.5	-	-
NIT3	-	-	-	-	-	-	0.25	-	-	-	-	-
NIT4	2	16	2.67	2.67	48	8	-	2	1.3	3	-	-
NIT6	2.7	16	2.67	2.67	>128	-	1	1	1.3	1.5	1	1
CHL2	-	-	-	-	-	-	8	-	-	-	-	-
CHL3	10.7	48	15.8	2.67	-	>128	-	10.7	21.3	4	0.75	-
CHL7	42.7	48	15.8	2.67	3	>128	-	16	21.3	8	1.5	2
ERY1	5.3	>128	3.9	2	-	3	>8	21.3	10.6 7	6	-	0.5
ERY5	-	-	-	-	-	-	-	-	0.51	-	-	-
ERY8	2.7	2	1.3	0.67	-	4	>8	1.3	2	2	4	2.67
DOX1	10.7	24	2.7	2.67	-	48	>8	42.7	21.3	3	-	-
DOX2	10.7	16	3.9	2.67	-	48	4	32	32	3	-	-
TET1	8	32	-	2.67	-	-	2	32.0	42.6 7	2	-	-
TET2	-	-	-	-	0.38	-	-	-	-	-	-	-
TET8	8	24	1	2.67	-	32	3	21.3	128	1.5	-	-
TRM2	2	-	2.67	1.33	-	-	3	2.7	2	>128	-	-
TRM6	4	8	-	2.67	-	-	2	2.7	2	>128	1	1
TOB3	-	0.02	-	-	-	-	-	-	-	-	>256	>85.3
TOB8	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	>256	>85.3
TOB9	-	-	0.25	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KAN1	-	-	-	-	-	-	-	-	0.09	-	-	-
KAN4	-	-	-	0.08	-	-	-	-	-	-	48	>85.3
KAN6	0.17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	128	>85.3
KAN8	-	-	-	-	0.19	-	-	-	-	-	-	-

5. függelék. A 61 teljes-genom szekvenált, adaptált vonalban azonosított rövid, maximum 82 bázispár hosszú mutációk.

Törzs	Referencia pozíció	Hossz	Típus	Referencia	Allél	Annotáció	Aminosav változása	Feltételezett funkcióvesztés
AMP2	3834108	1	pontmutáció	A	G	yicJ feltételezett promóter régió	-	nem
AMP2	256394	1	pontmutáció	G	A	gpt	Asp140Asn	nem
AMP2	92439	1	pontmutáció	G	A	ftsI	Asp343Asn	nem
AMP2	3533634	1	pontmutáció	A	C	envZ	Ile86Ser	nem
AMP2	483248	1	pontmutáció	A	C	acrB	Val127Gly	nem
AMP7	1913525	1	pontmutáció	C	A	proQ	Glu12*	igen
AMP7	3849798	1	pontmutáció	A	T	ilvB	Leu337Gln	nem
AMP7	4377041	1	inzerció	-	T	frdD	Val117fs	igen
AMP7	3813872	82	deléció	AGCCGTTT ACCCATGA AGAGCTAC TCATCTTGT TGGCTCTG GCCCCGAGG GGAATCGA ATCCATTGT AGCGACGC AGAAGGCG	-	rph	Gly207_Stp22 9del	igen
AMP8	3532701	1	pontmutáció	C	G	envZ	Arg397Pro	nem
AMP8	2428217	1	pontmutáció	T	G	purF	Gln15Pro	nem
AMP8	2310771	1	pontmutáció	T	G	ompC	Met1?	igen
AMP8	483248	1	pontmutáció	A	C	acrB	Val127Gly	nem
AMP8	1864436	2	deléció	GC	-	mipA	Ala20fs	igen
AMP9	485021	1	pontmutáció	C	T	acrR	Arg13Cys	nem
AMP9	481922	1	pontmutáció	T	A	acrB	Gln569Leu	nem
AMP9	3636041	1	pontmutáció	G	A	pitA	Gly126Asp	nem
AMP9	3917246	1	pontmutáció	A	T	atpA	Leu212Gln	nem
AMP9	4186947	1	pontmutáció	A	C	rpoC	Lys1192Thr	nem
AMP9	481944	1	pontmutáció	A	C	acrB	Ser562Ala	nem
AMP9	1617394	1	pontmutáció	T	A	marR	Val84Glu	nem
CHL2	882870	1	pontmutáció	G	A	mdfA feltételezett promóter régió	-	nem
CHL2	3438187	1	pontmutáció	G	A	rpoA	Leu289Phe	nem
CHL2	483248	1	pontmutáció	A	C	acrB	Val127Gly	nem
CHL3	483085	1	pontmutáció	C	A	acrB	Gln181His	nem
CHL3	3813881	1	inzerció	-	C	-	-	-
CHL3	3813872	82	deléció	AGCCGTTT ACCCATGA AGAGCTAC TCATCTTGT TGGCTCTG GCCCCGAGG GGAATCGA ATCCATTGT AGCGACGC AGAAGGCG	-	rph	Gly207_Stp22 9del	igen
CHL3	1617384	13	deléció	AAAGGCTG GGTGG	-	marR	Lys81fs	igen
CHL5	882884	1	pontmutáció	C	A	mdfA feltételezett promóter régió	-	nem
CHL5	481922	1	pontmutáció	T	A	acrB	Gln569Leu	nem
CHL5	485238	1	pontmutáció	C	A	acrR	Pro85Gln	nem
CHL5	1617199	1	inzerció	-	A	marR	His19fs	igen
CHL7	3813847	1	pontmutáció	G	T	-	-	-

Törzs	Referencia pozíció	Hossz	Típus	Referencia	Allél	Annotáció	Aminosav változása	Feltételezett funkcióvesztés
CHL7	882870	1	pontmutáció	G	A	mdfA feltételezett promóter régió	-	nem
CHL7	485120	1	pontmutáció	G	C	acrR	Gly46Arg	nem
CHL7	482432	1	pontmutáció	A	T	acrB	Val399Glu	nem
CHL7	1617453	1	deléció	G	-	marR	Gly104fs	igen
CHL9	1617423	1	pontmutáció	C	T	marR	Arg94Cys	nem
CHL9	485006	1	pontmutáció	G	T	acrR	Glu8*	igen
CHL9	482634	1	pontmutáció	A	T	acrB	Phe332Ile	nem
CPR3	2069332	1	pontmutáció	G	T	kriptikus profág CP4-44	-	-
CPR3	3957957	1	pontmutáció	C	T	ppiC feltételezett promóter régió	-	nem
CPR3	4275937	1	pontmutáció	T	A	soxR	Leu149Gln	nem
CPR3	2337195	1	pontmutáció	G	A	gyrA	Ser83Leu	nem
CPR3	485039	3	inzerció	-	GTG	acrR	Asp18_Val19insVal	nem
CPR3	985594	1	deléció	C	-	ompF	Tyr204fs	igen
CPR3	3162288	3	deléció	CGC	-	parC	Pro569_Leu570delinsLeu	nem
CPR4	365633	1	pontmutáció	C	T	-	-	-
CPR4	2818276	1	pontmutáció	A	G	alaS	-	-
CPR4	3876752	1	pontmutáció	G	T	gyrB	Ser464Tyr	nem
CPR4	3533169	1	pontmutáció	A	C	envZ	Val241Gly	nem
CPR4	485129	1	inzerció	-	T	acrR	Tyr49fs	igen
CPR4	1753917	1	inzerció	-	G	pykF	Asp66fs	igen
CPR4	3374913	1	deléció	G	-	sspA	Gly177fs	igen
CPR4	3813872	82	deléció	AGCCGTTCA ACCCATGA AGAGCTAC TCATCTTGT TGGCTCTG GCCCCGAGG GGAATCGA ATCCATTGT AGCGACGC AGAAGGCG	-	rph	Gly207_Stp229del	igen
CPR4	4275869	3	deléció	GCG	-	soxR	Ser126_Arg127delinsSer	nem
CPR5	4179240	1	pontmutáció	T	G	rpoBC feltételezett promóter régió	-	nem
CPR5	2337194	5	pontmutáció	ACTCG	GTG AC	gyrA	Asp82_Ser83delinsGly82_Asp83	nem
CPR5	485210	1	pontmutáció	G	T	acrR	Glu76*	igen
CPR7	2337194	5	pontmutáció	ACTCG	GTG AC	gyrA	Asp82_Ser83delinsGly82_Asp83	nem
CPR7	985805	2	deléció	AC	-	ompF	Thr134fs	igen
CPR7	1617557	1	deléció	G	-	marR	Leu138fs	igen
CPR9	250857	1	pontmutáció	C	A	dinB feltételezett promóter régió	-	nem
CPR9	2337183	1	pontmutáció	T	C	gyrA	Asp87Gly	nem
CPR9	1 617 401	7	inzerció	-	GGA AAG G	marR	Arg86fs	igen
CPR9	3337336	2	inzerció	-	GG	mlaF	Pro251fs	igen
CPR9	985194	10	deléció	TACATCATCA	-	ompF	Tyr335fs	igen
CPR9	1864069	2	deléció	AT	-	mipA	Met143fs	igen
CPR9	2703669	25	deléció	ATTAATCAACGGTGAAC	-	lepA	Val485fs	igen

Törzs	Referencia pozíció	Hossz	Típus	Referencia	Allél	Annotáció	Aminosav változása	Feltételezett funkcióvesztés
				GTGTTGAT				
CPR9	3100507	2	deléció	GT	-	trml	Val123fs	igen
CPR9	3212495	3	deléció	GTG	-	rpoD	Arg476_Glu477delinsGln	nem
CPR9	3375323	14	deléció	TCGAGATC GAACAC	-	sspA	Phe36fs	igen
CPR9	3813965	1	deléció	C	-	rph	Thr203fs	igen
DOX1	1617349	1	pontmutáció	G	A	marR	Gly69Glu	nem
DOX1	3813872	82	deléció	AGCCGTTC ACCCATGA AGAGCTAC TCATCTTGT TGGCTCTG GCCCCGAGG GGAATCGA ATCCATTGT AGCGACGC AGAAGGCG	-	rph	Gly207_Stp229del	igen
DOX2	485472	1	pontmutáció	C	T	acrR	Ala163Val	nem
DOX2	1617515	1	deléció	A	-	marR	Thr124fs	igen
DOX3	484925	1	pontmutáció	T	C	acrR feltételezett promóter régió	-	nem
DOX3	1617394	1	pontmutáció	T	G	marR	Val84Gly	nem
DOX4	142681	1	pontmutáció	G	A	-	-	-
DOX4	1617392	1	pontmutáció	G	A	marR	Trp83*	igen
DOX4	3963570	1	deléció	G	-	rhIB	Gly28fs	igen
DOX5	2400925	1	pontmutáció	G	T	nuoC	His315Asn	nem
DOX5	1384350	1	pontmutáció	C	A	ycjF	Ser272Arg	nem
DOX5	1617394	1	pontmutáció	T	G	marR	Val84Gly	nem
DOX5	3962833	1	inzerció	-	C	rhIB	Gly274fs	igen
ERY1	3533340	1	pontmutáció	C	G	envZ	Arg184Pro	nem
ERY1	4275907	1	pontmutáció	T	G	soxR	Leu139*	igen
ERY1	1015937	1	deléció	C	-	ycbZ	Ala529fs	igen
ERY2	4275902	1	pontmutáció	C	G	soxR	Asp137Glu	nem
ERY2	485216	1	pontmutáció	C	T	acrR	Gln78*	igen
ERY2	1016209	1	pontmutáció	A	T	ycbZ	Ser438Arg	nem
ERY2	3409500	1	pontmutáció	A	C	fis	Thr70Pro	nem
ERY5	481479	1	pontmutáció	G	A	acrB	Arg717Cys	nem
ERY5	4627987	1	pontmutáció	C	A	yjjK	Asp187Tyr	nem
ERY6	484955	1	pontmutáció	T	C	acrR feltételezett promóter régió	-	nem
ERY6	4185723	1	pontmutáció	C	T	rpoC	Ala784Val	nem
ERY6	1282004	1	pontmutáció	C	T	narG	Ala973Val	nem
ERY6	1017396	1	pontmutáció	G	A	ycbZ	Gln43*	igen
ERY6	3409427	1	deléció	G	-	fis	Gln45fs	igen
ERY8	2071118	1	pontmutáció	T	C	flu	Leu519Pro	nem
ERY8	485238	1	pontmutáció	C	A	acrR	Pro85Gln	nem
ERY8	1017422	1	inzerció	-	C	ycbZ	Leu34fs	igen
FOX1	3533727	1	pontmutáció	C	A	envZ	Arg55Leu	nem
FOX1	2140213	1	pontmutáció	T	A	dcd	Glu9Asp	nem
FOX1	485607	1	pontmutáció	T	G	acrR	Leu208Arg	nem
FOX1	92519	1	pontmutáció	A	T	ftsI	Leu369Phe	nem
FOX1	4186886	1	pontmutáció	A	C	rpoC	Lys1172Gln	nem
FOX1	483248	1	pontmutáció	A	C	acrB	Val127Gly	nem
FOX1	2310051	1	deléció	A	-	ompC	Thr241fs	igen
FOX2	1619436	1	pontmutáció	G	T	ydeE	-	-
FOX2	93019	1	pontmutáció	A	T	ftsI	Gln536Leu	nem
FOX2	481178	1	pontmutáció	T	G	acrB	Glu817Ala	nem
FOX2	1111292	1	pontmutáció	G	A	opgH	Gly403Ser	nem

Törzs	Referencia pozíció	Hossz	Típus	Referencia	Allél	Annotáció	Aminosav változása	Feltételezett funkcióvesztés
FOX2	2310673	1	deléció	T	-	ompC	Asp33fs	igen
FOX2	3813864	47	deléció	CCGAGGGG AATCGAAT CCATTGTAG CGACGCAG AAGGCGGC GCTGGC	-	rph	Ala221_Stp22 9del	igen
FOX6	92650	1	pontmutáció	C	G	ftsI	Ala413Gly	nem
FOX6	481920	1	pontmutáció	C	G	acrB	Gly570Arg	nem
FOX6	3533337	1	pontmutáció	G	A	envZ	Pro185Leu	nem
FOX6	3327607	1	pontmutáció	C	A	dacB	Pro208His	nem
FOX6	1111473	1	pontmutáció	T	G	opgH	Val463Gly	nem
FOX6	2310235	2	inzerció	-	TT	ompC	Glu180fs	igen
FOX6	3813872	82	deléció	AGCCGTTC ACCCATGA AGAGCTAC TCATCTTGT TGGCTCTG GCCCGAGG GGAATCGA ATCCATTGT AGCGACGC AGAAGGCG	-	rph	Gly207_Stp22 9del	igen
FOX7	4632868	1	pontmutáció	G	A	rob	Arg156Cys	nem
FOX7	481922	1	pontmutáció	T	A	acrB	Gln569Leu	nem
FOX7	1151505	1	pontmutáció	T	G	fabF	Ile115Ser	nem
FOX7	3533718	1	pontmutáció	A	C	envZ	Met58Arg	nem
FOX7	481728	1	pontmutáció	A	T	acrB	Trp634Arg	nem
FOX7	2310605	1	inzerció	-	T	ompC	Tyr56fs	igen
FOX8	3813848	1	pontmutáció	C	T	-	-	-
FOX8	4632867	1	pontmutáció	C	T	rob	Arg156His	nem
FOX8	481744	1	pontmutáció	G	T	acrB	Phe628Leu	nem
FOX8	3534281	1	pontmutáció	G	A	ompR	Pro109Leu	nem
FOX8	3516788	1	pontmutáció	A	G	aroK	Val100Ala	nem
FOX8	2309792	1	deléció	T	-	ompC	Phe327fs	igen
KAN1	3469783	1	pontmutáció	T	C	fusA	Asp585Gly	nem
KAN1	2713256	1	pontmutáció	T	A	yfiE	Gln29His	nem
KAN1	3336026	1	pontmutáció	C	T	mldD	Gly153Asp	nem
KAN1	4031418	1	pontmutáció	G	A	trkH	Gly84Asp	nem
KAN1	3472345	1	pontmutáció	T	A	rpsL	His77Leu	nem
KAN1	2000531	1	pontmutáció	T	G	fliC	Lys367Thr	nem
KAN1	3914678	1	pontmutáció	A	C	atpD	Phe241Val	nem
KAN1	2713261	1	pontmutáció	T	C	yfiE	Thr28Ala	nem
KAN1	3606212	1	pontmutáció	T	A	zntA	Val580Glu	nem
KAN4	3001495	1	pontmutáció	C	G	xdhB	Ala287Gly	nem
KAN4	3336026	1	pontmutáció	C	T	mldD	Gly153Asp	nem
KAN4	3472345	1	pontmutáció	T	A	rpsL	His77Leu	nem
KAN4	3211823	1	pontmutáció	T	A	rpoD	Leu252Gln	nem
KAN4	3771673	1	pontmutáció	T	G	mtlA	Leu457Arg	nem
KAN4	4031406	1	pontmutáció	T	A	trkH	Leu80Gln	nem
KAN4	3470245	1	pontmutáció	A	T	fusA	Met431Lys	nem
KAN4	3469736	1	pontmutáció	A	C	fusA	Phe601Val	nem
KAN4	3138030	1	pontmutáció	G	T	hybF	Ser104*	igen
KAN4	4067083	1	pontmutáció	T	A	yihQ	Ser73Cys	nem
KAN4	828304	1	pontmutáció	T	A	ybhG	Thr298Ser	nem
KAN4	2399387	1	deléció	G	-	nuoF	Gly64fs	igen
KAN6	3469622	1	pontmutáció	G	T	fusA	Arg639Ser	nem
KAN6	3443879	1	pontmutáció	C	A	rplF	Arg95Leu	nem
KAN6	184056	1	pontmutáció	C	A	yaeH	Glu14*	igen
KAN6	62970	1	pontmutáció	C	A	rapA	Glu99*	igen

Törzs	Referencia pozíció	Hossz	Típus	Referencia	Allél	Annotáció	Aminosav változása	Feltételezett funkcióvesztés
KAN6	3336026	1	pontmutáció	C	T	mIaD	Gly153Asp	nem
KAN6	4031406	1	pontmutáció	T	A	trkH	Leu80Gln	nem
KAN6	1541256	1	pontmutáció	T	G	narU	Met277Leu	nem
KAN6	1541261	1	pontmutáció	A	T	narU	Phe275Tyr	nem
KAN6	672146	1	pontmutáció	A	G	leuS	Ser621Pro	nem
KAN6	2555923	1	inzerció	-	T	eutB	Val260fs	igen
KAN6	2271917	1	deléció	C	-	yejA	Ala511fs	igen
KAN8	3336026	1	pontmutáció	C	T	mIaD	Gly153Asp	nem
KAN8	3211553	1	pontmutáció	T	A	rpoD	Ile162Asn	nem
KAN8	3915514	1	pontmutáció	T	A	atpG	Lys259*	igen
KAN8	3469561	1	pontmutáció	G	T	fusA	Pro659Gln	nem
KAN8	1143088	1	pontmutáció	A	T	rne	Val168Glu	nem
KAN8	449377	1	deléció	C	-	cyoB	Gly163fs	igen
KAN8	1304205	4	deléció	GTTC	-	oppF	Val140fs	igen
KAN8	4102551	1	deléció	A	-	cpxA	Ser150fs	igen
KAN9	3935526	1	pontmutáció	T	C	rbsK	-	-
KAN9	1959380	1	pontmutáció	C	T	argS	Ala432Val	nem
KAN9	2562657	1	pontmutáció	G	C	yffS	Arg38Pro	nem
KAN9	3469758	1	pontmutáció	A	T	fusA	Phe593Leu	nem
KAN9	3472304	1	pontmutáció	G	A	rpsL	Pro91Ser	nem
KAN9	4299217	1	pontmutáció	T	G	mdtO	Ser629Arg	nem
KAN9	3813832	1	deléció	A	-	-	-	-
NAL1	3163790	1	pontmutáció	T	C	parC	Asp69Gly	nem
NAL1	2337183	1	pontmutáció	T	C	gyrA	Asp87Gly	nem
NAL1	59059	1	pontmutáció	C	A	yabP	Thr196Asn	nem
NAL1	2809091	6	deléció	GATCGA	-	mprA	Trp100_Glu102delins*	igen
NAL3	2835790	1	pontmutáció	C	A	hydN	Arg113Leu	nem
NAL3	2337184	1	pontmutáció	C	A	gyrA	Asp87Tyr	nem
NAL3	3172110	1	pontmutáció	T	A	parE	Ile437Phe	nem
NAL3	1617461	1	deléció	A	-	marR	Ala106fs	igen
NAL3	2808897	12	deléció	ATGCAAAG CAAG	-	mprA	Met36_Lys39del	igen
NAL3	3813986	1	deléció	G	-	rph	Arg196fs	igen
NAL6	2581006	1	pontmutáció	C	T	nudK	-	-
NAL6	3877040	1	pontmutáció	G	T	gyrB	Ala368Glu	nem
NAL6	2336074	1	pontmutáció	C	T	gyrA	Ala457Thr	nem
NAL6	2337184	1	pontmutáció	C	A	gyrA	Asp87Tyr	nem
NAL6	1836871	1	pontmutáció	G	A	ynjD	Gly34Glu	nem
NAL6	2337221	1	pontmutáció	G	C	gyrA	Ile74Met	nem
NAL6	4275907	1	pontmutáció	T	G	soxR	Leu139*	igen
NAL6	834 103	11	deléció	TGCTCAGCC AG	-	dinG	Leu604fs	igen
NAL7	2337229	1	pontmutáció	C	A	gyrA	Asp72Tyr	nem
NAL7	2337184	1	pontmutáció	C	T	gyrA	Asp87Asn	nem
NAL7	2335575	1	pontmutáció	A	G	gyrA	Leu623Pro	nem
NAL7	1802924	1	pontmutáció	G	T	arpB	Lys603Asn	nem
NAL7	2809012	1	pontmutáció	C	T	mprA	Pro74Leu	nem
NAL7	833347	1	deléció	T	-	dinG	Leu352fs	igen
NAL7	1617286	20	deléció	CTATCCGCT GCGCGGCG TGT	-	marR	Ser48fs	igen
NAL8	2069332	1	pontmutáció	G	T	kriptikus profág CP4-44	-	-
NAL8	892145	1	pontmutáció	G	C	dusA feltételezett promóter régió	-	nem
NAL8	2337228	1	pontmutáció	T	C	gyrA	Asp72Gly	nem
NAL8	2337195	1	pontmutáció	G	A	gyrA	Ser83Leu	nem

Törzs	Referencia pozíció	Hossz	Típus	Referencia	Allél	Annotáció	Aminosav változása	Feltételezett funkcióvesztés
NAL8	485403	1	deléció	G	-	acrR	Arg140fs	igen
NAL9	1260119	1	pontmutáció	C	A	-	-	-
NAL9	2337244	1	pontmutáció	C	A	gyrA	Ala67Ser	nem
NAL9	2809060	1	pontmutáció	G	T	mprA	Arg90Leu	nem
NAL9	4423477	1	inzerció	-	C	rpsF	Arg113fs	igen
NAL9	3307642	14	deléció	GTATCACCA AAGAG	-	pnp	Gly513fs	igen
NIT2	3820931	1	pontmutáció	C	T	spoT	Ala170Val	nem
NIT2	3534339	1	pontmutáció	C	T	ompR	Asp90Asn	nem
NIT2	2809127	1	pontmutáció	C	A	mprA	Cys112*	igen
NIT3	2290058	1	pontmutáció	A	T	ccmH	-	-
NIT3	3533367	1	pontmutáció	G	A	envZ	Ala175Val	nem
NIT3	2290057	1	pontmutáció	G	A	ccmH	Arg126Trp	nem
NIT3	2808882	1	pontmutáció	C	T	mprA	Arg31Cys	nem
NIT3	639636	1	pontmutáció	G	A	ahpF	Gly221Ser	nem
NIT3	2309873	1	deléció	A	-	ompC	Gln300fs	igen
NIT4	3238781	1	pontmutáció	G	T	sstT	-	-
NIT4	604328	1	pontmutáció	C	T	nfsB	Arg107His	nem
NIT4	2809120	1	pontmutáció	G	T	mprA	Arg110Leu	nem
NIT4	3238821	1	pontmutáció	G	T	sstT	Asp286Tyr	nem
NIT4	3914765	1	pontmutáció	C	T	atpD	Glu212Lys	nem
NIT4	4180843	1	pontmutáció	C	T	rpoB	His526Tyr	nem
NIT4	890836	1	pontmutáció	A	T	nfsA	Lys144*	igen
NIT4	2804254	1	pontmutáció	G	A	proW	Val75Ile	nem
NIT4	640008	1	inzerció	-	T	ahpF	Cys345fs	igen
NIT4	1168022	1	deléció	A	-	ycfQ	Ser12fs	igen
NIT4	2954537	1	deléció	G	-	ptrA	Gln790fs	igen
NIT6	118640	1	pontmutáció	C	T	nadC	-	-
NIT6	826562	1	pontmutáció	G	A	ybhF	Ala548Val	nem
NIT6	3281204	1	pontmutáció	C	T	kbaY	Gln14*	igen
NIT6	1187850	1	pontmutáció	C	A	phoQ	Gly384Cys	nem
NIT6	1617760	1	pontmutáció	G	A	marA	Gly55Ser	nem
NIT6	3534065	1	pontmutáció	G	A	ompR	Ser181Phe	nem
NIT7	2809387	1	pontmutáció	G	T	emrAB feltételezett promóter régió	-	nem
NIT7	3532705	1	pontmutáció	C	T	envZ	Ala396Thr	nem
NIT7	2809123	1	pontmutáció	G	T	mprA	Arg111Leu	nem
NIT7	1189514	1	pontmutáció	C	G	phoP	Gly53Arg	nem
NIT7	2310769	1	pontmutáció	C	A	ompC	Met1?	igen
NIT8	4103344	1	pontmutáció	C	T	cpxR	Arg117His	nem
NIT8	604517	1	pontmutáció	T	C	nfsB	Gln44Arg	nem
NIT8	2871187	1	pontmutáció	C	T	ygbE	Trp58*	igen
NIT8	1755439	3	inzerció	-	TAA	-	-	-
NIT8	2309858	1	deléció	A	-	ompC	Asn305fs	igen
NIT8	2808957	12	deléció	ACGTTGTTT ATG	-	mprA	Thr56_Met59 del	igen
TET1	4638035	1	pontmutáció	C	T	arcA	Asp99Asn	nem
TET1	3533434	1	pontmutáció	G	A	envZ	His153Tyr	nem
TET1	1617333	1	deléció	T	-	marR	Leu64fs	igen
TET2	2782006	1	pontmutáció	T	G	ypjC	Asp343Ala	nem
TET2	1617267	1	pontmutáció	C	G	marR	Gln42Glu	nem
TET2	32627	1	pontmutáció	A	G	carB	Glu604Gly	nem
TET3	2164220	1	pontmutáció	T	G	yegQ	Cys177Gly	nem
TET3	1617507	1	pontmutáció	G	T	marR	Glu122*	igen
TET7	1617352	1	pontmutáció	C	T	marR	Ala70Val	nem
TET7	2810647	1	pontmutáció	C	T	emrB	Gln4*	igen
TET7	483309	1	pontmutáció	C	T	acrB	Val107Met	nem

Törzs	Referencia pozíció	Hossz	Típus	Referencia	Allél	Annotáció	Aminosav változása	Feltételezett funkcióvesztés
TET8	1617351	1	pontmutáció	G	A	marR	Ala70Thr	nem
TOB3	3471474	1	pontmutáció	G	T	fusA	-	-
TOB3	450888	1	pontmutáció	T	G	cyoABCDE feltételezett promóter régió	-	nem
TOB3	4186131	1	pontmutáció	C	G	rpoC	Ala920Gly	nem
TOB3	4031595	1	pontmutáció	T	G	trkH	Ile143Ser	nem
TOB3	4102274	1	pontmutáció	A	T	cpxA	Leu242Gln	nem
TOB3	3469561	1	pontmutáció	G	T	fusA	Pro659Gln	nem
TOB3	3484617	1	pontmutáció	C	T	crp	Thr159Ile	nem
TOB3	1184111	1	pontmutáció	T	C	potA	Tyr236Cys	nem
TOB4	2468421	1	pontmutáció	A	T	gtrS	-	-
TOB4	519076	1	pontmutáció	A	T	ybbA	-	-
TOB4	3147839	1	pontmutáció	A	T	yghA	-	-
TOB4	3336026	1	pontmutáció	C	T	mldA	Gly153Asp	nem
TOB4	4186089	1	pontmutáció	G	A	rpoC	Gly906Asp	nem
TOB4	3472345	1	pontmutáció	T	A	rpsL	His77Leu	nem
TOB4	3469576	1	pontmutáció	A	T	fusA	Ile654Asn	nem
TOB4	1184672	1	pontmutáció	A	G	potA	Leu49Pro	nem
TOB4	4031406	1	pontmutáció	T	A	trkH	Leu80Gln	nem
TOB4	3469735	1	pontmutáció	A	C	fusA	Phe601Cys	nem
TOB4	395906	1	pontmutáció	C	A	sbmA	Ser15*	igen
TOB4	432736	1	pontmutáció	A	T	ribD	Thr20Ser	nem
TOB4	2392632	1	pontmutáció	A	T	nuoL	Val146Glu	nem
TOB8	1990717	1	pontmutáció	G	A	pgsA	Ala42Val	nem
TOB8	190888	1	pontmutáció	A	C	tsf	Glu11Ala	nem
TOB8	3336026	1	pontmutáció	C	T	mldA	Gly153Asp	nem
TOB8	3469871	1	pontmutáció	C	A	fusA	Gly556Cys	nem
TOB8	3469988	1	pontmutáció	G	T	fusA	His517Asn	nem
TOB8	3472345	1	pontmutáció	T	A	rpsL	His77Leu	nem
TOB8	4031406	1	pontmutáció	T	A	trkH	Leu80Gln	nem
TOB8	2085305	1	deléció	A	-	plaP feltételezett promóter régió	-	-
TOB8	2399912	1	deléció	A	-	nuoE	Ile55fs	igen
TOB9	3181797	1	pontmutáció	C	A	-	-	-
TOB9	3916688	1	pontmutáció	G	A	atpA	Ala398Val	nem
TOB9	1184360	1	pontmutáció	T	G	potA	Gln153Pro	nem
TOB9	3915511	1	pontmutáció	C	A	atpG	Glu260*	igen
TOB9	3470996	1	pontmutáció	C	A	fusA	Gly181Cys	nem
TOB9	4031406	1	pontmutáció	T	G	trkH	Leu80Arg	nem
TOB9	1990691	1	pontmutáció	A	T	pgsA	Phe51Ile	nem
TOB9	3105568	1	pontmutáció	G	T	speC	Pro537Gln	nem
TOB9	3469708	1	pontmutáció	G	T	fusA	Pro610Gln	nem
TOB9	61298	1	pontmutáció	G	T	rapA	Ser656*	igen
TOB9	447568	1	pontmutáció	C	T	cyoC	Trp106*	igen
TOB9	2085026	1	deléció	G	-	plaP	Val21fs	igen
TOB10	2403545	1	pontmutáció	T	C	nuoABCFHIJKLM N feltételezett promóter régió	-	nem
TOB10	4175068	1	pontmutáció	G	T	tufB	Ala368Ser	nem
TOB10	448596	1	pontmutáció	T	C	cyoB	Ile424Val	nem
TOB10	448593	1	pontmutáció	T	A	cyoB	Ile425Phe	nem
TOB10	3469758	1	pontmutáció	A	T	fusA	Phe593Leu	nem
TOB10	2365357	1	pontmutáció	A	C	arnC	Ser89Arg	nem
TOB10	2394213	1	pontmutáció	C	T	nuoL	Trp87*	igen
TOB10	3470827	1	pontmutáció	T	G	fusA	Tyr237Ser	nem
TRM2	49903	1	pontmutáció	T	G	folA	Asp27Glu	nem
TRM2	50102	1	pontmutáció	A	C	folA	Ile94Leu	nem

Törzs	Referencia pozíció	Hossz	Típus	Referencia	Allél	Annotáció	Aminosav változása	Feltételezett funkcióvesztés
TRM2	485496	1	deléció	T	-	acrR	Ile171fs	igen
TRM6	49903	1	pontmutáció	T	A	folA	Asp27Glu	nem
TRM6	4275826	1	pontmutáció	T	A	soxR	Leu112Gln	nem
TRM6	485279	1	pontmutáció	T	C	acrR	Ser99Pro	nem
TRM7	2864925	1	pontmutáció	C	A	rpoS	Glu217*	igen
TRM7	483089	1	pontmutáció	G	A	acrB	Ser180Leu	nem
TRM9	4275928	1	pontmutáció	C	T	soxR	Ala146Val	nem
TRM9	459444	1	pontmutáció	G	T	lon	Asp445Tyr	nem
TRM9	1188449	1	deléció	A	-	phoQ	Glu184fs	igen
TRM10	1188237	1	pontmutáció	T	C	phoQ	Asn255Asp	nem
TRM10	49884	1	pontmutáció	C	T	folA	Pro21Leu	nem

6. függelék. A 61 teljes-genom szekvenált, adaptált vonalban azonosított nagy deléciók és duplikációk.

Törzs	Régió	Hossz	Típus
AMP2	684526...687074	2 548	Deléció
CHL9	882799..913826	31 027	Duplikáció
DOX2	3618329..3760302	141 974	Duplikáció
ERY8	2556713...2563502	6 789	Deléció
KAN1	392191...397656	5 465	Deléció
KAN4	392191...397656	5 465	Deléció
KAN6	392191...404957	12 766	Deléció
KAN8	392191...406599	14 408	Deléció
KAN9	392194...422905	30 711	Deléció
NAL1	254010...273178	19 168	Deléció
NAL7	2800667..2845662	44 996	Duplikáció
NIT2	567258...625700	58 442	Deléció
NIT3	1607537...1621842	14 305	Deléció
NIT4	1617598...1617981	383	Deléció
NIT6	599911...649324	49 413	Deléció
TET8	2556713...2563502	6 789	Deléció
TOB3	392191...397656	5 465	Deléció
TOB8	392191...396409	4 218	Deléció
TOB9	392191...404957	12 766	Deléció
TOB10	392191...404957	12 766	Deléció
TRM2	3623272...3650058	26 786	Deléció
TRM7	44101..53958	9 858	Duplikáció
TRM10	252296...273182	20 886	Deléció

7. függelék. A 61 teljes-genom szekvenált, adaptált vonalban azonosított, IS-elemhez köthető, nagymértékű genomi átrendeződések.

Törzs	Régió	Hossz	IS elem	Típus	Érintett gén
AMP7	687073..986159	299 087	insH	inverzió	ompF
CHL2	485265..3128167	2 642 903	insH	transzpozíció	acrR
CHL3	19795..882798	863 004	insB	inverzió	-
CHL7	882776..4505482	3 622 707	insI	inverzió	-
CHL7	687073..986159	299 087	insH	inverzió	ompF
CHL7	986160..3364773	2 378 614	insH	inverzió	ompF;yhcE
CHL9	2065378..2771657	706 280	insH	transzpozíció	yfjW
CPR3	1802452..2065378	262 927	insH	transzpozíció	arpB
CPR9	485265..3128167	2 642 903	insH	transzpozíció	acrR
DOX2	458024..2513640	2 055 617	insL	inverzió	-
DOX3	458024..2512295	2 054 272	insL	inverzió	-
ERY2	458024..2512295	2 054 272	insL	inverzió	-
ERY5	274374..687073	412 700	insH	duplikáció	-
ERY8	20563..3798837	3 778 275	insA	inverzió	waaY
FOX1	575009..687073	112 065	insH	duplikáció	-
FOX1	458024..2512295	2 054 272	insL	inverzió	-
FOX2	274374..687073	412 700	insH	duplikáció	-
FOX2	279336..1676645	1 397 310	insX	inverzió	ydgH
FOX6	274374..687073	412 700	insH	duplikáció	-
FOX7	575009..687073	112 065	insH	duplikáció	-
FOX8	274374..687073	412 700	insH	duplikáció	-
KAN1	450610..1394067	943 458	insH	inverzió	cyoA
KAN1	2400797..4516494	2 115 698	insA	transzpozíció	nuoC
KAN4	450610..2065378	1 614 769	insH	inverzió	cyoA
KAN6	450610..2065378	1 614 769	insH	inverzió	cyoA
KAN9	450610..2065378	1 614 769	insH	inverzió	cyoA
NAL9	485205..2065378	1 580 174	insH	inverzió	acrR
NIT2	2065378..2099772	34 395	insH	duplikáció	-
NIT2	279336..891081	611 746	insX	inverzió	nfsA
NIT3	890781..2513640	1 622 860	insL	inverzió	nfsA
NIT3	575009..604604	29 596	insH	transzpozíció	nmpC;nfsB
NIT4	1906840..2288136	381 297	insH	inverzió	yejO
NIT7	575009..604604	29 596	insH	transzpozíció	nmpC;nfsB
NIT7	890737..1976526	1 085 789	insB	transzpozíció	nfsA
TET1	315708..565999	250 292	insF	duplikáció	-
TET1	458024..2512295	2 054 272	insL	inverzió	-
TET2	458024..607229	149 206	insL	duplikáció	-
TET2	458024..2512295	2 054 272	insL	inverzió	-
TET3	315708..573593	257 886	insE-insF	duplikáció	-
TET7	270986..573593	302 608	insI	duplikáció	-
TET7	458024..2512295	2 054 272	insL	inverzió	-
TET8	370984..1468541	1 097 558	insI	duplikáció	-
TET8	2065378..3791870	1 726 493	insH	inverzió	-
TET8	3364773..3791870	427 098	insH	inverzió	-
TOB4	450610..2065378	1 614 769	insH	inverzió	cyoA
TOB8	450610..2065378	1 614 769	insH	inverzió	cyoA
TOB8	270986..2853525	2 582 540	insI	transzpozíció	fhlA
TRM6	1906830..2065378	158 549	insH	inverzió	
TRM9	485205..2065378	1 580 174	insH	inverzió	acrR
TRM10	573813..2419695	1 845 883	insH	inverzió	nmpC;folX