

**Multidrog-rezisztens baktériumok kompenzáló
evolúciójának rendszerszintű vizsgálata**

Ph.D. értekezés

Dunai Anett

Témavezető: Dr. Pál Csaba, tudományos főmunkatárs

Biológia Doktori Iskola

Biokémiai Intézet

ELKH Szegedi Biológiai Kutatóközpont

SZTE-TTIK

2022

Szeged.

Rövidítésjegyzék

AB: antibiotikum

ABC: *ATP-binding cassette*

AMP: ampicillin

CHL: klóramfenikol

CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CPR: ciprofloxacin

DOX: doxiciklin

DHFR: dihidrofolát-reduktáz

DMSO: dimetil-szulfoxid

ERY: erithromicin

E-teszt: (Epsilometer test) MIC meghatározásra szolgáló teszt

FOX: cefoxitin

KAN: kanamicin

LB: Luria-Bertani tápoldat

Mar: *multiple antibiotic resistance*

MAGE: *Multiplex Automated Genome Engineering*

MATE: *multidrug and toxic compound extrusion*

MDR: (*Multiple Drug Resistance*) multidrog rezisztencia

MFS: *Major Facilitator Superfamily*

MIC: (*Minimum Inhibitory Concentration*) minimális gátló koncentráció

MMR: *Mismatch Repair*

MS: (*Minimal Salt*) minimál táptoldat

NAL: nalidixinsav

NIT: nitrofurantoin

OD: optikai denzitás

pORTMAGE: *portable Multiplex Automated Genome Engineering*

SCVs: (*Small Colony Variants*) kis telepeket képző variánsok

SMR: *Small Multidrug Resistance*

SNP: (*Single Nucleotide Polymorphism*), egyedi nukleotid polimorfizmus

TB: Terrific-broth tápoldat

TET: tetraciklin

TOB: tobramicin

TRM: trimethoprim

Tartalomjegyzék

I. Bevezetés	6
II. Irodalmi áttekintés	12
II.1 Az antibiotikumok általános jellemzése és csoportosítása	12
II.2. A bakteriális antibiotikum rezisztencia molekuláris mechanizmusa	15
II.2. a. Az antibiotikum inaktiválása vagy módosítása	16
II.2. b. Az antibiotikum célpontjának módosítása vagy megkerülése	16
II.2. c. Az antibiotikum intracelluláris felhalmozódásának akadályozása	17
II.3. Az antibiotikum rezisztencia terjedése és stabilitása	23
II.4. A fitnessz javulása: kompenzáló evolúció	28
III. Célkitűzések	32
IV. Anyagok és módszerek	33
IV.1. Alkalmazott antibiotikumok, tápoldat és baktériumtörzsek	33
IV.2. Evolúció antibiotikummentes környezetben	35
IV.3. Relatív fitnessz mérése, a növekedési görbe felvétele	35
IV.5. Relatív fitnessz, informatikai elemzés	36
IV.6. Az antibiotikum rezisztencia változásnak a mérése	38
IV.7. Egyedi mutációk visszaillesztése pORTMAGE technikával	38
IV.8. Hoechst akkumulációs mérés	39
IV.9. Teljes genom szekvenálás	39
V. Eredmények	41
V.1. Rezisztencia evolúció és fitnessz költség	41
V.2. Rezisztens törzsek 60 napig tartó laboratóriumi evolúciója antibiotikum mentes környezetben	45
V.3. A rezisztencia változása antibiotikum mentes környezetben	48
V.4. Kompenzáló mechanizmusok vizsgálata	54
V.5. Kompenzáló mutációk pleitrop hatása a doxiciklin-rezisztens <i>E. coli</i> törzsekben	57
V.6. Kompenzáló mutációk pleitrop hatása a cefoxitin rezisztens <i>E. coli</i> törzsekben	61
VI. Eredmények megvitatása	64
VII. Köszönetnyilvánítás	68
VIII. Szakirodalmi hivatkozások	69

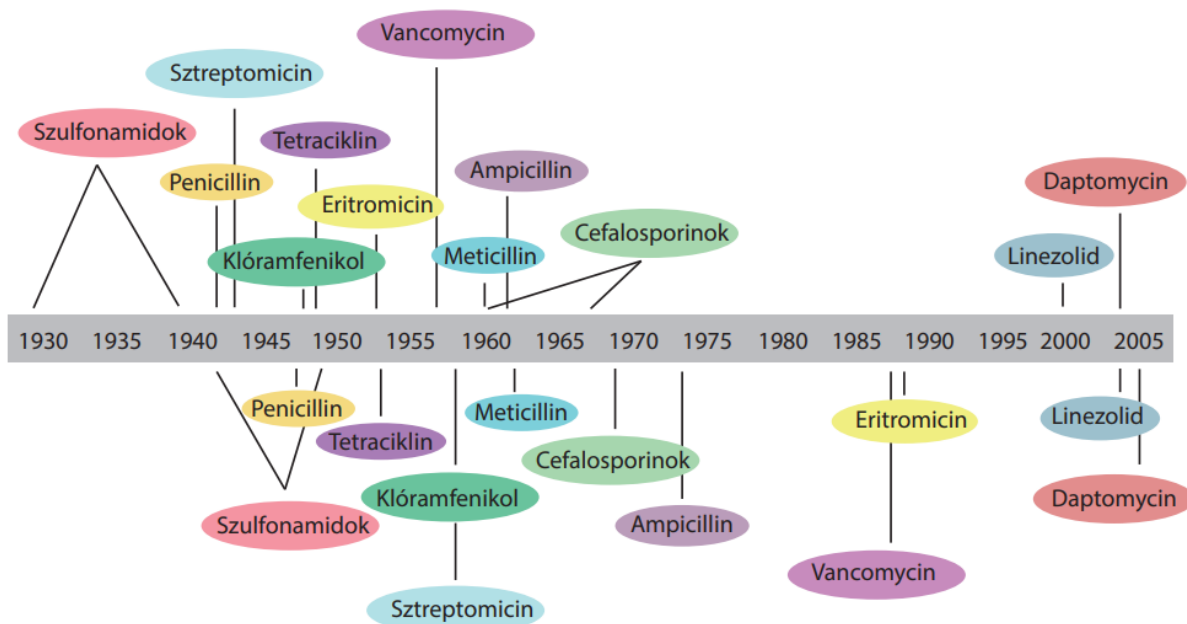
IX. Összefoglalás	90
X. Summary	93
XI. Függelék.....	96

I. Bevezetés

Az antibiotikumok megjelenése jelentősen megváltoztatta a bakteriális fertőzések kimenetelét és hatására jelentősen megnövekedett a várható élettartam is (L. J. V. Piddock, 2012). Az antibiotikumok nem csak a bakteriális fertőzésben megbetegedettek életét mentették meg, hanem kulcsfontosságú szerepet játszottak az orvostudomány fejlődésében, hiszen hatékonynak mutatkoztak a bakteriális felülfertőződések elkerülésében a rákterápiás kezelések, a transzplantációk és más immunszuppressziós eljárások során, az invazív sebészeti beavatkozásokban, valamint a koraszülöttek ellátásában is (Rossolini és mtsai., 2014; Wright, 2014). Azonban pár évtizeddel azután, hogy az első beteget antibiotikummal kezelték, a bakteriális fertőzések ismét fenyegetővé váltak (Ventola, 2015).

Amikor Alexander Fleming 1928-ban felfedezte a penicillint, azt is megjegyezte, hogy az érzékeny baktériumok képesek rezisztenssé válni, különösen akkor, ha alacsony dózisoknak vannak kitéve. Ezzel kiemelte azt, hogy a nem megfelelő alkalmazás az antibiotikum rezisztencia megjelenéséhez és a terápia kudarcához vezethet (Alexander Fleming, é. n.). Ennek okán, 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 meticillinnel szemben is ellenállóvá vált. A meticillin-rezisztens fertőzések kezelésére ezért ismét egy új antibiotikumot, a vankomicint vezették be, azonban a leggyakoribb kórházi fertőzéseket okozó *Staphylococcus aureus*-nál már erre a szerre is megjelent a rezisztencia. A vankomicin-rezisztens *S. aureus* törzsek kezelésére kifejlesztett linezoliddal szemben már szintén kifejlődött a rezisztencia (**1. ábra**), bár még széles körben nem terjedt el (Sr, 2001).

Antibiotikum klinikai alkalmazásának kezdete

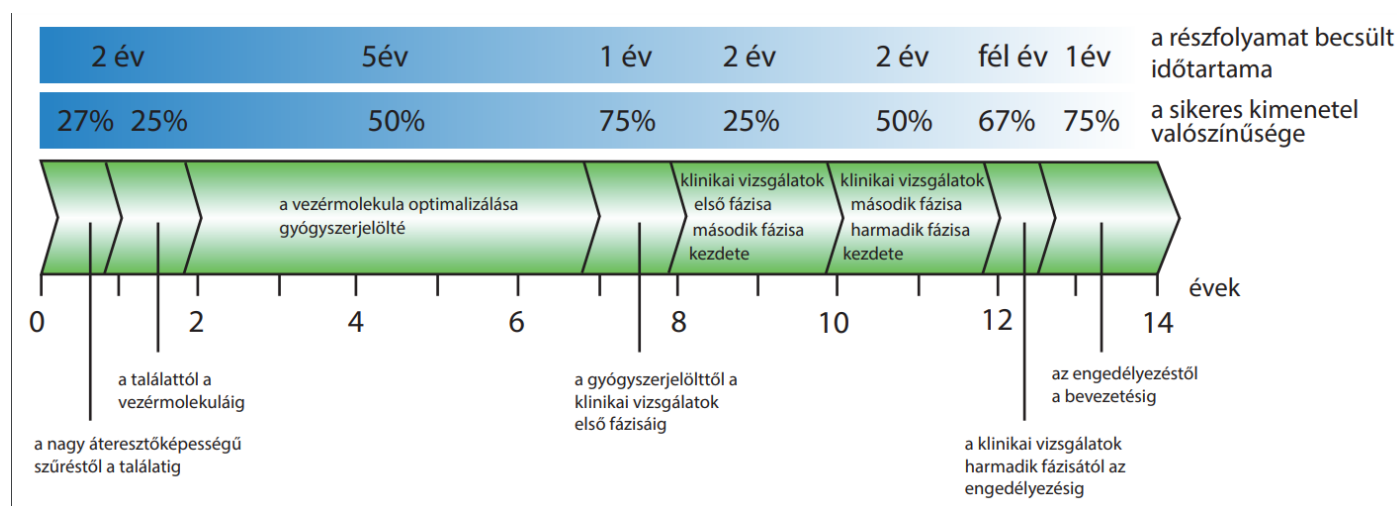


Antibiotikum rezisztencia megjelenése

1. ábra. Az antibiotikumok és az ellenük kialakult rezisztencia megjelenésének időpontjai (Sr, 2001).

A multirezisztens kórokozók terjedése tehát az elmúlt évtizedekben jelentősen növekedett, melynek oka többek közt az antibiotikumok hosszantartó és nem megfelelő alkalmazása: így például a mezőgazdaságban nem célzott módon, hanem tömeges kezelésként vagy nem fogékony mikroorganizmusok ellen bevetve, illetve szubterápiás dózisokban, ismétlődően vagy nem megfelelő időtartamokon át adva ezen gyógyszereket (Bartlett és mtsai., 2013). A problémát tovább súlyosbítja az, hogy az új és a rezisztens baktériumokkal szemben is hatékony antibiotikumok felfedezése rendkívül lelassult. Az antibiotikum fejlesztést ma már nem tartják gazdaságilag kifizetődő befektetésnek a gyógyszeripari cégek, mivel az antibiotikumokat viszonylag rövid ideig használják és alkalmazásuk legtöbbször gyors gyógyuláshoz vezet. Ezáltal az antibiotikumok kevésbé jövedelmezők, mint a krónikus betegségek (például cukorbetegség vagy pszichiátriai rendellenességek) kezelésére használt gyógyszerek. Mindezek mellett, egy új antibiotikum fejlesztése rendkívül drága és időigényes folyamat (2. ábra) és mivel a baktériumok

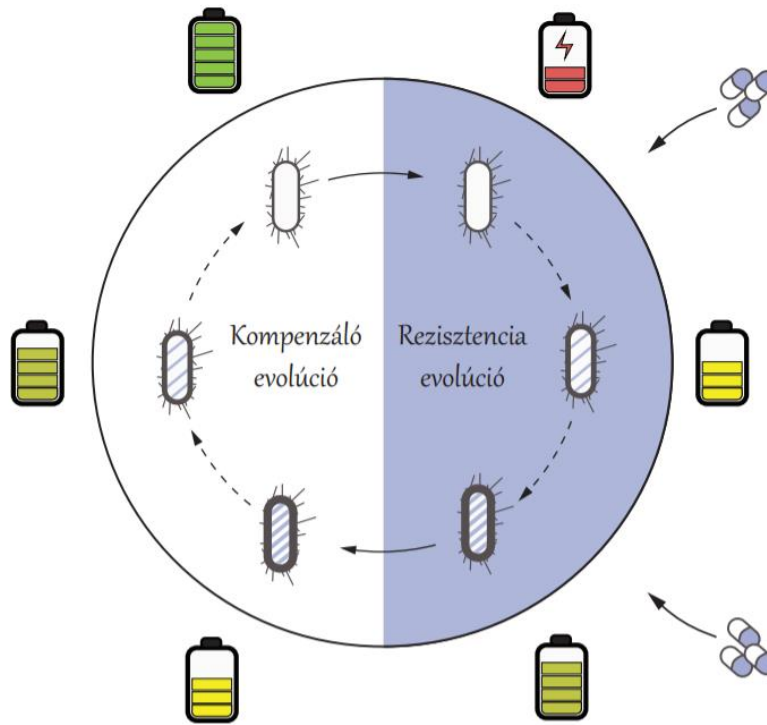
elég gyorsan képesek kifejleszteni a rezisztenciát, amivel hatástalanná teszik a gyógyszert, nem biztos, hogy hosszú távon használható lesz a készítmény. Ezen okoknak köszönhetően sok gyógyszeripari cég tart attól, hogy az új antibiotikumok fejlesztésébe fektetett dollármilliók nem térülnek meg (Ventola, 2015). Az eredményesen használható gyógyszerek hiánya és a rezisztens mikroorganizmusok terjedése világméretű problémához vezetett, amelynek a megértéséhez és a megoldásához részletesen fel kell térképeznünk, hogy milyen tényezők befolyásolják a rezisztencia megjelenését és terjedését.



2. ábra. Az antibiotikum fejlesztés részfolyamatainak átlagos időtartama (Payne és mtsai., 2007).

Az antibiotikum rezisztencia jelenségének vizsgálata azonban nem csak orvos-biológiai vonatkozásaiban fontos, hanem evolúcióbiológiai szempontból is jelentős, hiszen egyike azon kevés evolúciós folyamatoknak, amelyeket valós időben lehet vizsgálni (Martinez, 2014). Az evolúció biológusokat és a mikrobiológusokat egyre inkább érdekli a rezisztencia terjedését és fenntartását okozó folyamatok megértése, hiszen ezen információk segítségével képesek lehetünk megállítani vagy legalábbis késleltetni a rezisztencia terjedését és hozzájárulhatunk a megfelelő antibiotikum felhasználás kidolgozásához is (Blanquart és mtsai., 2018).

Az evolúció két legfontosabb mozgatórugója a variabilitás és a szelekció. Ezt a feltételezést az antibiotikum-rezisztencia számos egyszerű jelensége megerősíti, így például a genetikai variabilitást a random mutációk biztosítják, míg a szelekciót az antibiotikum jelenléte, mint stressz tényező. Ha ez a két paraméter emelkedést mutat, az maga után vonja a rezisztencia kialakulásának megnövekedett gyakoriságát is, mégpedig a rezisztens variánsok számának és antimikrobiális kezelés által kiváltott szelekció intenzitásának növekedésével (Lipsitch, 2001). Mindemellet a rezisztencia megjelenésének és stabilitásának másik igen fontos jellemzője a rezisztencia fitness költsége, azaz a rezisztencia mechanizmusoknak a baktérium növekedésére és túlélésére gyakorolt mellékhatásai (Andersson és Levin, 1999). Az antibiotikumnak történő kitettség során rezisztencia mechanizmusok fitness előnyt jelentenek a baktériumnak az antibiotikumokkal szemben érzékeny versenytársaikkal szemben, azonban gyógyszermentes környezetben ezek a mechanizmusok növelik a generációs időt és csökkentik a túlélés esélyét. Azonban az új antibiotikummentes környezethez alkalmazkodva a mikroorganizmusok képesek gyorsan és hatékonyan ellensúlyozni a rezisztencia okozta fitness költséget, mivel képesek revertálni az antibiotikum rezisztenciát biztosító mutációt vagy a fitnessüket másodlagos kompenzációs mutációk segítségével feljavítani **(3. ábra)**.



3. ábra. A baktériumok fitnessének (akkumulátor töltöttség) és rezisztenciájának (vonal jelölés) változása antibiotikummal történő kezelés alatt és antibiotikum felhasználásának korlátozása után: Optimális körülmények között (fehér terület) a baktériumsejt normál állapotban van (teljesen feltöltött akkumulátor a bal felső sarokban). Miután a baktériumokat antibiotikummal kezeljük (szürke terület) a rezisztencia mértéke emelkedik. Miután korlátoztuk az antibiotikum-felhasználást (fehér terület), a rezisztens baktériumok fitnessze csökken a rezisztencia mechanizmusok költsége miatt. Ezt a fitnessköltséget azonban csökkenthetik az antibiotikum hiányában felhalmozódó kompenzációs mutációk (pontosított vonalak a fehér területen) és ezzel egyidejűleg ezek a kompenzációs mutációk csökkenthetik a rezisztencia szintjét. Végül a baktériumsejt teljes mértékben helyreállítja a fitnessét, miközben ismét érékennyé válhat az antibiotikumokkal szemben.

A fentiek ismeretében az antibiotikum kezelések csökkentésére irányuló kampányok indultak el nemzetközi szinten is, alátámasztva azt a gondolatot, hogy ha körültekintően és csökkentett mértékben használjuk a baktériumellenes szereket, akkor képesek lehetünk visszaszorítani a mikroorganizmusokra ható szelekciós nyomást, amelyet a rezisztencia

csökkenése fog követni (Lipsitch, 2001). Ezen tanulmányok közül talán a legismertebb a makrolidok (pl. eritromicin) használatának csökkentése Finnországban az 1990-es években. Ennek hatására 4 év alatt 50%-kal csökkent a makrolid rezisztens *Streptococcus* kórokozók aránya az országban (Seppälä és mtsai., 1997). Hasonló kísérletet hajtottak végre Izlandon a β -laktám antibiotikumok alkalmazásának korlátozásával egy penicillin-rezisztens *Streptococcus pneumoniae* törzs elterjedésének megakadályozására. Ebben az esetben a penicillin-rezisztencia négy év alatt ~25%-kal csökkent (Austin és mtsai., 1999). Ezzel szemben Svédországban hiába vezettek be 24 hónapig tartó trimetoprim antibiotikum korlátozást, a rezisztens *Escherichia coli* kórokozók száma nem csökkent szignifikánsan (Sundqvist és mtsai., 2010b).

Számos laboratóriumi tanulmány is foglalkozik a rezisztencia stabilitás változásának lehetőségével antibiotikummentes környezetben (Marcusson és mtsai., 2009; Reynolds, 2000; Schrag és mtsai., 1997; Schrag és Perrot, 1996). Azonban ezen laboratóriumi kísérletek egyik általánosan elterjedt hiányossága az, hogy egyetlen rezisztenciát biztosító kromoszóma mutációt tartalmazó klónokat vizsgálnak. Ezzel szemben a klinikai izolátumokban többszörös rezisztencia mutációk biztosítják a gyógyszerekkel szembeni ellenálló képességet, emellett a klinikai populációkban kevésbé elterjedt a rezisztenciával járó fitness költség genetikai kompenzációja rezisztencia veszteség nélkül, mint a laboratóriumi törzsekben (MacLean és Vogwill, 2014).

Az említett eltérések miatt, máig nyitott kérdés az, hogy az antibiotikum alkalmazás korlátozása hozzájárulna-e a multidrog-rezisztens baktériumok háttérbe szorításához. Doktori munkám során a klinikai mikrobiológiai elveket és laboratóriumi evolúciós eljárásokat kombinálva arra kérdésre kerestem a választ, hogy a fitness javulásért felelős kompenzációs mutációk hatására milyen mértékben változik meg a rezisztencia mértéke antibiotikummentes környezetben, továbbá milyen molekuláris mechanizmusok befolyásolhatják a rezisztencia stabilitását.

II. Irodalmi áttekintés

II.1 Az antibiotikumok általános jellemzése és csoportosítása

Az antibiotikumnak a specifikus célmolekulájához való kapcsolódása eredményeként egy komplex, többszintű válaszreakció indul be a mikroorganizmusokban, amelyek biokémiai és molekuláris mechanizmusok révén meggátolják a baktériumsejt növekedését (bakteriosztatikus antibiotikumok), vagy olyan élettani folyamatokat zavarnak meg, amelyek a sejt halálához vezetnek (baktericid antibiotikumok) (Kohanski és mtsai., 2010). Az antibiotikumok lehetnek természetes-eredetű, más mikroorganizmusok által termelt vegyületek (például a *Penicillium notatum* penészgomba által termelt penicillin), vagy pedig ember által előállított félszintetikus vagy szintetikus származékok (Von Döhren, 2004). Az antimikrobiális szerek hatásának alapja a szelektív toxicitás, amely a humán sejtek és a mikrobák felépítésében, anyagcseréjében lévő különbséget használja ki: Az antimikrobiális szer toxikus a kórokozóra és nem, vagy pedig alig ártalmas a gazdaszervezetre. Ezt a szelektív toxicitást az teszi lehetővé, hogy az antibiotikumok hatásukat a mikroorganizmusnak olyan alkotórészére fejtik ki, amelyek az emberi sejtben nem találhatók meg (pl. a merev sejtfal), vagy olyan életfolyamatot gátol, amely az emlős szervezetben másképp megy végbe (nukleinsavsintézis, fehérjesintézis, stb.). Az alapján, hogy milyen létfontosságú sejtfunkciót gátolnak, az antibiotikumokat öt nagyobb csoportba sorolhatjuk: 1) sejtfal-sintézis gátlók, 2) fehérjesintézis gátlók, 3) DNS-sintézis gátlók, 4) RNS-sintézis gátlók és 5) folsav-sintézis gátlók (**1. táblázat**) (Kohanski és mtsai., 2010; Levy és Marshall, 2004; Von Döhren, 2004).

1. táblázat. Antibiotikumok és hatásmechanizmusaik. A kísérleteinkben használt – kivéve az RNS szintézis gátló – antibiotikumokat soroltuk fel példaként.

Hatásmechanizmus	Példák
Sejtfal szintézis gátlás	Cefoxitin, Ampicilin
Fehérje szintézis gátlás, 30S alegység	Doxiciklin, Tetraciklin, Aminoglikozidok
Fehérje szintézis gátlás, 50S alegység	Klóramfenikol, Eritromicin
DNS szintézis gátlás	Ciprofloxacín, Nalidixinsav
RNS szintézis gátlás	Rifampicin
Folsav szintézis gátlás	Trimetropim
Öszetett mechanizmusok	Nitrofurantoin

Az ampicillin (AMP) és cefoxitin (FOX), béta-laktám antibiotikumok, a sejtfalszintézis homeosztázisának zavarásával megváltoztatják a sejt alakját és méretét, indukálva ezzel a celluláris stressz választ, amely a sejt líziséhez vezet (Kohanski és mtsai., 2010). Pontosabban, ezek a béta-laktám antibiotikumok a bakteriális sejtfalat felépítő peptidoglikánokban a keresztkötés kialakulását gátolják, a kötést létrehozó transzpeptidáz enzimek, más néven penicillin-kötő fehérjék gátlása által. A gátlás során a béta-laktám antibiotikum a peptidoglikán helyett, a transzpeptidáz enzim aktív centrumába köt. A béta-laktám antibiotikumok okozta enzimaktivitás és sejtfal szintézis gátlás közvetett módon vezethet az SOS válasz kiváltásához, valamint a baktérium sejtek filamentációjához (Tipper és Strominger, 1965; Wise és Park, 1965).

A nalidixinsav (NAL) és a fluorokinolonokat képviselő ciprofloxacín (CPR) a DNS replikációban és a kromoszóma törések javításában résztvevő DNS giráz (topoizomeráz II) és topoizomeráz IV enzimek működését megakadályozva képesek a sejtölő hatásukat kiváltani (Karl Drlica és mtsai., 2008). Ez a gátlás azonban visszafordítható, tehát a DNS replikáció gátlása önmagában mindössze bakteriosztatikus hatást érhetne el, és a baktérium sejtek gyors pusztulása nem magyarázható ezzel a mechanizmussal (Karl Drlica és mtsai., 2008). A kinolonok általi gyors sejthalálért a replikáció gátlásából fakadó több másodlagos folyamat összhatása a felelős: Fő

folyamatként a kinolonok replikációs villákhoz való kötődése feltehetően széleskörű kromoszómafragmentációhoz vezet (K Drlica és Zhao, 1997), melynek hatását tovább erősíti a kinolonok által beindított SOS válasz, valamint a filamentáció (L. J. Piddock és mtsai., 1990).

A nitrofurán-származékok közé tartozó nitrofurantoin (NIT) összetett mechanizmusok révén fejti ki hatását, emellett különlegessége az, hogy hatása kifejtéséhez *in vivo* aktiválása szükséges (Guay, 2001). A baktériumokban található nitrofurán-reduktáz I enzim hatására olyan reaktív köztitermékek keletkeznek, amelyek egyrészt gátolják az Acetil-CoA szintézisét és a dehidrogenázok aktivitását, másrészt károsítják a riboszómákat és a DNS-t (Tu és McCalla, 1975). Ezeknek a gyógyszereknek a legjelentősebb aktivitása savas vizeletben figyelhető meg, ezért főleg húgyúti fertőzések kezelésére alkalmazzák. Mindemellett feltehetően széles hatásmechanizmusának köszönhetően a nitrofurantoin rezisztencia sokkal kevésbé elterjedt a klinikumban, mint más antibiotikum osztályok esetében (Kahlmeter, 2000).

A 30S riboszóma gátlók, mint például a tetraciklin (TET) és doxiciklin (DOX) blokkolják az aminoacil-tRNS riboszómához kötődését, ezáltal gátolják a fehérjeszintézis folyamatát. Azonban a transláció gátlása visszafordítható, hatásuk így csupán bakteriosztatikus (Chopra és mtsai., 1992). Ezzel szemben a szintén 30S riboszóma gátló antibiotikumok csoportjába tartozó aminoglikozidok baktericid hatásúak. A kanamicin (KAN) és a tobramicin (TOB) antibiotikumok az alegység 16S rRNS komponenséhez kötődve megváltoztatják az mRNS kodon és az ahhoz kapcsolódó aminoacil-tRNS által létrehozott komplex konformációját, aminek hatására hibás fehérjeszintézis történik (Fourmy és mtsai., 1996). Ennek hatására például hibás lesz a membránfehérjék beépülése a sejtmembránba, így a membrán integritása megbomlik, ami növeli a sejt permeabilitását és hosszú távon a sejt halálához vezet (Davis és mtsai., 1986). Az 50S riboszóma inhibitorok fizikailag gátolják a protein transláció iniciációját, vagy a peptidil-tRNS transzlokációját gátolva megakadályozzák a naszcens fehérje elongációját. Az általunk vizsgált makrolid típusú eritromicin (ERY) és az amfenikol típusú klóramfenikol (CHL) a fehérje lánc elongáció gátlásán keresztül fejtik ki hatásukat (Menninger és Otto, 1982).

A folsavszintézis gátlók csoportjába tartozó trimethoprim (TRM) a dihidrofolát reduktáz enzim aktív centrumához kötődve gátolja a folsav aktív formájának redukcióját, ezzel megakadályozza purin és végső soron a DNS szintézisét. A leggyakrabban előforduló rezisztencia

mechanizmus során egy olyan egy dihidrofolát-reduktáz enzim termelődik, amely kevésbé érzékeny a trimetoprim gátlására (Brogden és mtsai., 1982).

II.2. A bakteriális antibiotikum rezisztencia molekuláris mechanizmusa

A baktériumok rendelkeznek természetes védelemmel (intrinsic rezisztencia) mivel, szerkezeti vagy funkcionális jellemzőiknek köszönhetően képesek ellenállóvá válni egy adott antibiotikum hatásával szemben (J. M. A. Blair és mtsai., 2015). Például a daptomicin hatásosnak bizonyul Gram-pozitív baktériumok ellen, azonban Gram-negatív baktériumok ellen nem hatékony. Ennek az az oka, hogy a citoplazma membrán foszfolipid összetétele más a két csoportban, így a Gram negatív baktériumokban a daptomicin Ca^{2+} által közvetített, citoplazmatikus membránba történő beágyazódásának hatékonysága alacsonyabb, tehát az antibiotikum képtelen bejutni az adott mikroorganizmusba (Randall és mtsai., 2013). Ezen kívül természetes rezisztenciához vezethet még, ha az antibiotikum nem rendelkezik célmolekulával az adott sejtben, vagy ha bizonyos enzimek hatástalanítják a sejtben belül vagy még a bejutást megelőzően a sejtben kívül (Fernández és Hancock, 2012).

A szerzett rezisztencia mechanizmusok megszerzésére háromféle lehetősége van a baktériumnak: vagy az antibiotikummal szemben ellenállást biztosító, újonnan keletkező (endogén) mutációk megjelenése révén, de az is előfordul, hogy a rezisztenciát biztosító gének horizontális úton történő megszerzésével vagy a kettő kombinációjával (Michael N. Alekshun és Levy, 2007).

A szerzett rezisztencia három fő csoportba sorolható. Az első mechanizmus távol tartja az antibiotikumot a sejtben, a sejt felszínén található célpontjától, a baktérium olyan enzimet termel, amely kémiai úton inaktiválja a hatóanyag molekuláját. A rezisztencia elérésének második módja a baktériumsejtben belül hatásos antibiotikumszint kialakulásának a megelőzése. Ekkor az antibiotikum nem jut át a sejtmembránon, vagy ha be is jut, akkor egy aktív transzport folyamat visszajuttatja a környezetbe. A harmadik védekezési lehetőségre akkor kerül sor, ha az antibiotikum molekula aktív formában már bejutott a sejtbe és megfelelő transzportfolyamat híján ott hatékony koncentrációt alakított ki. Ilyenkor a rezisztens sejt az antibiotikumot a támadáspontjának megváltoztatása révén teszi hatástalanná (Munita és Arias, 2016).

II.2.a. Az antibiotikum inaktiválása vagy módosítása

Az antibiotikum inaktiváló enzimek három leggyakoribb csoportja a β -laktamázok, az aminoglikozid módosító enzimek és a klóramfenikol acetiltranszferázok (Goering és mtsai., 2008).

Antibiotikum inaktiváció hidrolízis által:

Ennek klasszikus esete a penicillin, cefalosporin és karbapenem típusú antibiotikumok béta-laktám gyűrűjének hidrolitikus hasítása a rezisztens baktérium által termelt béta-laktamáz enzim segítségével (Walsh, 2000). Ezek az antibiotikumok hatásukat úgy érik el, hogy a béta-laktám gyűrű irreverzibilisen beköt a sejtfal peptidoglikánjainak keresztkötését létrehozó transzpeptidáz enzim aktív centrumába és így fejt ki hatását. Azonban, ha béta-laktamáz széthasítja a béta-laktám gyűrűt, az képtelen lesz a transzpeptidáz enzimhez kötődni, ezáltal a sejtfal szintézis gátlása teljes mértékben megghiúsul (Walsh, 2000). Egy másik elterjedt hidrolitikus enzim az *E. coli* *ereB* génje által kódolt eritromicin észteráz II, ami az eritromicin lakton gyűrűjének hasításán keresztül alakítja ki a rezisztenciát (Kim és mtsai., 2002).

Antibiotikum inaktiváció transzferázok által:

Ebben az esetben a deaktiváló enzimek foszfát-, acetyl-, vagy adenil-csoporttal látják el az antibiotikumokat, így például az aminoglikozid antibiotikumok kisebb affinitással lesznek képesek kötni a 30S riboszómális alegységhez és kevésbé gátolja a fehérjeszintézist (Strateva és Yordanov, 2009). A klóramfenikol acetiltranszferáz pedig a klóramfenikol módosításával és ezzel az 50S egységhez való kötődés megakadályozásával alakítja ki a rezisztenciát (Tolmasky, 2000).

II.2. b. Az antibiotikum célpontjának módosítása vagy megkerülése

Az antibiotikum és a célpontja között specifikus és érzékeny kapcsolat van, ezért már egy kis változás a célpont molekulában meg tudja akadályozni az antibiotikum ahhoz történő kötődését (Džidić és mtsai., 2008). Az ilyen módosítások általában a normál funkciók működését továbbra is lehetővé teszik és nagymértékű rezisztenciát biztosíthatnak az adott antibiotikummal szemben (J. M. A. Blair és mtsai., 2015). Például, a makrolid antibiotikumok a riboszóma 50S alegységéhez kötődnek, azonban az *erm* gén által termelt enzim poszttranszkripcionálisan (Avison, 2005)

metilálja ezt a célpontot, ezáltal csökkenti az antibiotikum kötődési affinitását (Kim és mtsai., 2002). A DNS szintézist zavaró antibiotikumok ellen leggyakrabban két, eltérő enzimben történik módosítás, a DNS girázban (*gyrA* és *gyrB* gének mutációja) és a topoizomeráz IV-ben (*parC* és *parE* gének mutációja). A *gyrA* gén mutációja révén csökken az antibiotikum kötődési képessége a DNS-fehérje komplexhez. Például a ciprofloxacín antibiotikum a módosítást követően nem tud kötődni a DNS giráz A alegységéhez (Tolmasky, 2000). További például szolgálhat a sejtfalszintézis gátló penicillin elleni rezisztencia mechanizmus is, ebben az esetben a peptidoglikánok szintézisében résztvevő penicillinkötő fehérjék struktúrája változik meg oly módon, hogy a β -laktám antibiotikumok nem képesek hozzájuk kötődni (Giedraitienė és mtsai., 2011).

A rezisztencia nem csak az adott célmolekula módosításával jöhet létre, hanem annak elkerülésével is egy alternatív, nem érzékeny célpont biztosításával. A baktérium ilyenkor szert tesz egy olyan fehérjére, mely a célpont szerepét képes átvenni a sejtben, az adott antibiotikumra azonban nem érzékeny (Avison, 2005). Erre a mechanizmusra szolgálhat például az a plazmidon megszerezhető dihidrofolát-reduktáz (DHFR) enzim, mely a TRM antibiotikumra nem érzékeny, azonban a sejt saját, a trimetoprim által gátolt DHFR enzim normál működését helyettesíteni tudja, ezáltal biztosítva trimetoprim rezisztenciát a baktérium számára (Huovinen és mtsai., 1995).

II.2. c. Az antibiotikum intracelluláris felhalmozódásának akadályozása

Ahhoz, hogy egy antibiotikum ki tudja fejteni a 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 antibiotikus hatást kifejteni (Walsh, 2000). A rezisztencia megvalósulhat a membrán permeabilitás csökkentése által, vagy a bejutott antibiotikumok aktív kijuttatása révén efflux pumpák segítségével. Az antibiotikumok számára két lehetséges útvonal áll rendelkezésre a külső membránon való átjutáshoz: 1) A hidrofób antibiotikumok (aminoglikozidok és makrolid antibiotikumok) a lipid-mediálta útvonalon juthatnak át a külső membránon, (2) míg a hidrofíl antibiotikumok (β -laktám antibiotikumok) az általános diffúziós porin csatornákon keresztül tudnak bejutni a sejtbe (Delcour, 2009). Egy átmeneti csoportot képeznek a tetraciklinek

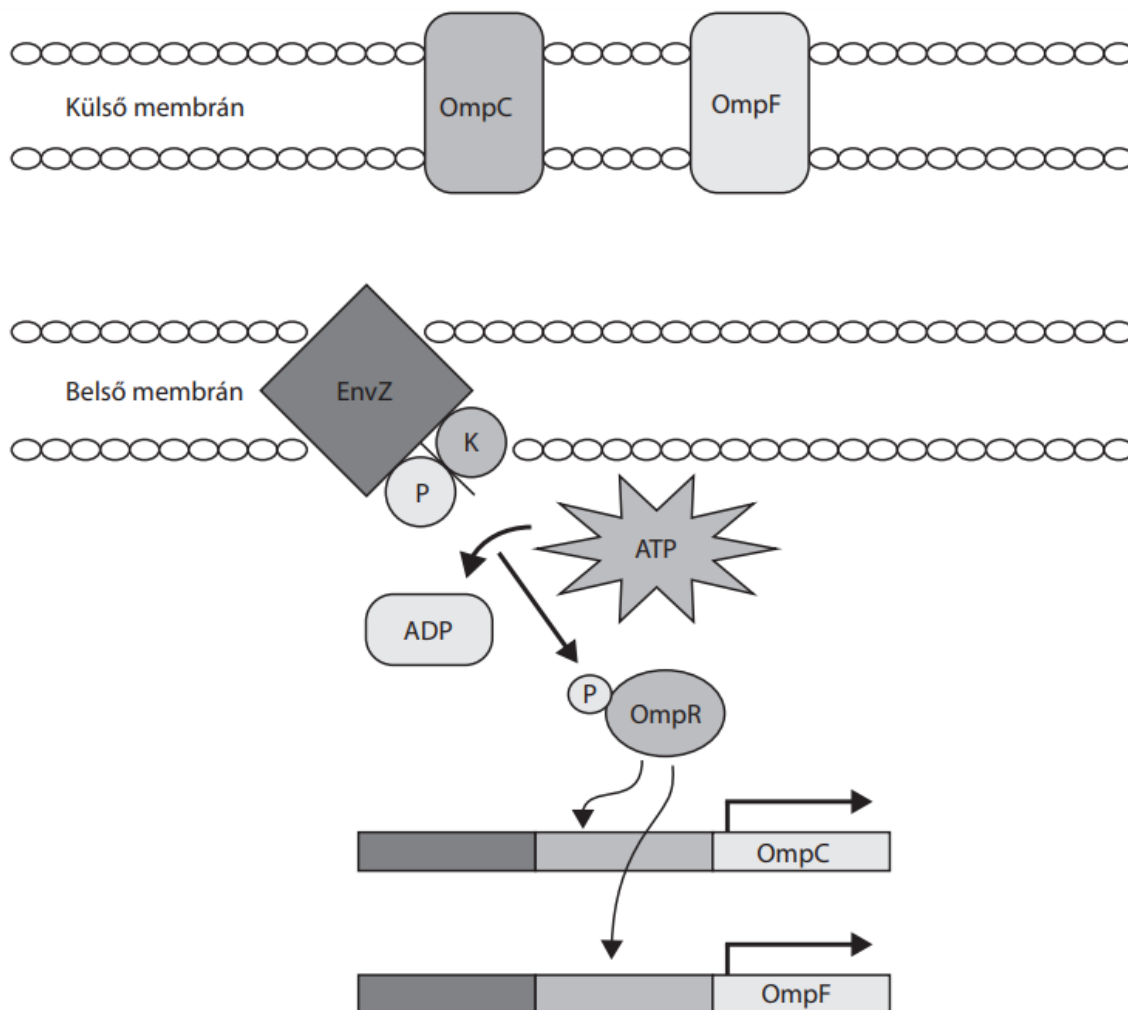
(tetraciklin, doxiciklin) és a fluorokinolonok (ciprofloxacín, nalidixinsav), amelyek képesek mind a lipid-mediálta, mind a porin-mediálta útvonal használatára (H Nikaido és Thanassi, 1993).

A membrán permeabilitás csökkentése:

A külső membrán az első védelmi gát a Gram-negatív baktériumok toxikus anyagok elleni védelmében. Ez a lipid kettősréteg különböző protein csatornákat (porin csatornák) tartalmaz, amelyek segítségével a baktérium képes felvenni a tápanyagokat és az antibiotikumokat is. A különböző porinok aktivitásuk szerint lehetnek nem-specifikusak, specifikusak, vagy szelektív csatornák; szerkezetük szerint pedig vagy monomerek vagy trimerek. *E. coli*-ban a három legismertebb porin az OmpC és OmpF, melyek a kationos molekulákat részesítik előnyben, illetve a PhoE, amelyen főleg szerves foszfátok és anionok jutnak keresztül (Nikaido, 2003). A porinok száma a baktériumsejtben meglehetősen magas lehet (akár 10^6 darab). Azonban környezeti ingerekre reagálva a sejtek képesek a porinok expresszióját szabályozni, ezáltal a membránjuk átjárhatóságát megváltoztatni (Achouak és mtsai., 2001). Antibiotikum stresszre adott válaszként csökkenhet a porinok mennyisége, vagy korlátozódhat a porinok átjárhatósága, illetve egy mutáció ronthatja is a csatornák működését (Pagès és mtsai., 2008). Mindezek a változások az antimikrobiális szerek korlátozott, lényegesen lassabb diffúzióját eredményezik, különösen a β -laktám, fluorokinol, tetraciklin és klóramfenikol antibiotikumok esetében. A porin elvesztésének az antibiotikum rezisztenciára gyakorolt hatása évtizedek óta ismert és számos baktériumfajban azonosítottak porint érintő rezisztencia mutációkat (Fernández és Hancock, 2012). Például egy *Enterobacter sp.* izolátumban egyetlen, az *ompF* promóter régióban található pontmutáció hússzoros csökkenést okozott az *ompF* gén expressziójában, ami nagyfokú ertapenem rezisztenciát biztosít a baktérium számára (Doumith és mtsai., 2009). Noha a leírt vizsgálatok nagy része az *ompF* génre összpontosít, mivel az jól ismert szerkezeti és funkcionális tulajdonságokkal rendelkezik más fő porinokhoz képest, nem szabad figyelmen kívül hagyni a kisebb porinokat (mint például az NmpC) és a speciális körülmények között kifejezett porinokat (mint például a PhoE) sem. Például a PhoE még jobb átjárhatóságot is biztosít, mint az OmpF és az OmpC porinok, ha az antibiotikum negatív töltéssel rendelkezik (H. Nikaido és mtsai., 1983).

A porinokat befolyásoló mutációk másik típusa azokra a szabályozó fehérjékre és génekre hat, amelyek a porint kódoló gének expresszióját szabályozzák (Pratt és mtsai., 1996). A két génből álló *ompB* operon által kódolt fehérjék egyike, az EnvZ hisztidin kináz az ozmolaritás

változásra reagálva foszforilálja a másik fehérjét, az OmpR transzkripciós faktort, amely ennek hatására megváltoztatja az *ompC* és *ompF* expressziós szintjét (**4. ábra**) (Cai és Inouye, 2002). Az *ompB* lókuszon kívül számos más fehérjéről, mint például a Rob, SoxS és MarA, valamint a kis RNS-ekről, mint például a MicF ismert, hogy részt vesznek a porin gének transzkripciójának a szabályozásában (De la Cruz és Calva, 2010). Ezen lókuszok bármelyikének mutációi az antibiotikumokkal szembeni rezisztencia változásaihoz vezethetnek. Összességében azok a mutációk, amelyek a porinok elvesztéséhez vagy megváltoztatásához vezetnek közvetlenül befolyásolják a rezisztenciát azáltal, hogy korlátozzák az antibiotikum bejutásának sebességét a sejtbe és ezáltal növelik a másodlagos rezisztencia mechanizmusok (pl. efflux és degradációs enzimek) hatását (Fernández és Hancock, 2012).



4. ábra. Az *Escherichia coli* EnvZ/OmpR ozmoregulációs rendszerének grafikus ábrázolása (Pienaar és mtsai., 2016).

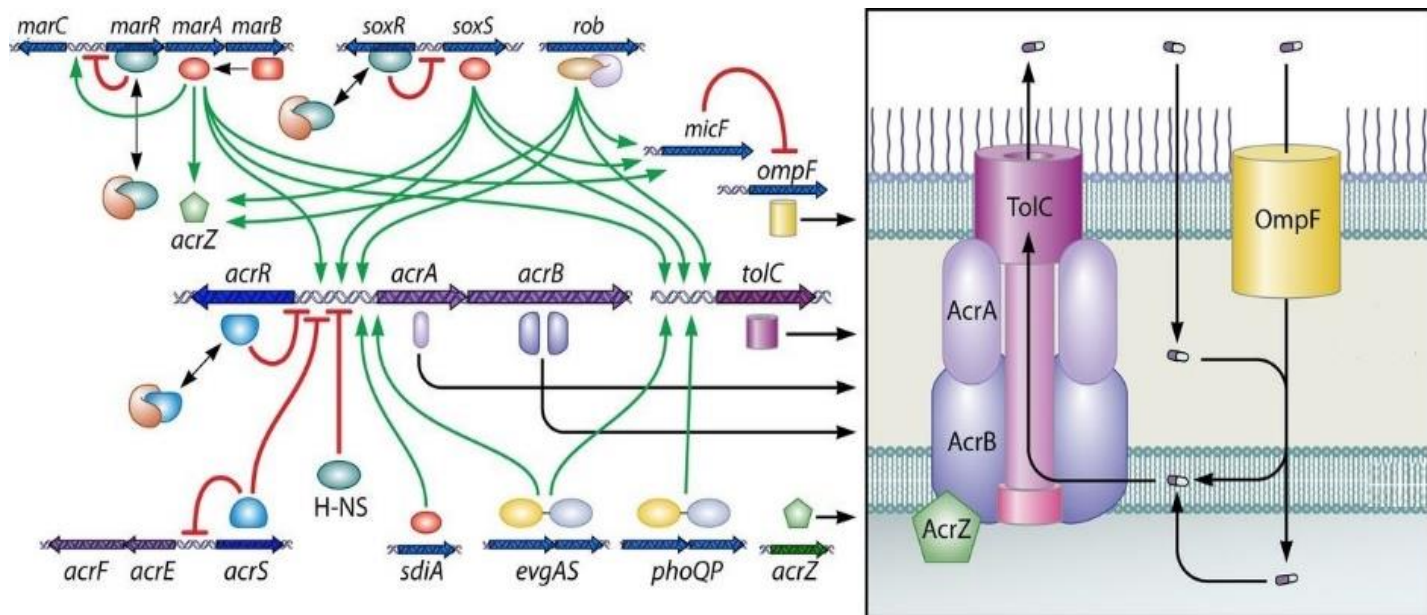
Az antibiotikum efflux növelése:

Az efflux pumpák olyan transzport fehérjék, melyek aktív módon pumpálják ki a mérgező anyagokat (köztük számos klinikailag releváns antibiotikumot) a sejtől a környezetbe. Ezek a pumpák lehetnek specifikusak egy adott szubsztrátra (pl. a tetraciklin/proton antiporter), vagy kipumpálhatnak szerkezetileg teljesen eltérő szubsztrátokat is (például több eltérő osztály antibiotikumait) (Webber és Piddock, 2003). Ezeket multidrog efflux pumpáknak nevezzük. Számos multidrog efflux pumpát írtak már le amelyek közül különösen fontosak a „Resistance-

Nodulation- Division” (RND), „*major facilitator superfamily*” (MFS), „*multidrug and toxic compound extrusion*” (MATE), „*small multidrug resistance*” (SMR) és az „*ATP-binding cassette*” (ABC) szupercsaládok vagy családok. Az ABC transzporterek energiaforrásként az ATP hidrolízist használják, míg az összes többi pumpa család működése a protonmotoros erőtől függ, így másodlagos transzportereknek tekinthetők (Li és mtsai., 2015). A transzporterek szubcelluláris elhelyezkedésükben is különböznek, az RND efflux pumpák nem csupán a belső membránon át a periplazmáig juttatják ki a szubsztátjaikat, hanem az intracelluláris térből mindkét membránon áthaladva egyenesen a sejten kívüli környezetbe is (Nikaido, 1989, 2003). Ezzel szemben az MFS és az SMR pumpák kevésbé hatékonyak, mivel a gyógyszermolekulákat csak a periplazmáig juttatják el, így azok spontán módon visszadiffundálhatnak a citoszolba. Azonban az RND pumpák, amelyekről azt gondolják, hogy az antibiotikumokat elsősorban a periplazmából gyűjtik össze (Aires és Nikaido, 2005; H Nikaido, 1996) együttműködhetnek az MFS és az SMR pumpákkal és ez által növelik hatékonyságukat (A. Lee és mtsai., 2000). A legalaposabban jellemzett RND efflux pumpa rendszer az *E. coli*-ban 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 (J. M. Blair és mtsai., 2014; Du és mtsai., 2014). Ezenkívül még négy funkcionálisan elkülöníthető csoportot azonosítottak a RND családban: AcrEF, AcrD, YhiUV és az MdtABC pumpákat. Azonban az *acrEF*, *yhiUV* és *mdtABCD* génekben végzett génkiütéses kísérletek nem változtattak a vad típusú *E. coli* sejtek antibiotikum érzékenységén, ami arra utal, hogy ezek a pumpák nem játszanak jelentős szerepet az antimikrobiális rezisztencia kialakulásában (Sulavik és mtsai., 2001). Érdekes módon az AcrF fehérje (AcrB hiányában) képes kapcsolódni az AcrA fehérjével és TolC csatornával, ami az sugallja, hogy az RND család összetevői cserélhetőek lehetnek egymással (Kobayashi és mtsai., 2001).

Az efflux pumpát és a porin csatornákat érintő rezisztencia mechanizmusok nem izoláltan fordulnak elő, hanem leggyakrabban együtt vannak jelen a baktériumban és közös szabályzó rendszer hathat rájuk (Nikaido, 1989). Az AcrR lokális represszor negatív hatással van az AcrAB és önmaga expressziójára is (Ma és mtsai., 1996). Ezzel szemben a három legnagyobb globális regulátor, a MarA, a SoxS és a Rob pozitívan befolyásolja az AcrAB, TolC és *micF* kifejeződését. A *micF* gén pedig az *ompF* gátlásával hat a porin csatornákra (Li és mtsai., 2015). A „*multiple antibiotic resistance*” (Mar) lókuszt két eltérő transzkripció egységet tartalmaz a *marRAB*-t és a

marC-t, amelyek egy közös operátor / promóter régióból (*marO*) íródnak át (M. N. Alekshun és Levy, 1997). A MarA nemcsak pozitívan szabályozza a *marRAB* expresszióját, hanem részt vesz több, mint hatvan egyéb gén szabályozásában is (Barbosa és Levy, 2000), míg a MarB mint egy finomhangoló szabályozza a *marA* expresszióját (Nichols és mtsai., 2011). A két további globális aktivátor, a SoxS (az oxidatív stressz *soxRS* regulon effektorja) és a *Rob* szintén kötődhetnek a *marO*-hoz és serkenthetik a *mar* regulon génexpresszióját, így hatással vannak az *acrAB* és a *tolC*-génekre is (M. N. Alekshun és Levy, 1997). A MarA és a SoxS expressziójának változását általában a rokon represszorok, a MarR és a SoxR mutációi okozzák (Oethinger és mtsai., 1998). A *tolC* expressziója függ az EvgAS-tól és egy másik kétkomponensű rendszertől, a PhoPQ-tól. Ezek a rendszerek szignál-transzdukciós kaszkádot alkotnak és egy B1500 nevű membrán proteinnel kapcsolódnak össze, amelynek expresszióját közvetlenül az EvgSA szabályozza (Zhang és mtsai., 2008). Összességében, különböző körülmények között ezek a többszörös szabályozó mechanizmusok együttesen képesek multidrog-rezisztens fenotípust előállítani azáltal, hogy lehetővé teszik a különböző antibiotikumok csökkentett beáramlását (csökkent OmpF porin számon keresztül) és megnövekedett kiáramlását (AcrAB-TolC efflux pumpán keresztül) (5. ábra).



5. ábra. Az *E. coli* AcrAB-TolC efflux rendszerének expressziójának szabályozása. Az *acrAB* és a *tolC* gének transzkripciója általában több szintű közös szabályozók által vezérelt (Li és mtsai., 2015).

II.3. Az antibiotikum rezisztencia terjedése és stabilitása

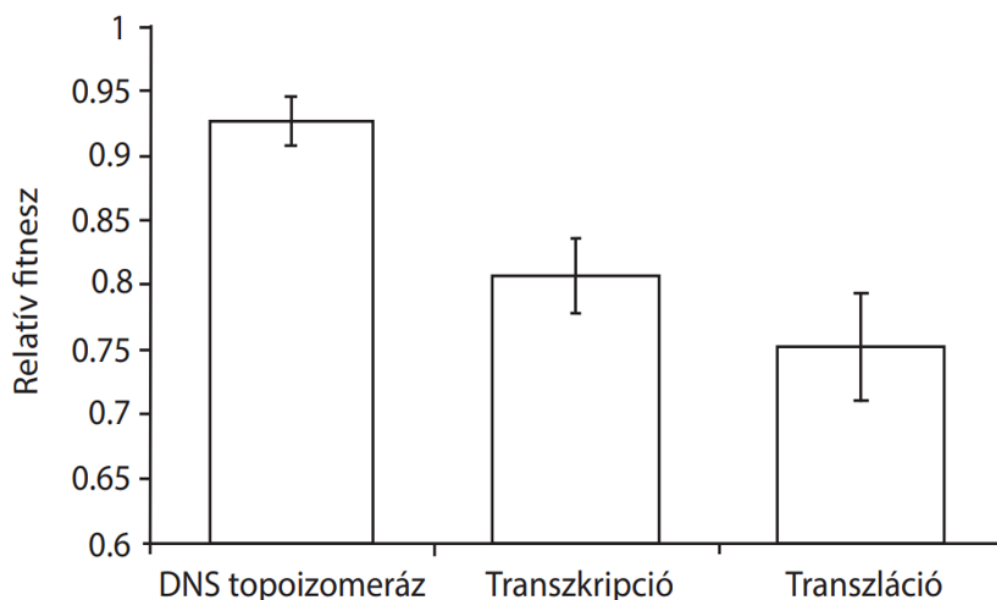
Az antibiotikum rezisztencia megjelenése, terjedése és stabilitása a baktérium populációban számos tényezőtől függ: *a*) a gyógyszerhasználat (és így a szelekciós nyomás) mértékétől, *b*) a rezisztenciát biztosító mutációk megjelenésének gyakoriságától, *c*) a rezisztencia fitness költségétől és *d*) a rezisztencia genetikai kompenzációjának mértékétől és gyorsaságától (Bjorkman és Andersson, 2000). A felhasznált antibiotikum mennyisége a fő szelekciós nyomás, amely hozzájárul a rezisztencia megjelenésének gyakoriságához. Az elmúlt évtizedekben bevezetett antimikrobiális gyógyszerek a túlzott és nem megfelelő felhasználásuk miatt igen gyorsan elvesztették a hatásosságukat és számos ellenálló baktérium törzs megjelenéséhez vezettek (Austin és mtsai., 1999; Bonhoeffer és mtsai., 1997). Azonban néhány klinikai jelentés alátámasztja azt a gondolatot, hogy ha körültekintően és csökkentett mértékben használjuk a baktériumellenes szereket, akkor képesek lehetünk visszaszorítani a baktériumokra ható szelekciós

nyomást, amely a rezisztencia csökkenéséhez vezethet. Például Izlandon a penicillin-rezisztens *pneumococcusok* gyakorisága gyorsan növekedett az 1980-as évek végén. 1992 és 1995 között intézkedéseket hoztak a gyermekek antibiotikumok fogyasztásának csökkentésére, amelynek eredményeként a rezisztencia 1993-ban tetőzött 19,8%-kal, majd csökkent (Kristinsson, 1997). Finnországban, a makrolid antibiotikumok használatának országos csökkentése után, az eritromicin-rezisztencia gyakorisága az 1992-es 16,5%-ról 4 év alatt 8,6%-ra csökkent (Seppälä és mtsai., 1997). Azonban az elméleti megfontolások és a kísérleti tanulmányok is azt sugallják, hogy a kórházakban alkalmazott csökkentett antibiotikum-alkalmazás a rezisztencia gyakoriságának gyorsabb és kiterjedtebb csökkenéséhez vezethet, mint a közösségben alkalmazottaké (M. Lipsitch és mtsai., 2000).

A rezisztens mutánsok képződésének sebességét a bakteriális mutációk megjelenésének gyakorisága és a populáció mérete határozza meg (Taddei és mtsai., 1997). A természetben ritkán, vagy csak rövid ideig előforduló állandó növekedési körülmények között egy klonális populáció számára „előnyös”, a spontán mutációs rátáját alacsony szinten tartani a káros mutációk megjelenésének megelőzése végett. Ugyanakkor a mutációk határozzák meg az evolúció ritmusát és módját, és maga a mutációs ráta is alanya az evolúciós folyamatoknak (Sung és mtsai., 2012). A változó környezeti feltételekhez és stresszkörülményekhez való sikeres alkalmazkodáshoz azonban a populáció számára kifejezett előnyt jelent azoknak a mutátoroknak nevezett egyedeknek a jelenléte, amelyek megemelkedett spontán mutációs rátával rendelkeznek. A mutátorok lehetővé teszik a különböző stresszkörülményekhez való gyors alkalmazkodást a természetben, laboratóriumi és klinikai körülmények között egyaránt (Denamur és mtsai., 2002; Oliver és mtsai., 2000). Erős szelekciós nyomás mellett a mutátor genotípusok gyorsan elterjedhetnek a populációban, (LeClerc és mtsai., 1996) ezáltal jelentős szerepet töltenek be a mikrobiális evolúcióban (Sniegowski és mtsai., 1997). Az emelkedett mutáció-generáló képesség azonban kettős következménnyel jár: egyrészt csökkentheti a fitneszt a káros mutációk megjelenése miatt, másrészt viszont előfeltétele az evolúcióra való képességnek. (Giraud és mtsai., 2001). Ennek megfelelően evolúciós sikerességükhöz a baktérium populációknak folyamatosan finomhangolni szükséges a mutációs rátájukat (Denamur és Matic, 2006). A baktériumok például felhasználhatják a génamplifikációt a szelektív feltételekhez való alkalmazkodáshoz (Andersson és mtsai., 1998). Például *E. coli*-ban kimutatták, hogy az *ampC* β -laktamáz gén amplifikálódik a penicillin

szelekcióra adott válaszként (Edlund és Normark, 1981). A génmásolatok száma arányos a β -laktamáz mennyiségével, az ampicillin-rezisztencia pedig arányos a termelt enzim szintjével.

A rezisztens klónok fennmaradását befolyásoló tényezők közül az egyik legfontosabb a rezisztencia fitneszköltsége, ami hatással van a baktériumok növekedésére és túlélésére. Az antibiotikummal való találkozása során a rezisztencia mechanizmusok fitnesz előnyt jelentenek a baktériumnak a szenzitív versenytársaival szemben. Gyógyszermentes környezetben azonban ezek a mechanizmusok növelik a generációs időt és csökkentik a túlélés esélyét (Andersson, 2006). A kromoszómális mutációk által okozott rezisztencia elsősorban a célmolekulák módosításával történnek. Az ezeket érintő kromoszómális gének felelősek a sejtek alapvető aktivitásáért, ezért indokolt feltételezni, hogy egy rezisztenciát biztosító mutáció befolyásolhatja a növekedés ütemét és csökkentheti a fitneszt. Például a rifampicin rezisztenciáért felelős RNS polimeráz β alegységét kódoló *rpoB* gén mutációi csökkenthetik a transzkripció hatékonyságát és korlátozhatják a növekedési sebességet (Reynolds, 2000), míg a riboszómális proteint kódoló *rpsL* gén sztreptomicin rezisztenciát okozó mutációja, az elongációs ráta csökkentésével járul hozzá a fitnesz költséghez (Kurland és mtsai., 1996). Összességében megállapíthatjuk, hogy a kromoszómális rezisztencia mutációk molekuláris alapja szignifikánsan befolyásolja a rezisztencia költségeit. Általában a DNS-topoizomerázok mutációi kevésbé költségesek, mint a transzlációt befolyásoló mutációk vagy az RNS gének mutációi (**6. ábra**) (Vogwill és MacLean, 2015).

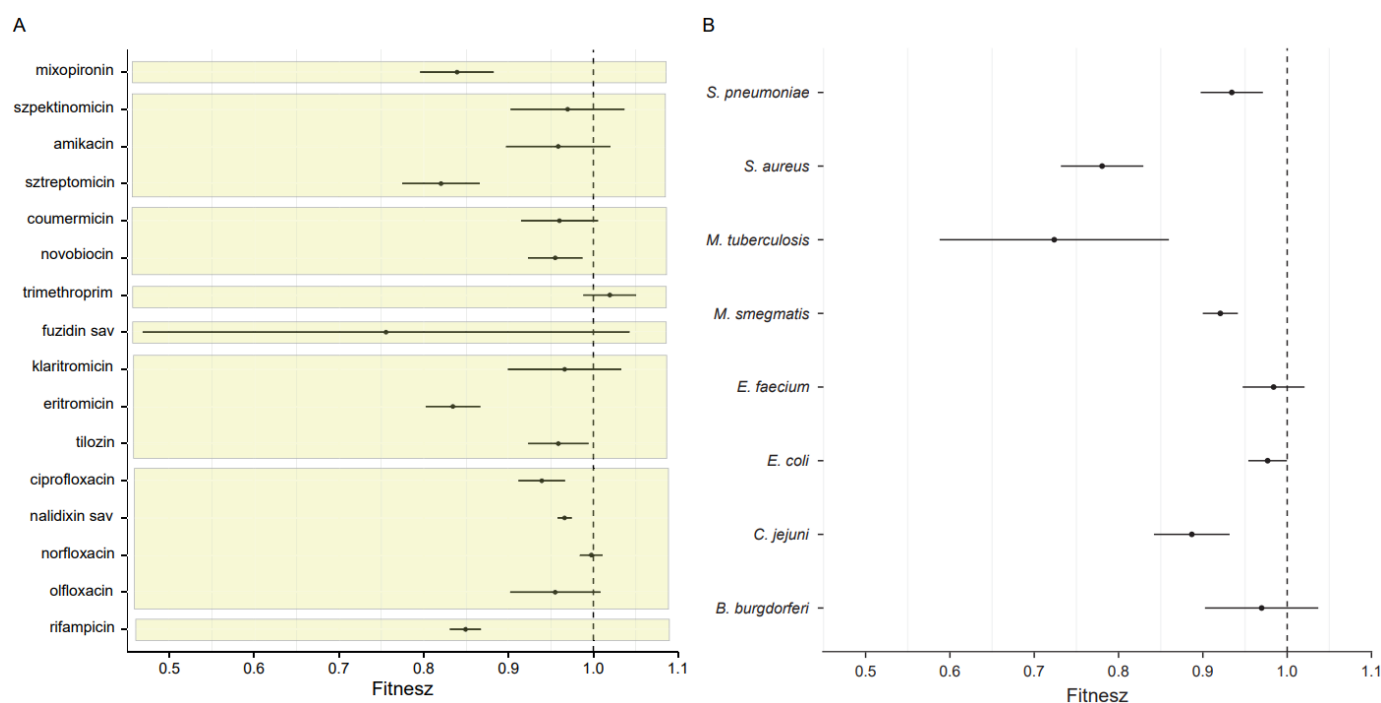


6. ábra. A különböző célpontokat kódoló génekben bekövetkező, rezisztenciát eredményező mutációk fitneszköltsége. Az oszlopok a DNS-topozimeráz-inhibitor, transzkripciós inhibitor vagy transzlációs inhibitorral szembeni egyetlen rezisztencia mutáció átlagos fitneszköltségét jelentik (Vogwill és MacLean, 2015 alapján).

Fontos megjegyezni, hogy a fenti megállapítások egyszeres mutáns törzsek vizsgálatára épülnek, azonban az antibiotikum rezisztenciát sokszor több, független mutáció alakítja ki. Ezáltal a mutációk episztatikus hatása sem hanyagolható el. Például a legtöbb fluorokinolon-rezisztens klinikai izolátum nem csak többszörös mutációkat hordoz a DNS-topozimerázokban, hanem gyakran társul ezek mellé efflux pumpát befolyásoló mutáció is (Jalal és mtsai., 2000). A pozitív episztázis elősegítheti a rezisztencia stabilitását, mivel elképzelhető, hogy a külön-külön költséges rezisztencia mutációk együttesen kevésbé hatnak a növekedési rátára. Ezzel szemben a negatív episztázis lassítja a rezisztencia kialakulását, mivel ebben az esetben az egymást követő rezisztencia mutációk tovább súlyosbítják egymás költségeit (Vogwill és MacLean, 2015). Egy másik lehetséges komplikáció, az olyan rezisztencia mutációk előfordulása, amelyek nem csökkentik a fitnesszt. A „költségmentes” rezisztencia mutáció egyik példája a *rpsL* gént érintő AAA₄₂ (Lys)->AGA₄₂ (Arg) szubsztitúció, mely *E. coli*-ban a sztreptomycin rezisztenciáért felelős (Schrag és mtsai., 1997) vagy például az *rpoB* génnek TCG₅₃₁ (Ser)->TTG₅₃₁(Leu) szubsztitúciója

amely *Mycobacterium tuberculosis* törzseknek biztosít fitness költség nélküli rifampicin rezisztenciát (Billington és mtsai., 1999).

Egy átfogó meta-analízis tanulmány (Melnik és mtsai., 2015) azt mutatta ki, hogy a rezisztencia mutációk költsége különbséget mutat attól függően, hogy mely antibiotikummal szemben biztosít rezisztenciát. Például a fehérjeszintézisre ható sztreptomycin elleni mutáció általában nagyobb költséget jelent mint egy a folsav szintézisre ható trimetoprim rezisztenciára jellemző mutáció. Azonban ugyanazon mutációk más genetika háttéren (más fajokban) más fitnessköltséget mutatnak (7. ábra).

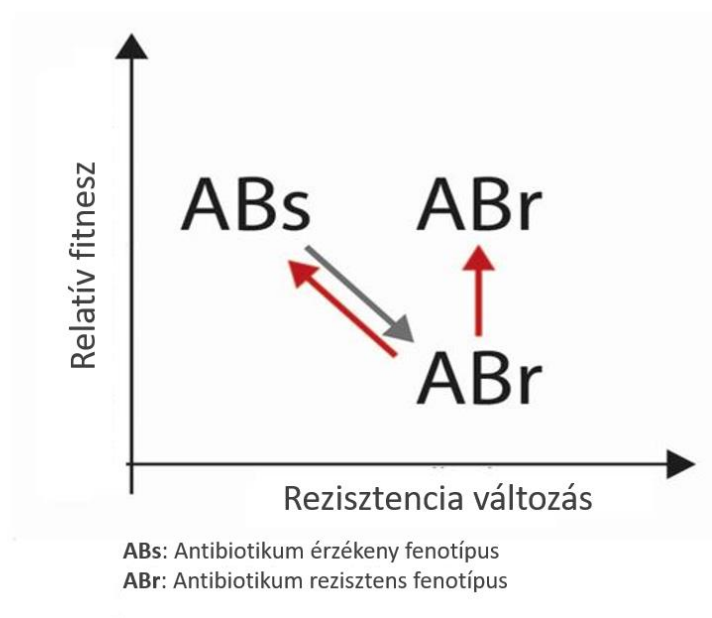


7. ábra. A: Az adott antibiotikumokkal szembeni rezisztencia mutációk átlagos relatív fitness értéke. B: Egy adott fajhoz kapcsolódó antibiotikum rezisztencia mutációk átlagos relatív fitness értéke (Melnik és mtsai., 2015).

II.4 A fitness javulása: kompenzáló evolúció

Antibiotikum jelenlétében a rezisztencia mutációk elterjednek a populációban, azonban kezelés után az addig előnyt biztosító mutációk, károssá válhatnak ebben az új gyógyszermentes környezetben. Azonban a rezisztens baktériumok ehhez az új, antibiotikummentes környezethez adaptálódva képesek gyorsan és hatékonyan ellensúlyozni a káros hatásokat (Andersson és Hughes, 2010). Ezt a jelenséget nevezzük kompenzáló evolúciónak amikor egy már hátrányos hatású mutáció a genom egyéb területein adaptív evolúciót indukál, így megjelenhet egy az eredetitől független mutáció, amely az eredeti mutáció káros fitnesshatását (és egyidejűleg akár a rezisztenciára gyakorolt hatását) részben, vagy egészben kijavítja (**8. ábra**). Az ilyen kompenzáló mutációk specifikusak a kezdeti káros genetikai változásra. Ez a specificitás azt jelenti, hogy interakció van a mutációk között, mivel együttes hatásuk különbözik attól, amit egyedi hatásaik alapján várnánk (Weinreich és Chao, 2005). Ezek lehetnek akár kis, kvantitatív eltérések is, ugyanakkor a kompenzáció legnyilvánvalóbb eseteiben a kompenzáló mutáció csak az eredeti káros mutációs háttéren előnyös, vad háttéren akár hátrányos is lehet.

A rezisztencia fitnessköltségeinek genetikai kompenzációja a következők révén történhet: a) a rezisztencia gén reverziója vagy elvesztése, b) a rezisztenciáért felelős gén genetikai változásai, és c) a rezisztencia gén intra- vagy extragenikus szuppressziója.



8. ábra. A kompenzáló evolúció hatása a fitnessz és a rezisztencia változására

A kompenzáló mutációk rögzülését a populációban befolyásolja azok aránya, a fitnessz költség mértéke és a baktérium populáció mérete (Bjorkman és Andersson, 2000). A kompenzáció több különféle mechanizmuson keresztül történhet. Az első és talán a leggyakoribb mechanizmus a megváltozott RNS vagy fehérje szerkezetének és működésének helyreállítása intragén mutációk révén, azonban az is előfordul, hogy a mutált funkciót egy alternatív lehetőség váltja fel (Maisnier-patin és Andersson, 2004).

Rendszerint egy második mutáció következtében javul a fitnessz, míg a reverzió igen ritkán fordul elő. Egy 10^6 sejtes populációval számolva a revertáló mutáció várhatóan csak minden ezredik generációban jelenik meg (MacLean és Vogwill, 2014).

A rezisztencia költségeinek kompenzációval történő csökkentésére irányuló evolúciós kísérletek antibiotikum jelenlétében és hiányában történnek laboratóriumi közegben vagy kísérleti állatokban. A laboratóriumi kompenzációs evolúciós kísérletek javarészt azt igazolják, hogy a fitnessz javulást előidéző másodlagos mutációk nem vonnak maguk után rezisztencia csökkenést (**2. táblázat**) (Andersson és Hughes, 2010).

2. táblázat. *A laboratóriumi kompenzációs evolúciós kísérletekben megjelenő rezisztencia mutációk és az antibiotikummentes evolúciót követő rezisztencia változások (Andersson és Hughes, 2010).*

Baktérium	Rezisztencia mutáció	Rezisztencia a kompenzáló evolúciót követően	Lab. objektum
<i>Salmonella enterica</i>	<i>rpsL</i>	Megmarad	egér
	<i>gyrA</i> (Nalidixsav)	Megmarad	egér
	<i>rpoB</i> (Rifampicin)	Megmarad	egér
	<i>fusA</i> (Fuzidinsav)	Elveszik	egér
	<i>fusA</i> (Fuzidinsav)	Gyakran megmarad	lab. tápközeg
	<i>fnt</i> és <i>fold</i>	Gyakran megmarad	lab. tápközeg
<i>Escherichia</i>	<i>rpoB</i> (Rifampicin)	Megmarad	lab. tápközeg
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>fus</i> (Fuzidinsav)	Megmarad	lab. tápközeg
	<i>rrl</i> (Linezolid)	Elveszik	lab. tápközeg
<i>Neisseria sp.</i>	<i>sul2</i> (Szulfonamid)	Megmarad	humán

Egy klasszikus kísérletben Schrag és Perrot (1996) azt vizsgálták, hogy miként változik meg a sztreptomycin rezisztens klónok rezisztenciája antibiotikum hiányában. Várakozásaikkal ellentétben azt találták, hogy a rezisztencia stabilan fennmaradt antibiotikum hiányában, mert a rezisztens klónok alkalmazkodtak egy második kompenzációs mutáció segítségével (Schrag és mtsai., 1997). Azóta számos tanulmány alkalmazta ugyanezt az alapvető kísérleti elrendezést, hogy tanulmányozza a baktériumok alkalmazkodóképességét a rezisztencia költségeihez (Maisnier-patin és Andersson, 2004; Andersson és Hughes, 2010; MacLean és mtsai., 2010;). Ezek a kompenzációs evolúciós kísérletek javarészt azt igazolják, hogy a fitnessz javulását előidéző másodlagos mutációk nem vonnak maguk után rezisztencia csökkenést. Ugyanakkor egy újonnan megjelent kutatásban porin fehérjét kódoló *ompCF* gén deléció *E. coli* törzseket vizsgálva azt tapasztalták, hogy az evolúciós adaptáció során a fitnessz javulása mellett a vizsgált evolúciós vonalak felében elveszett a rezisztencia. A *phoR* és *pstS* géneket érintő mutációk az alternatív porin fehérjét kódoló *phoE* gén magasabb szintű expressziójához vezettek, ezáltal az újonnan keletkezett alternatív porin csatornákon ismét képesek voltak bejutni az aminoglikozid antibiotikumok (Knopp és Andersson, 2015).

A kompenzációs adaptációs laboratóriumi kísérleteknek az egyik általánosan elterjedt hiányossága, hogy egyetlen rezisztenciát biztosító kromoszóma mutációt tartalmazó klónok állnak a tanulmányok központjában. Ezzel szemben a klinikai izolátumokban többszörös rezisztencia mutációk biztosítják a gyógyszerekkel szembeni ellenállóképességet, és emellett a klinikai populációkban kevésbé elterjedt a rezisztenciával járó fitness költség genetikai kompenzációja rezisztencia veszteség nélkül, mint a laboratóriumi törzsekben. A klinikumban az antibiotikum-rezisztencia fennmaradás tesztelésének egyszerű módja a rezisztens izolátumok előfordulási gyakoriságának a mérése a betegektől vett mintákból az antibiotikumokkal történő kezelés előtt és után. Az ilyen típusú közösség fertőzésekkel kapcsolatos metaanalízise arra a következtetésre jutott, hogy a rezisztens izolátumok gyakorisága nő az antibiotikum kezelést követően, majd annak hiányában lassan visszatér a kiindulási állapot felé (Costelloe és mtsai., 2010). Például a *Streptococcusok*-ban a makrolidrezisztencia kezdetben gyorsan megnőtt az azitromicinnel vagy klaritromicinnel végzett kezelés után, de a használat után 12 hónappal visszaesett a kiindulási szintre (Malhotra-Kumar és mtsai., 2007). Ezzel szemben, a szulfonamid és a trimetoprim alkalmazásának nagymértékű csökkentése csak csekély hatással volt az antibiotikumokkal szembeni rezisztencia mértékére (V. I. Enne és mtsai., 2001; Sundqvist és mtsai., 2010b), azonban ezekben az esetekben a rezisztencia nem okozott jelentős fitness költséget (Virve I. Enne és mtsai., 2004; Sundqvist és mtsai., 2010b).

III. Célkitűzések

Az antibiotikumok széles körben elterjedt és gyakori klinikai és mezőgazdasági alkalmazása erős és folyamatos szelekciós nyomást gyakorol a baktériumokra az antibiotikumokkal szembeni rezisztencia kialakítására és annak fenntartására. A gyors evolúciós adaptáció miatt az újonnan bevezetett gyógyszerek a hatékonyságukat igen hamar elveszítik. Emiatt egyre több kutatás az antibiotikum rezisztencia kiküszöbölésére fókuszál, nem pedig az új gyógyszerek fejlesztésére. A rezisztencia mutációk gyakran járnak fitnessz költséggel antibiotikummentes környezetben, ahol a szenzitív genotípus nem rendelkezik ezzel (Melnik és mtsai., 2015). Az így kialakult kompetíció során a rezisztens törzsek képesek fitnesszüket az antibiotikum rezisztenciát biztosító mutáció revertálásával vagy másodlagos kompenzációs mutációk által feljavítani. Az antibiotikum rezisztenciával járó fitnessz költséget számos tanulmányban említik, azonban ezek általában egyetlen rezisztenciát biztosító kromoszóma mutációt tartalmazó klónokat vizsgálnak. A jelenséget szisztematikusan még nem vizsgálták, ezért munkánk során nagy áteresztő képességű laboratóriumi kompenzációs evolúciós kísérleteket végeztünk többszörös mutációt hordozó, multidrog rezisztens törzseket vizsgálva az alábbi kérdések rendszerszintű megválaszolására:

- Mekkora az antibiotikum rezisztencia fitnessz költsége és milyen faktorok befolyásolják a mértékét?
- Antibiotikummentes környezetben fenntartható-e a rezisztencia?
- A kompenzáló evolúciót követően a többszörös mutációt hordozó multidrog rezisztens törzsek milyen eltéréseket mutatnak a rezisztencia változásában az egyetlen rezisztenciát biztosító kromoszóma mutációt tartalmazó törzsekhez képest?
- A kompenzáló mechanizmusok hátterében milyen molekuláris mechanizmusok állnak és ezek hogyan befolyásolják a multidrog rezisztenciát antibiotikummentes környezetben?

IV. Anyagok és módszerek

IV.1. Alkalmazott antibiotikumok, tápoldat és baktériumtörzsek.

Baktériumtörzsek

Vad típusú törzs: Az *Escherichia coli* K12 BW25113 törzsét használtuk vad típusú törzsként, mint kontrol törzs az összes kísérletben. Az *E. coli* az *Enterobacteriaceae* családba tartozó Gram-negatív baktérium. A kólibaktérium széleskörben alkalmazott, ideális modellorganizmus, laboratóriumi körülmények között könnyen tenyésztethető, és rövid generációs idejének köszönhetően könnyen is kezelhető. Ezen felül rengeteg molekuláris és genetikai ismeret áll rendelkezésünkre róla (Elena és Lenski, 2003).

Antibiotikum rezisztens törzsek

Kiindulási törzseink egy korábbi kísérletben (Lázár és mtsai., 2014) fokozatosan növelt antibiotikum szelekció mellett evolválatott *E. coli* K12 kultúrákból származtak. Az evolúció „Minimal Salt” (MS) minimál táptalajban történt, 12 féle antibiotikum egyikének jelenlétében. A következő antibiotikumok kerültek felhasználásra: ampicillin (AMP), cefoxitin (FOX), klóramfenikol (CHL), ciprofloxacin (CIP), doxiciklin (DOX), eritromicin (ERY), kanamicin (KAN), nalidixinsav (NAL), nitrofurantoin (NIT), tetraciklin (TET), trimethoprim (TMP) and tobramicin (TOB). Ezeknek az antibiotikumoknak a használata széles körben elterjedt, az *E. coli*-ra gyakorolt hatásuk jól ismert, valamint változatos hatásmechanizmusú csoportokat képviselnek (Kohanski és mtsai., 2010). A kezdeti szubletális antibiotikum koncentrációt fokozatosan növelve (minden harmadik átoltásnál 1,5-szeres a korábbi dózishoz képest) 30-48 nap alatt 20-328-szoros minimális gátlási koncentráció (MIC) növekedést lehetett elérni. A klinikailag jelentős “breakpoint” értékek a Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI Approved Standard M100, 29th Edition) (Weinstein & Clinical and Laboratory Standards Institute, 2019) iránymutatása alapján kerültek meghatározásra. Végezetül 60 független evolvált vonal (antibiotikumonként 5-6 db) teljes genom szekvenálásának köszönhetően az összes mutáció, míg

30 független evolvált vonal (antibiotikumonként 2-5 db) RNS szekvenálásával a teljes transzkriptom feltérképezésre került.

Antibiotikumok

Az alábbi 12 antibiotikumot alkalmaztuk a laboratóriumi evolúciós kísérletek, valamint az antibiotikum rezisztencia spektrum nagy áteresztőképességű szűrése során: ampicillin (AMP), cefoxitin (FOX), ciprofloxacin (CPR), nalidixinsav (NAL), nitrofurantoin (NIT), kanamicin (KAN), tobramicin (TOB), tetraciklin (TET), doxiciklin (DOX), klóramfenikol (CHL), eritromicin (ERY), trimetoprim (TRM). Minden antibiotikumot a Sigma-Aldrich forgalmazott, kivétel az ERY, amelyet az AMRESCO és a DOX, amelyet az AppliChem gyártott. Az egyes antibiotikum porokból hetente friss, tömény oldatot készítettünk, amit filterrel átszűrtünk (Millex-gv filter, Ø 22 µm) és a felhasználásig -20°C-on tároltunk.

Tápoldatok

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 *minimal salts*” (MS) tápoldat módosított változata volt. Ennek összetevői: 1 g/L (NH₄)₂SO₄, 3 g/L KH₂PO₄ és 7 g/L K₂HPO₄, kiegészítve 1,2 mM nátrium-citráttal, 0,4 mM magnézium-szulfáttal, 0,54 µg/mL vas(III)-kloriddal, 1 µg/mL tiamin-hidrokloriddal, 0,2% (m/V) kazaminosavval és 0,2% (m/V) glükózzal. A tápoldat összes összetevőjét a Sigma-Aldrich-től szereztük be.

Azokban az esetekben, ahol azt a kísérlet nem tette lehetővé, hogy az MS tápoldatot alkalmazzuk, gazdag tápoldatban növesztettük a baktériumokat. Például a mutációk visszaillesztéséhez (pORTMAGE technikával) nagy sejtszámú, tömény kultúrákra volt szükségünk, így a sejtek növesztéséhez az ilyen kísérletekben általánosan alkalmazott „*Lysogeny Broth*” (LB) gazdag tápközeget használtuk. Az LB tápoldat összetevői: 5 g/L NaCl, 5 g/L élesztő kivonat, 10 g/L tripton. Ezeket az összetevőket szintén a Sigma-Aldrich-től szereztük be. Az pORTMAGE technika elektroporációs lépését követő regenerációhoz pedig „*Terrific-broth*” TB

tápoldatot használtunk, melynek összetevői a következők: 24 g/L élesztő kivonat, 12 g/L tripton, 9,4 g/L K_2HPO_4 , 2 g/L KH_2PO_4)

IV.2. Evolúció antibiotikummentes környezetben

A laboratóriumi evolúciós kísérlethez a laboratóriumunkban már korábban használt kísérleti elrendezés útmutatásait követtük (Lázár és mtsai., 2014). A kiindulási antibiotikum rezisztens törzseket (kivéve az ERY rezisztens és NAL rezisztens törzset, amelyek nem mutattak szignifikáns fitness költséget) MS tápoldatban növesztettük, kiegészítve 0,2% (m/V) glükózzal és 0,1% (m/V) kazaminosavval. Minden antibiotikum rezisztens törzset 6-6 párhuzamosban, továbbá 20 szülői (kiindulási, vad típusú) törzset, összesen 10 db 96 lyukú mikrotiter lemezen helyeztünk el, sakktáblaszerű elrendezésben az átfertőzések monitorozása végett. A párhuzamos populációkat 96-lyukú mikrotiter lemezen növesztettük folyamatos rázás mellett (320 rpm.) 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 antibiotikummentes 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 optikai denzitást minden egyes átoltást megelőzően egy Biotek Synergy mikrotiterlap leolvasó készülék segítségével 600 nm-en (OD_{600}) mértük. A laboratóriumi evolúció (**9. ábra**) során a párhuzamos populációk változatos sejtsűrűséget értek el az egyes átoltások alkalmával, ami a független evolúciós útvonalakat tükrözi. A 0, 30 és 60 napig evolúciót átváltatott baktériumsejteket 10 %-os DMSO-val (arányszám: 17,5 %) kiegészítve -80°C-on tároltuk.

IV.3. Relatív fitness mérése, a növekedési görbe felvétele

A 10 db 96 lyukú mikrotiterlapon lévő kompenzálatott vonalakat lyukanként 60 µl tápoldatot tartalmazó 384 lyukú lemezekre oltottuk 3-3 ismétlésben a következő felosztás szerint:

	1	2	(A1) kiindulási AB rezisztens törzsek
A	t0_törzsek	t30_törzsek	(A2) 30 napos evolált AB rezisztens törzsek
B	t60_törzsek	kontrol	(B1) 60 napos evolált AB rezisztens törzsek
			(B2) kiindulási vad törzsek

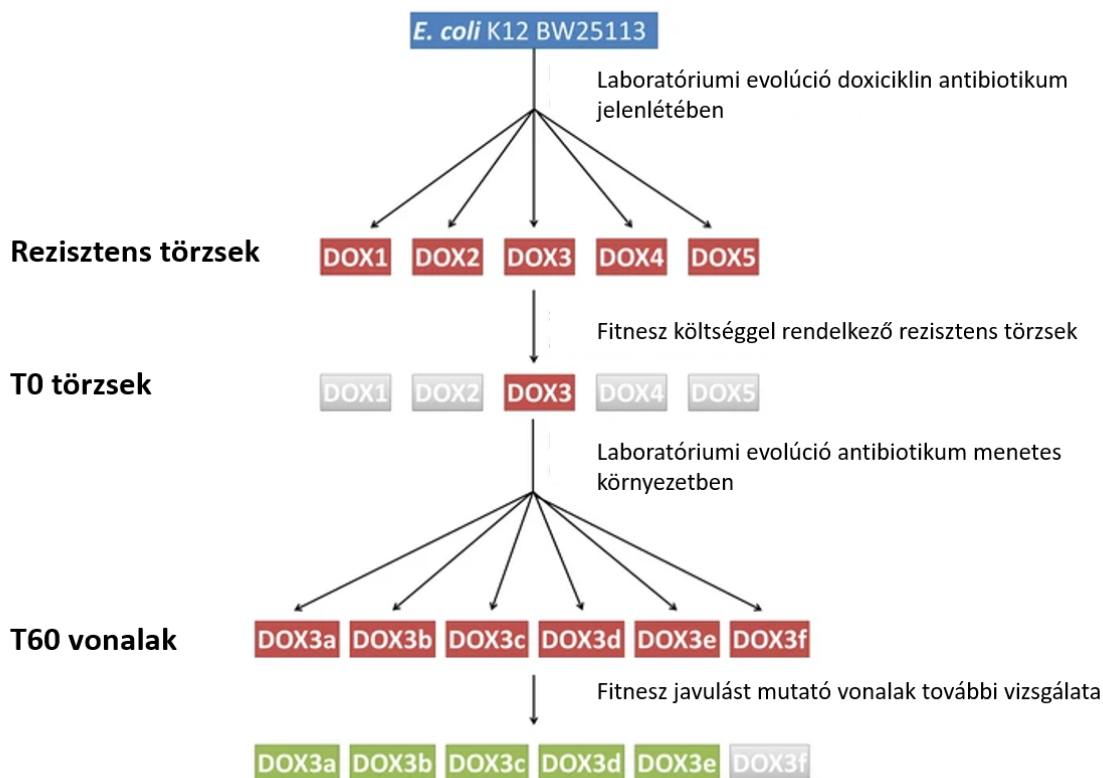
Az átoltáshoz 1,58 mm átmérőjű tűvel rendelkező replikátort használtunk, amit a folyadékkezelő robot (Hamilton Bonaduz) mozgatott. A 384 lyukú lemezeket STX44 (LiCONiC) automata inkubátorba tettük át, amiből a Microlab Swap 420 robotkar (Hamilton Bonaduz) helyezte a lemezeket 20 percenként OD₆₀₀ mérésre Powerwave XS2 lemez leolvasóba. A sejtek növekedését (30°C, 175 rpm.) 24 órán keresztül követtük nyomon, végül a 15 független mérés (minden törzsből 3-3 párhuzamos, 5 független lemezen) minden adatpontjára informatikai elemzést készítettünk.

IV.5. Relatív fitnessz, informatikai elemzés

A lemezeken belüli, illetve lemezek közötti szisztematikus mérési különbségek kiszűrésére a lemezeken minden negyedik pozícióban egy vad típusú referencia törzset oltottunk és mértünk le. Minden mérési értékünket normáltuk az adott lyuk szomszédságában lévő 4-9 db vad referencia törzs integráljának mediánjára. Ezzel egyrészt egy relatív fitnesszértéket kaptunk a vad típus fitnesszére normálva, másrészt pedig kontrolláltuk mérésünket az esetleges szisztematikus (lemezen belüli és lemezek közötti) pozícióhatásokra. Egy adott törzs adott időpontban mutatott fitnesszét az adott időpontban számolt vad típusú referencia törzsre normált integrálok mediánjaként kaptuk meg. A 0. napos, kiindulási rezisztens törzs fitnesszének számolásakor mind a hat evolúciós vonal 0. napos összes technikai replikátumának integráljából együtt számoltunk mediánt, hiszen ekkor még izogenikus törzsek voltak, független evolúció nem történhetett bennük. A kezdeti szettünket, az a 23 rezisztens törzs alkotta, amelyek szignifikáns fitnesszcsökkenést mutattak a vad típushoz képest (T0 törzsek) (egyoldalú Mann-Whitney próba fdr korrigált p érték < 0,05).

Egy evolált vonal akkor mutatott fitnessz javulást (T60 vonalak) a definíciónk szerint, ha két feltételt teljesített. Egyrészt, a kiindulási törzshöz képest szignifikáns fitnesszemelkedést

mutatott (egyoldalú Mann-Whitney próba fdr korrigált p érték $< 0,05$). Másrészt, hogy biztosak legyünk benne, hogy kompenzáció és nem tápanyag adaptáció történt, az emelkedés mértékének nagyobbának kellett, hogy legyen, mint a vad típusú evolált kontroll törzs esetében ($p < 0,05$). A relatív fitness mérések informatikai elemzését Dr. Boross Gábor kollégám végzete, az általa írt algoritmus (R-Studio) használatával.



9. ábra. DOX rezisztencia evolált *E. coli* törzsek létrehozásának és fitness analizisének sematikus ábrázolása. A rezisztens törzsek közül csak azokat választottuk ki (például DOX3), amelyek jelentős fitnessköltséget mutattak a vad típushoz képest (T0 törzsek), majd antibiotikum mentes evolúciós kísérleteket indítottunk el több párhuzamos vonallal (például DOX3a-b-c-d-e-f). A részletes fenotípusos és molekuláris analízist csak azokon a T60 vonalakon végeztünk, amelyek szignifikáns fitness javulást mutattak (zöld jelölés).

IV.6. Az antibiotikum rezisztencia változásnak a mérése

A kiindulási vad törzshöz képest szignifikáns fitness költséget mutató 23 genotípust (138 törzset) MS agart tartalmazó Petri csészére oltottuk, majd 24 órás 30°C-os inkubáció után E-teszt (bioMerieux) segítségével meghatároztuk az antibiotikum rezisztens törzsek minimális gátló koncentrációját (MIC). Az E-teszt egy rugalmas plasztik csík, mely az adott antibiotikum folyamatos koncentráció gradiensét tartalmazza. A gyártó (bioMerieux) előírásainak megfelelően elkészített baktérium szuszpenziót 0,2% (m/V) glükózzal és 0,1% (m/V) kazamínosavval kiegészített MS minimál táptalajra kikentük, és az E-teszt csíkot felhelyeztük. A 24-48 órás (30°C) inkubációt követően az ellipszis alakú gátlási zóna alapján olvastuk le a MIC értéket.

IV.7. Egyedi mutációk visszaillesztése pORTMAGE technikával

A rekonstruált mutáns törzseket pORTMAGE technika (Nyerges és mtsai., 2016) segítségével hoztuk létre. A T60 törzsek feltételezett kompenzáló mutációit és a T0 törzsek rezisztencia mutációt vad típusú, szülői törzsekbe (külön-külön és kombinációban is), illetve a kompenzáló mutációkat a rezisztens törzsekbe illesztettük vissza.

Az eljárás alapjául a „*Multiplex Automated Genome Engineering*” (MAGE) (Wang és mtsai., 2009) módszer szolgál. Azonban a pontosabb kivitelezés és könnyebb alkalmazás érdekében ennek egy továbbfejlesztett változatát, a pORTMAGE-t (Nyerges és mtsai., 2016) használtuk a kísérleteink során. A MAGE gyors, automatizált és nagy teljesítményű genom manipulációt tesz lehetővé a baktérium genomban. A módszer során egy szintetikus, kb. 90 nukleotid hosszúságú egyszálú DNS oligonukleotidot inszertálunk a genomba, amely hordozza a kívánt mutációt, így könnyen kivitelezhető a kívánt allélkombináció vagy genom könyvtár létrehozása. A pORTMAGE plazmid tartalmazza a MAGE ciklus elengedhetetlen elemeit, így a hőindukálható promóter segítségével termeltetett λ fág Red rekombinációs rendszert (Exo, Gam és Beta fehérjék) az egyszálú oligonukleotidok beépítésére, valamint a mutáns MutL fehérjét, amely ideiglenes gátlást hoz létre a „*Mismatch Repair*” (MMR) rendszerben. Az egyes MAGE ciklusok különböző lépésekből álltak: az OD₆₀₀ = 0,4–0,6 elérése után a sejteket 15 percig 42°C -os rázóvízfürdőbe (250 rpm.) helyeztük, hogy a λ -Red rendszre elemeit és a *mutL* gén expresszióját indukáljuk. A sejteket ezután 10 percig jégen hűtöttük, ezután centrifugáltuk ($2,490 \times g$, 8perc)

majd kétszer mostuk és 40 μ l MQ vízben szuszpendáltuk. A 40 μ l sejtet és 1 μ l oligonukleotidot hűtött elektroporáló küvettába (1 mm résszélesség, VWR Signature) tettünk. A mutációt hordozó oligonukleotidot elektroporációval (CM-630, BTX Electroporation System) (1,8 kV, 200 Ω , 25 μ F) juttattuk a sejtbe, majd ezt követően a sejteket 5 ml antibiotikum mentes TB tápoldatba tettük és 30°C-on inkubáltuk 1 órán át (175 rpm.), a regeneráció miatt. Ezután 5 ml, KAN-nel kiegészített LB-t tettünk a tápoldathoz és hagytuk a sejteket egy éjszakán keresztül nőni, szintén 30°C-on (320 rpm.) A mutációk meglétét allélspecifikus PCR-rel ellenőriztük (Nyerges és mtsai., 2014).

IV.8. Hoechst akkumulációs mérés

A membrán permeabilitásának változásait és az efflux pumpa hatékonyságát a Hoechst fluoreszcens festék (H33342 bisbenzimid) (Sigma-Aldrich) intracelluláris akkumulációján alapuló, felskálázható méréssel vizsgáltuk. Az törzseket egy éjszakán át MS tápközegben növesztettük 30°C-on, majd az optikai denzitást $OD_{600} = 0,6$ értékre állítottuk. Ezután a sejteket lecentrifugáltuk (4000 \times g) és foszfátpufferelt sóoldatban (PBS) vettük fel. Ezt követően 180-180 μ l baktérium kultúrát átmértünk 96-lyukú mikrotiter lemezre, törzsenként 8 technikai ismételtsben, melyekhez Hoechst festéket (Sigma) adtunk 25 μ M végkoncentrációban és a lemezt ezután Synergy 2 lemezleolvasóban inkubáltuk 30 °C fokon. Az OD_{600} és a fluoreszcencia (355 és 460 nm) görbéket 1 órán át vettük fel, 75 másodpercenként leolvasva. Az első 15 adatpontot kizártuk a későbbi adatelemzésből a technikai párhuzamosok közötti nagy standard deviáció miatt. A pozitív kontrol létrehozásához a vad típusú törzseket CCCP (carbonyl cyanide-m-chlorophenyl hydrazone, Sigma-Aldrich) efflux pumpa gátlóval kezeltük Az OD_{600} értékeket a korábbiakban leírtak alapján kalibráltuk, majd Dr. Szappanos Balázs algoritmusát (R-Studio) használva kiszámoltuk a fluoreszcencia - OD_{600} aránygörbéket. Ezután az aránygörbéknek a görbe alatti területét határoztuk meg, majd ebből számoltuk tovább a relatív Hoechst akkumulációt az azonos lemezen mért vad típusú kiindulási törzshöz viszonyítva.

IV.9. Teljes genom szekvenálás

A potenciális kompenzációs mechanizmusok azonosítása érdekében 15 darab T60 adaptált vonalat választottunk ki, amelyek 10, különböző antibiotikumra rezisztens T0 törzsből

származnak. Ezeket a T60 vonalakat úgy választottuk meg, hogy reprezentálják a rezisztencia vesztés különböző mintázatait,. A kiválasztott kólibaktérium törzsekből genomi DNS-t (gDNS) izoláltunk *SIGMA GenElute Bacterial Genomic DNA* kit (Sigma Aldrich) felhasználásával. A genomi DNS izolálást én végeztem el, míg a teljesgenom szekvenálást, a nyers szekvencia adatok elemzését, majd az azt követő adatelemzési validálást a Szegedi Tudományegyetem Biokémia Intézete végezte, Dr. Bodai László szakmai vezetésével. A genom szekvenáláshoz az izolált gDNS-ből a *TruSeq Nano DNA LT* kit (Illumina) segítségével készült fragmentum könyvtár. Ez röviden magában foglalja a DNS törését, a DNS-fragmensek végeinek javítását, a megfelelő méretű fragmensek izolálását, az indexelt adapterek ligálását és a könyvtár dúsítását korlátozott ciklusú PCR-rel. A szekvenáló könyvtárak minőségét Agilent Bioanalyzer 2100 műszeren (Agilent) high-sense DNS készlettel, míg mennyiségét *NEBNext Library Quant Kit* (New England Biolabs) használva valósídejű kvantitatív PCR-rel (qPCR) ellenőrizték (Thermo Fisher Scientific) és végül 4 nM koncentrációra hígították. A 12 indexált könyvtár csoportjait egyesítették, 0,1 N NaOH-val denaturálták, és 8 pM végkoncentrációban a 2×250 bp hosszúságú leolvasást lehetővé tevő V2-500 MiSeq reagenskészlet (Illumina)- segítségével Illumina MiSeq készülékkel szekvenálták.

A szekvenálási adatokat FASTQ fájl formátumban exportálták. A 20 bázispárnál hosszab, rossz minőségű szekvenciák Trim Galore (Babraham Bioinformatics) and Cutadapt (Martin, 2011) segítségével kerültek megvágásra. A minőségi értékelések a FASTQC programmal történtek (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>).

A teljes genom szekvenálás nyers eredményei az NCBI BioProject adatbázisban elérhetőek: (URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/PRJNA529335>).

V. Eredmények

V.1. Rezisztencia evolúció és fitness költség

A kiindulási törzseink a korábbi nagyléptékű evolúciós kísérletből származtak (Lázár és mtsai., 2014). Ebben a kísérletben az *E. coli* K12 BW25113 párhuzamosan fejlődő populációit 12 antibiotikum egyikének tették ki. A laboratóriumi evolúció 240-384 generáción át tartott, ám a rövid időtartam ellenére nagyon magas, a minimális gátló koncentráció (MIC) akár 328-szoros értékéhez is tudott a baktérium alkalmazkodni.

A kialakított rezisztencia molekuláris mechanizmusainak tisztázása érdekében 60 darab antibiotikum-rezisztens törzset (minden populációból egy klónt) izoláltak és teljes genom elemzésnek vetették alá őket. Az azonosított rezisztencia mutációk általában a sejtfal szerkezetét, célpontfehérjéket kódoló géneket, efflux pumpákat és a porinokat befolyásolták.

Az antibiotikum-rezisztens törzsek evolúciós sikerének egyik legfontosabb befolyásoló tényezője a rezisztencia fitness költsége. Antibiotikum jelenlétében a rezisztencia megszerzése fitness előnyt jelent a baktériumnak a szenzitív társaival szemben, azonban antibiotikummentes környezetben a rezisztenciát előidéző mutációk lassabb növekedést és ezáltal csökkent túlélési esélyt jelentenek a mikroorganizmus számára. Munkánk során a 60 korábban laboratóriumban evolváztatott rezisztens törzs fitness költségét és 60 nap utáni fitness javulását határoztuk meg. Egy adott törzs fitnessét az kiindulási törzshöz képest (4. táblázat) (Mann-Whitney próba FDR korrigált p-érték < 0,05).

4. táblázat. *Fitnessköltséggel rendelkező törzsek száma antibiotikum csoportonként felosztásban.*

Antibiotikumok	Rövidítések	Antibiotikum osztályok	Hatásmechanizmus	Bakteriocid/ Bakteriosztatikus	Rezisztens törzsek száma	Fitness költséggel rendelkező törzsek száma
Ampicilin	AMP	Penicillin	sejtfal szintézis gátló	Bakteriocid	4	1
Cefoxitin	FOX	Chephalosporin	sejtfal szintézis gátló	Bakteriocid	5	1
Ciprofloxacín	CIP	Quinolon	DNS szintézis gátlás	Bakteriocid	5	2
Nalidixsav	NAL	Quinolon	DNS szintézis gátlás	Bakteriocid	6	0
Nitrofurantoin	NIT	Nitrofurantion	Összetett mechanizmusok	Bakteriocid	6	2
Kanamycin	KAN	Aminoglikozid	Fehérje szintézis gátlás 30S	Bakteriocid	5	4
Tobramycin	TOB	Aminoglikozid	Fehérje szintézis gátlás 30S	Bakteriocid	5	4
Tetraciklin	TET	Tetraciklin	Fehérje szintézis gátlás 30S	bakteriosztatikus	5	2
Doxiciklin	DOX	Tetraciklin	Fehérje szintézis gátlás 30S	bakteriosztatikus	4	1
Klóramfenikol	CHL	Klóramfenikol	Fehérje szintézis gátlás 50S	bakteriosztatikus	5	2
Eritromicin	ERY	Makrolid	Fehérje szintézis gátlás 50S	bakteriosztatikus	5	0
Trimetoprim	TRM	Trimetoprim	Folsav szintézis gátlás	bakteriosztatikus	5	4

A rezisztencia mutációk következtében kialakuló pleiotrópia okai vagy abból fakadnak, hogy a környezetben a magas toxinszinthez (pl. antibiotikum) való alkalmazkodás egy energetikailag költséges folyamat, amely elvonja az erőforrásokat más sejtfunkcióktól. Egy másik ok lehet, hogy a baktériumok a rezisztenciát olyan mutációk révén érik el, amelyek megváltoztatják vagy megzavarják egy enzim működését és az esszenciális fehérjék termelését.

Például az aminoglikozid rezisztens törzsek (KAN, TOB) szembenőően nagy fitness költsége már korábbi tanulmányokból jól ismert. Az aminoglikozidok elleni rezisztencia kialakításának egyik lehetséges módja a 30S riboszóma alegység megváltoztatása, azonban a riboszómális proteinek kódoló gének (például *rpsL*) mutációja jelentősen csökkenti a baktérium növekedési ütemét (Paulander és mtsai., 2009). Az aminoglikozidok közvetlenül a riboszómát támadják, ám a fehérjeszintézist nem gátolják, helyett misztranszlációhoz vezetnek. A misztranszláció eredményeként hibás membránfehérjék jönnek létre, amelyeknek fontos szerepe

van az aminoglikozidok által kiváltott oxidatív stresszben és az azt követő sejthalálban. Az aminoglikozidok sejtbe történő bejutása aktív respirációt, azaz membránpotenciált igényel (Taber és mtsai., 1987). Az aktív respirációhoz pedig szükséges a citokrómoknak és a légzési lánc többi komponensének a megfelelő működése (Kohanski és mtsai., 2010). Az aminoglikozid rezisztens törzsek egy másik jellegzetessége az úgynevezett „*small colony*” (SCV) variánsok fenotípus. Ezek a szubpopulációk jellemzően kis telepeket képeznek, lassan növekednek, atipikus telep morfológiával és szokatlan biokémiai funkciókkal rendelkeznek. Habár több, a bakteriális anyagcserét érintő változás okozhat lassú növekedést, az SCV -kben ez alapvetően két okra vezethető vissza: az elektron transzportlánc sérülésére, és a timidin bioszintézis hiányára (Proctor és mtsai., 2006). Az általunk vizsgált tíz aminoglikozid rezisztens törzsből nyolc mutat jelentős fitness költséget, melyekben igen gyakran megjelenik az *rpsL* gént érintő rezisztencia mutáció és/vagy a légzési láncot szabályozó valamely gén (pl. *cyoA*, *nuoL*) mutációja.

A CPR rezisztens vonalak néhány tagja szintén jelentős fitness költséget mutatott. A kinolonok, mint például a CPR célpontjai a DNS giráz és a topoizomeráz IV. Az erre a szere kialakult rezisztencia jellemzően ezeknek a célpontmolekuláknak a megváltozásával és/vagy az efflux és permeabilitással kapcsolatos mutációk révén jön létre. A fent említett mechanizmusokhoz köthető génekben (*gyrA*, *parC*, *acrR*, *marR*) történő mutációk fitnessre gyakorolt hatása, azonban nagyban függ ezen mutációk kombinációjától, illetve egymásra gyakorolt hatásától (Bhatnagar és Wong, 2019). Az általunk használt CPR rezisztens törzsekben szintén megjelennek a fent említett irodalomból már ismert rezisztencia mutációk, melyek különböző kombinációi és a melléjük társuló egyéb mutációk miatt változatos mértékű fitness költséget hoznak létre.

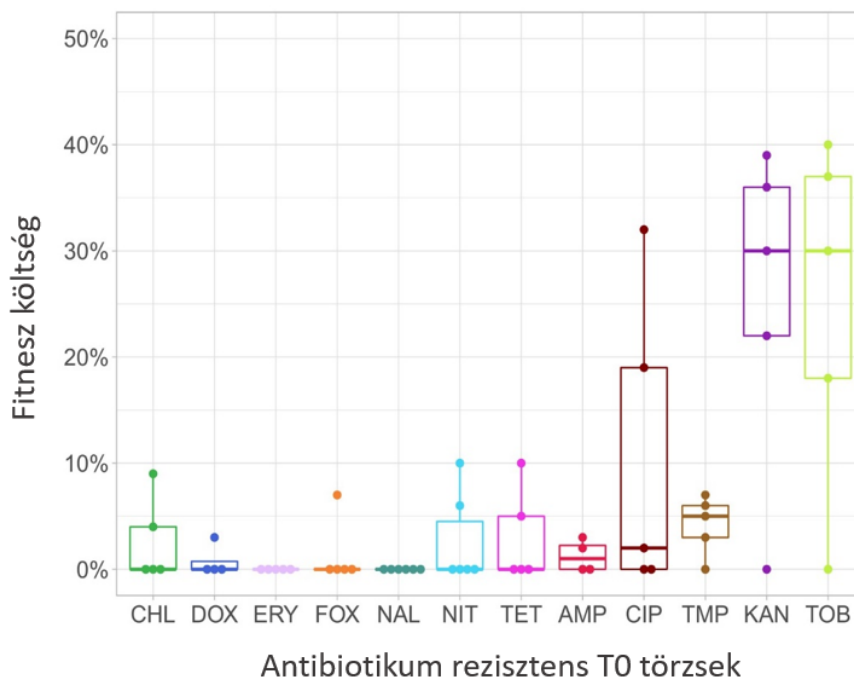
Ellentétben egy korábbi tanulmánnyal (Petráčková és mtsai., 2013), esetünkben az ERY rezisztens törzsek nem mutattak szignifikáns fitnessköltséget az őshöz képest. Az említett tanulmányban *envA* mutáns *E. coli* törzseket tettek ki fokozatosan emelt eritromicin kezelésnek. Az *envA* mutáció megváltoztatja a membrán átjárhatóságát, így ezzel az antibiotikumok felvételét is. Az általunk vizsgált ERY rezisztens törzsek azonban nem ebben a génben, hanem a transzkripció regulátor génekben tartalmaztak mutációt (pl. *fis*) ami úgy tűnik kevésbé van hatással a fitness változására antibiotikum mentes környezetben.

NAL esetében szintén nem láttunk jelentős fitnessköltséget, amit alátámaszt egy 2009-ben megjelent tanulmány (Trindade és mtsai., 2009). Ebben a tanulmányban a NAL rezisztens

egyszeres mutánsok (*gyrA*) növekedési rátája nem változott meg szignifikánsan. Feltéhetően a mi esetünkben is a kinolokra jellemző target mutáció (*gyrA*) felelős a NAL rezisztencia kialakításáért, amely általánosságban nem von maga után fitnessz csökkenést.

Tehát a kiindulási törzshöz viszonyított kezdeti relatív fitnessz értékek antibiotikum csoportonként igen eltérő eredményeket mutattak (**10. ábra**). Az egyes antibiotikumra jellemző rezisztencia gének fitnesszre gyakorolt hatására találunk megegyező példát saját adatainkban és az irodalomban egyaránt, viszont a fent említett példák csupán betekintést nyújtanak a fitnessz költség kialakulásnak különböző módjaira. Általánosságban azonban nem jelenthető ki, hogy egyes rezisztencia gének megjelenése biztosan fitnessz csökkenéssel fog járni, hiszen az antibiotikum szelekció alatt megjelenő egyéb mutációk episztatikus hatása árnyalhatja a fitnessz hatásokat.

Azonban más tanulmányokkal megegyezően (Marcusson és mtsai., 2009; Melnyk és mtsai., 2015; Merker és mtsai., 2018), mi is kimutattuk, hogy a magas fitnessz költség erősen összefüggésbe hozható a kiindulási rezisztencia mértékével (Spearman korreláció, $\rho = -0,658$; $p=0.0006$; $N = 23$) és a mutációk számával (Spearman korreláció, $\rho = -0,7488$; $p<0.0001$; $N = 23$) (**1. függelék**). 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 fitnessz költséghez vezet.

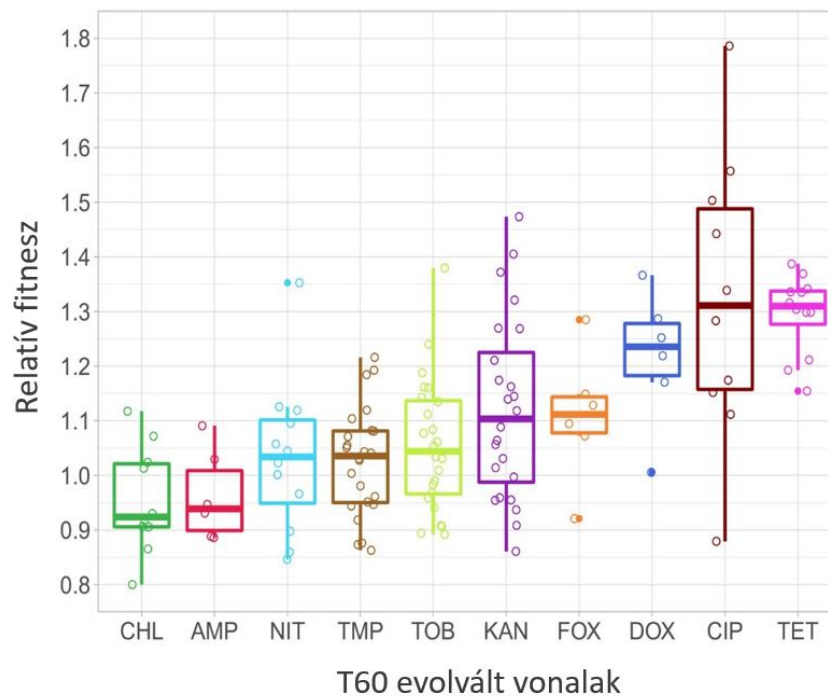


10. ábra. Az antibiotikum-rezisztens T0 törzsek fitneszköltsége. A fitneszköltséget a T0 és a vad típusú törzsek abszolút fitnesséből számítottuk ki, az alábbi egyenlet felhasználásával: $1 - W_{T0}/W_{vad típus}$.

V.2. Rezisztens törzsek 60 napig tartó laboratóriumi evolúciója antibiotikum mentes környezetben

Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk az ellenállóképesség és a fitness esetleges változásait egy antibiotikumoktól mentes környezetben, párhuzamos laboratóriumi evolúciós kísérleteket végeztünk azzal a 23 antibiotikum-rezisztens törzsszel, amelyek jelentős fitnessvesztést mutattak. Antibiotikum-rezisztens törzsenként hat párhuzamos populációt tenyésztettünk antibiotikumoktól mentes tápközegben, így 138 függetlenül fejlődő populációt kaptunk. Az evolúció 60 napig tartott (körülbelül 480 generáció) úgy, hogy a populáció 1%-át friss táptalajra oltottuk 24 óránként. Az egyes kialakult populációk közül egyetlen reprezentatív klónt választottunk a további elemzéshez. Megkülönböztetésként a 23 kiindulási rezisztens törzset T0-val, míg az antibiotikummentes evolúciós kísérletből származó 138 független törzset T60-al jelöltük.

Megfigyeltük, hogy az antibiotikum szelekció megszűnése után a rezisztencia fitness költségét a baktériumok gyorsan és hatékonyan képesek ellensúlyozni. A fitness helyreállító kompenzációs mutációk előfordulását, típusát és számát azonban több tényező is befolyásolja, mint például a rezisztencia mechanizmusa, a kórokozó fajtája és a környezet, amelyben a kompenzáció végbement (Andersson és Hughes, 2010). Eredményeink alapján a T60 vonalak 51%-a volt képes szignifikánsan javítani a fitnessét, sőt némely törzs fitness értéke megközelítette a vad típusú törzsét. A különböző antibiotikumra adaptált törzsek fitness értékei között jelentős különbségeket figyeltünk meg (**11. ábra**), ami alátámasztja az adott antibiotikumra jellemzően kialakuló mutációk szerepét.



11. ábra. A T60 evolált vonalak relatív fitnessze: 23 kiindulási rezisztens törzs (T0) 6 párhuzamos vonalának relatív fitnessét mutatja a 60 napos antibiotikum mentes laboratóriumi evolúció után. A relatív fitness: A T60 fitness normalizálva a megfelelő T0 antibiotikum rezisztens törzs fitnessével

A korábban létrehozott kiindulási rezisztens vonalak teljes genom és RNS szekvenálásának köszönhetően már ismertük az antibiotikumhoz való alkalmazkodás során létrejött genomi mutációkat, illetve az expressziós változásokat. Így munkánk során lehetőség nyílt annak a vizsgálatára, hogy ezek a tényezők és hogyan képesek befolyásolni a fitnessz javulását. Statisztikai elemzéseink során azt figyeltük meg, hogy a kezdeti fitnessz költség mértéke negatívan korrelál a fitnessz javulás előfordulásával (ρ : -0,413, p : $2,2 \times 10^{-16}$), azaz minél nagyobb kezdeti fitnessz költséggel rendelkezik egy törzs annál nagyobb fitnessz javulást képes elérni. Emellett a másik meghatározó tényező a mutációk száma illetve ezeknek a kombinációja.

Antibiotikum csoportonként eltérő gének és ezzel eltérő mechanizmusok járulhatnak hozzá a rezisztenciával együtt járó fitnessz költséghez, azonban úgy tűnik hogy rezisztenciagének és a laboratóriumi evolúció során mutált gének közötti funkcionális kapcsolat van, mivel a fitnessz javulásáért felelős kompenzáló gének vagy ugyanabban a rezisztencia génben vagy azonos szabályzó rendszert érintő génekben jelennek meg.

Például a TRM9 rezisztens törzseben található *soxR* rezisztencia gén fitnessz költségét, a TRM9f T60 vonalában ugyanebben a génben egy újabb mutáció ellensúlyozza, míg a TRM9c esetén a szabályzó rendszer másik tagjának (*soxS*) mutációja révén ér el fitnessz javulást. Habár mindkét kompenzáló mutáció képes javítani a fitnesszt, a javulás mértéke eltérő, mint ahogy az ezzel társuló rezisztencia vesztes sem teljesen azonos (**2. függelék**).

CPR rezisztens törzseknél például nagy variancia figyelhető meg a mutációk számában és az összetételében is, amelyek már a kezdeti fitnessz költség különbségekben is megmutatkoztak. Ehhez hasonló eredményt publikáltak egy 2009-es tanulmányban (Marcusson és mtsai., 2009), ahol a leggyakoribb fluorokinolon rezisztencia mutációkat vizsgálták. Hasonlóan a mi eredményeinkhez a legkisebb kiindulási fitnesszt és az ezzel kapcsolatba hozható antibiotikum mentes evolúció utáni fitnessz javulást az efflux pumpákat érintő mutációk (*marR*, *acrR*) és egy antibiotikum célpontot érintő (*gyrA*) érintő mutáció okozták. Az aminoglikozid-rezisztens vonalak magas fitnessz költsége szintén nagy javulást ért el a 60 napon át tartó, antibiotikum-mentes táközegben történő evolúciót követően (**5. táblázat és 3. függelék**)

5. táblázat. T0 törzsekben megjelenő rezisztencia mutációk (fekete jelölés) és a hozzájuk kapcsolódó antibiotikum mentes evolúciót követően megjelenő kompenzáló mutációk (piros jelölés)

Kompenzáló mutációk azonos génben				
törzs	pozíció	mutáció	annotáció	gén
TRM9	4,267,833	C→T	A146V (GCA→GTA)	soxR →
TRM9f	4,267,467	C→T	A24V (GCG→GTG)	soxR →
CPR5	2,332,651	C→T	S83S (TCG→TCA)	gyrA ←
CPR5a	2,332,651	5 bp→5 bp	coding (245-249/2628 nt)	gyrA ←
CPR5	4,171,145	T→G	intergenic (+292/-28)	rplL → / → rpoB
CPR5a	4,171,144	2 bp→AG	intergenic (+291/-28)	rplL → / → rpoB
DOX3	1,613,627	T→G	V84G (GTG→GGG)	marR →
DOX3a	1,613,342	T→C	intergenic (-177/-35)	marC ← / → marR
FOX8	3,529,618	G→A	P109L (CCG→CTG)	ompR ←
FOX8c	3,529,601	G→A	R115C (CGT→TGT)	ompR ←
Kompenzáló mutációk azonos alrendszerben				
törzs	pozíció	mutáció	annotáció	gén
KAN1	4,026,755	G→A	G84D (GGT→GAT)	trkH →
KAN1b	3,430,901	G→A	S342N (AGC→AAC)	trkA →
FOX8	3,529,618	G→A	P109L (CCG→CTG)	ompR ←
FOX8b	3,528,849	Δ1 bp	coding (379/1353 nt)	envZ ←
TRM9	4,267,833	C→T	A146V (GCA→GTA)	soxR →
TRM9c	4,267,228	(T)7→8	coding (84/324 nt)	soxS ←
TRM9	1,184,682	Δ1 bp	coding (551/1461 nt)	phoQ ←
TRM9c	1,185,991	Δ5 bp	intergenic (-88/+77)	phoP ← / ← purB
CPR5	481,442	G→T	E76* (GAG→TAG)	acrR →
CPR5a	1,613,734	+CTGC	coding (358/435 nt)	marR →

V.3. A rezisztencia változása antibiotikum mentes környezetben

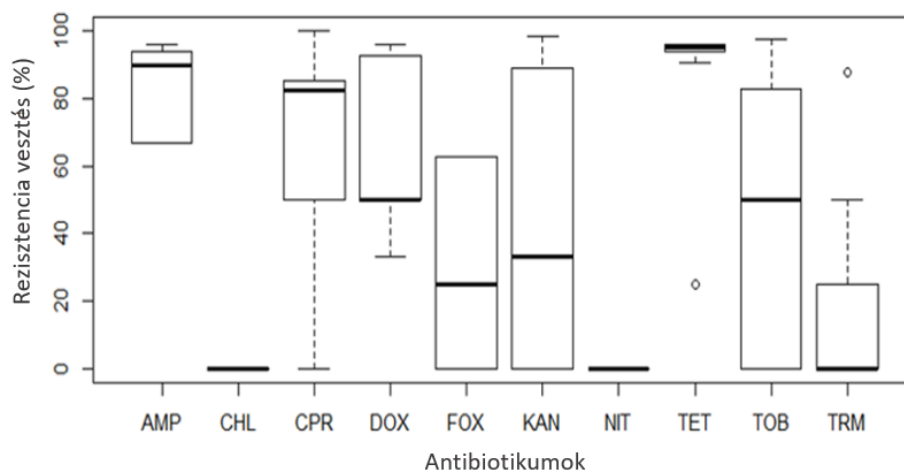
A növekvő antibiotikum használat és a rezisztens törzsek elterjedése közötti összefüggés már jól ismert, azonban az a feltevés, hogy a csökkent gyógyszerfelhasználás vezethet-e csökkent rezisztenciához már kevésbé tisztázott (Gottesman és mtsai., 2009). Habár antibiotikum-mentes környezetben a rezisztencia mutációk fitness hátrányt jelentenek a sejtnak, a legtöbb laboratóriumi tanulmány szerint a fitness javulni tud rezisztenciavesztés nélkül is. Dan Andersson és munkatársai

az alábbi okokkal magyarázzák a jelenséget: 1. A rezisztencia gének gyakran más funkcióval, például fitness javulást előidéző funkcióval is ellátottak., 2. A fitness költség nélküli rezisztens törzsek elterjedhetnek a populációban., 3. A fitness javulása mellett megmarad a rezisztencia a kompenzációs mutációknak köszönhetően (Knopp és Andersson, 2015). Egy másik tanulmány szerint a laboratóriumi kísérletekben megmaradó rezisztencia oka az, hogy csak egyetlen kromoszóma mutációt hordozó egyedi klónokat vizsgálnak (MacLean és Vogwill, 2014). Azonban néhány klinikai kísérletben sikerült a gyógyszerhasználat csökkentésével visszaszorítani a rezisztens baktériumok számát (Batard és mtsai., 2013; Gottesman és mtsai., 2009). Ezért munkánk során elvégeztük a több mutációt is hordozó, laboratóriumban evolválatott rezisztens törzsek kompenzációs evolúciójának és MIC változásainak szisztematikus elemzését E-teszt használatával. Az E-teszt a klinikai diagnosztikában is használt antibiotikum érzékenységet vizsgáló teszteljárás, aminek a segítségével gyorsan és pontosan megállapítható egy adott antibiotikumnak egy adott baktériumtörzsszel szemben mutatott MIC értéke. Azonban néhány törzs esetében a T0 és az T60 klónok is túlnőtték az E-teszten megtalálható maximális antibiotikum koncentrációt, ezért ezeknél a rezisztenciavesztés nem volt kimutatható. Ezek az eredmények azonban nem tekinthetők klinikailag relevánsnak, hiszen ha történt is valamilyen mértékű MIC csökkenés, a rezisztencia szint még mindig magasán meghatározott határérték felett maradt, azaz még mindig többszörösen rezisztensek ezek a törzsek a vad típushoz képest. Ezért ezekben az esetekben a rezisztencia csökkenést 0%-ra értékeltük. Az érzékenységi vizsgálatok laboratóriumi szabványosítását több ország nemzeti szervezete elvégezte, az egyes előírások értékhatárai több esetben is kisebb-nagyobb eltérést mutatnak egymástól. Jelen dolgozatban az amerikai *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) ajánlásait vesszük egységesen alapul. Ez a szervezet az útmutatókat rendszeresen felülvizsgálva naprakészen tartja, igyekszik a legfrissebb ismeretekhez igazítani, kiadványai a legkörültekintőbben tartalmazzák a vizsgálatok kvantitatív és kvalitatív kivitelezésének leírásait, az értelmezés és az interpretálás szabályait. Ez alapján három csoportra lehet osztani a minimális gátlási koncentráció által meghatározott értékeket, rezisztens (R), intermedier (IM) és érzékeny. A 71 szignifikánsan javulást mutató törzs MIC értékeit viszonyítottuk a kiindulási (T0) rezisztens törzsek MIC értékeihez.

Munkánk első felében a „saját” antibiotikummal szembeni érzékenység változását elemeztük ki százalékos arányban (**12. ábra**). Az ampicilin rezisztens törzsek nagyobb részét nem terhelte nagy fitness költség, azonban abban az esetben ahol ez megfigyelhető volt, ott az evolúciót követő fitness

javuláshoz nagyfokú rezisztencia vesztes is járt. Hasonló eredményt értek el egy klinikai kísérletben (Butler és mtsai., 2007) is, ahol 7 éven keresztül azt vizsgálták, hogy hogyan hat az ampicilin antibiotikum csökkentett terápiás alkalmazása a rezisztencia változására.

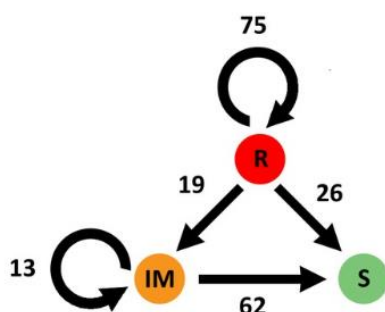
A ciprofloxacín rezisztens vonalak (CPR9 kivételével) jellemzően veszítettek rezisztenciájukból, amit alátámaszt egy 2009-ben megjelent klinikai tanulmány (Gottesman és mtsai., 2009) is, ahol a kinolon dózis 50%-os mérséklésével átlagosan 36%-os rezisztencia csökkenést tudtak elérni. Egy másik tanulmány (Sundqvist és mtsai., 2010a) a svédországi trimetoprim-tartalmú gyógyszerek használatára vonatkozó 24 hónapos önkéntes korlátozás hatását vizsgálta húgyúti fertőzésekben izolált trimetoprim-rezisztens *E. coli* antibiotikum érzékenységre. Megállapították, hogy az összes klinikai rezisztens izolátum megtartja rezisztencia szintjét, ha a trimetoprim célgénjében (*folA* gén) hordoz mutációt. Ezzel a klinikai vizsgálattal egyetértésben azt találtuk, hogy ha a trimetoprim rezisztenciáért felelős *folA* gén jelen van az adott klónban, akkor a rezisztencia megmarad az antibiotikumok jelenléte nélküli laboratóriumi evolúciót követően is. Ezzel szemben a TRM9 törzsekben ahol a trimetoprim rezisztencia más gének megléte miatt alakult ki, nagyfokú rezisztencia vesztes volt megfigyelhető a fitness javulásával párhuzamosan.



12. ábra. Rezisztencia vesztes a 60 napig tartó antibiotikummentes evolúciót követően, „saját” antibiotikumra vizsgálva.

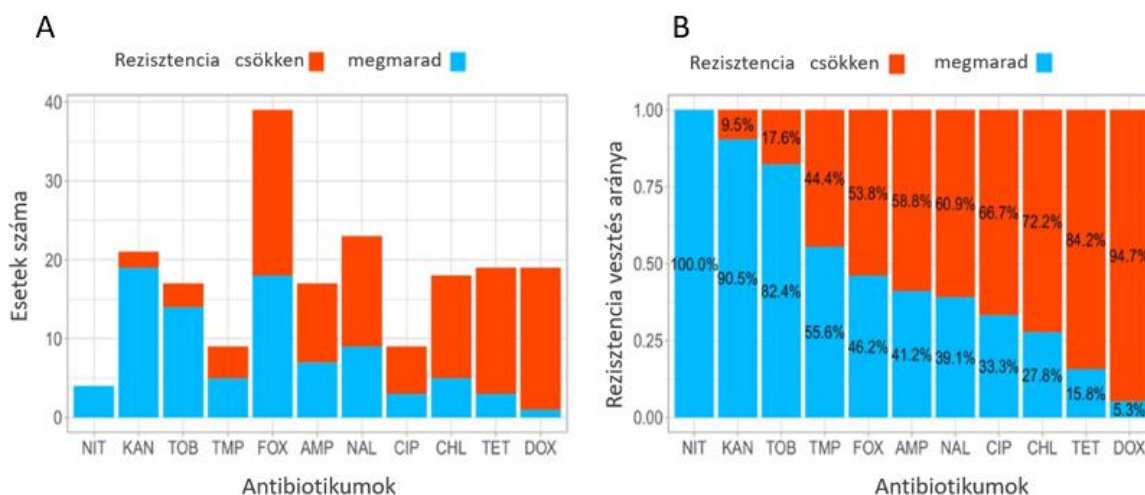
Megfigyeltük, hogy az általunk vizsgált egy-egy antibiotikumhoz már alkalmazkodott kiindulási törzseknek ezzel egyidejűleg számos más antibiotikummal szemben is csökkenhet az érzékenysége (keresztrezisztencia), azaz multidrog-rezisztensé válhat. Nemcsak azoknak az antibiotikumoknak az esetében volt megfigyelhető meg nagymértékű keresztrezisztencia, amelyek hasonló módon hatnak vagy hasonló a kémiai szerkezettel rendelkeznek. Megfigyelhető volt, hogy a baktérium képes túlélni annak az eltérő hatásmechanizmusú antibiotikumnak akár a 128-szoros dózisát is, amelyet nem használtunk az rezisztencia evolúció során (Lázár és mtsai., 2014). Ezért, hogy teljes képet kapjunk a 60 napig tartó antibiotikum mentes evolúciót követő rezisztencia változásokról, összesen 195 antibiotikum-T60 vonal kombinációját is megvizsgáltuk.

Az irodalmi laboratóriumi adatoktól eltérően (Marcusson és mtsai., 2009a; Reynolds, 2000; Schrag és mtsai., 1997b; Schrag & Perrot, 1996) a vizsgált törzsek 54,8%-nál tapasztaltunk rezisztencia csökkenést, sőt több klón esetében igen magas, 80-100%-os rezisztencia veszteség volt megfigyelhető. Rezisztencia veszteségnek az adott kategóriák közötti átmenetet értettük, tehát három lehetséges variáció fordult elő: 1) Rezisztensből intermedier- ha az érzékenység kismértékben csökkent, nagy fokú csökkenés esetében pedig a rezisztens törzsek 2) intermedier vagy akár 3) szenzitív csoportba is kerülhettek (**13. ábra**). 26 esetben teljes változást figyeltünk meg, amikor is a rezisztens fenotípus csupán 60 nap elteltével már visszatért a vad típusú érzékeny állapotba.



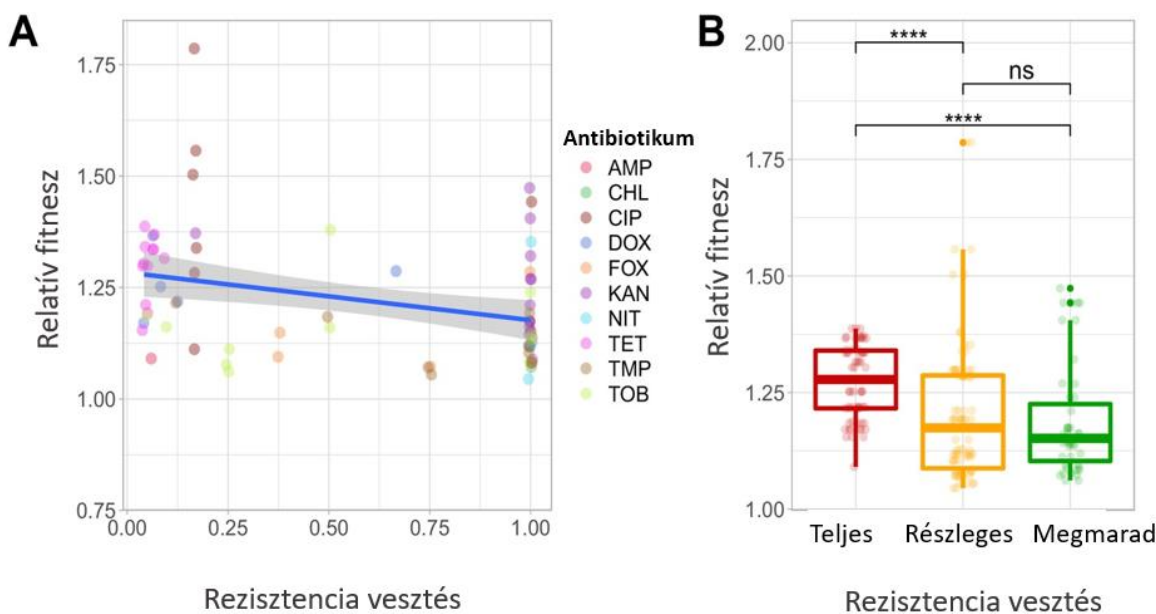
13. ábra. A rezisztencia változása, 195 antibiotikum-T60 vonal kombinációban. A törzseket a CLSI rezisztencia határérték alapján osztályoztuk rezisztens (R), köztes (IM) vagy érzékeny (S) csoportokba. A nyilak jelzik, hogy a rezisztencia szintje fennmarad-e (például R-> R) vagy csökken (például R-> S) a laboratóriumi evolúciót követően, illetve az estek számát is feltüntettük.

Az antibiotikum rezisztencia mechanizmusok nem izoláltan fordulnak elő, hanem leggyakrabban együttesen vannak jelen a baktériumsejtben. A „multiple antibiotic resistance” (Mar) fenotípust létrehozó, akár egyetlen a *mar* operont érintő mutáció is számos fehérje sejtbeli szintjének koordinált változását hozza létre. A fenotípus kialakulásához vezető változások közé tartozik az efflux pumpák (például az AcrAB-TolC multidrog efflux pumpa) túltermeltetése, valamint porin csatornák (például az OmpF porin csatorna) termelésének a gátlása transzkripciós vagy poszttranszkripciós szabályozás által. A Mar fenotípusú baktérium sejtek rezisztenciát mutatnak számos hidrofíl és lipofíl antibiotikumra (Seoane & Levy, 1995). Feltehetően ezen mutációk kompenzálása miatt történik magas rezisztencia veszteség a 60 napig tartó antibiotikum mentes evolúciót követően. Például doxiciklinnel és teraciklinnel szembeni érzékenység kiemelkedő csökkenést mutatott, míg úgy tűnik az aminoglikozid rezisztenciáért felelős mutációk okozta fitneszhátrány kompenzálása nem jár jelentős antibiotikum érzékenység változással (14. ábra).



14. ábra. A rezisztencia változása a 60 napos evolúciót követően antibiotikumonként felosztva, A: az vizsgált esetek száma, B: rezisztencia veszteség százalékos aránya.

Negatív korrelációt találtunk a relatív fitness és rezisztencia szintek között (Spearman korreláció teszt, $\rho = -0,35$, $p=0,0031$), ami azt jelenti, hogy az antibiotikum mentes evolúciót követően, azok a törzsek amik magasabb fitness javulást értek el, általában nagyobb fokú érzékenységet mutattak. Általánosságban azok a multidrog-rezisztens törzsek, amelyek a legmagasabb fitnessjavulásra tettek szert nem csak az adott antibiotikummal, hanem az összes keresztrezisztenciát mutató antibiotikummal szemben is veszítettek a rezisztenciájukból (15. ábra). Középső relatív fitness értékeket elérő csoportba tartozó törzsek, csak részleges, vagyis néhány antibiotikummal szembeni érzékenység csökkenést mutattak. Azoknál a törzseknél pedig ahol, megmaradt a rezisztencia, többnyire csekély mértékű volt a fitness javulása. Ez alól kivételt mutatnak a kanamicin-rezisztens törzsek, amelyek többnyire megtartják rezisztenciájuk, bár képesek magasabb fitnessjavulást elérni, feltételezhetően a specifikusan rájuk jellemző mutációk miatt.



15. ábra. A: Az antibiotikum mentes evolúciót követő fitness javulás és rezisztencia csökkenés összefüggése. B: A T60 vonalakat rezisztenciaprofiljuk alapján három fő kategóriába soroltuk: a rezisztencia szintje csökkent az összes vizsgált antibiotikummal szemben (teljes), legalább egy antibiotikumra vizsgálva csökkent (részleges) vagy a rezisztencia szintje fennmaradt (megmarad).

V.4. Kompenzáló mechanizmusok vizsgálata

A kiindulási törzsek (T0) rezisztenciáért felelős mutációit már a korábbi szekvenálási adatokból ismertük (Lázár és mtsai., 2014). Hogy betekintsünk a rezisztencia csökkenésének alapjául szolgáló molekuláris mechanizmusokba 15, egymástól függetlenül evolváztatott T60 törzset, amelyek szignifikáns fitness javulást mutattak, teljes genom szekvenálásnak vetettünk alá **(3. függelék)**. A törzset igyekeztünk úgy kiválasztani, hogy minél több antibiotikum csoport képviselve legyen illetve, hogy reprezentálják a különböző szintű rezisztencia változások lehetséges okait. Az Illumina platformon kivitelezett szekvenálást követően bioinformatikai elemzéseket végezve arra törekedtünk, hogy a megfelelő T0 törzsek genomjához viszonyítva új, feltételezett kompenzáló mutációkat azonosítsunk. Összességében 45 független mutációs eseményt azonosítottunk, köztük 16 egyedi nukleotid polimorfizmust (SNP), 16 deléciót és 13 inszerciót. Megvizsgáltuk, hogy a T0 populációban rezisztenciát okozó SNP-k visszaálltak-e/revertálódtak-e vad típusú szekvenciává, de ilyen esetet nem találtunk, ezért a T60 törzsek fitnessnövekedése nem az antibiotikumokkal szembeni rezisztencia mutációk molekuláris visszafordulásának következménye. Úgy tűnik inkább a genom más részeiben található kompenzációs mutációk járultak hozzá a kialakult törzsek gyors fitness-javulásához. A laboratóriumi evolúció során felhalmozódott mutációk alacsony száma miatt nem lehetett szigorú statisztikai elemzést végezni a T0-ban és a T60-ban kimutatott mutációk funkcionális kapcsolatának vizsgálatára. Ennek ellenére számos példát találtunk a T0-ban mutált rezisztenciagének és a laboratóriumi evolúció során mutált gének közötti funkcionális kapcsolatról.

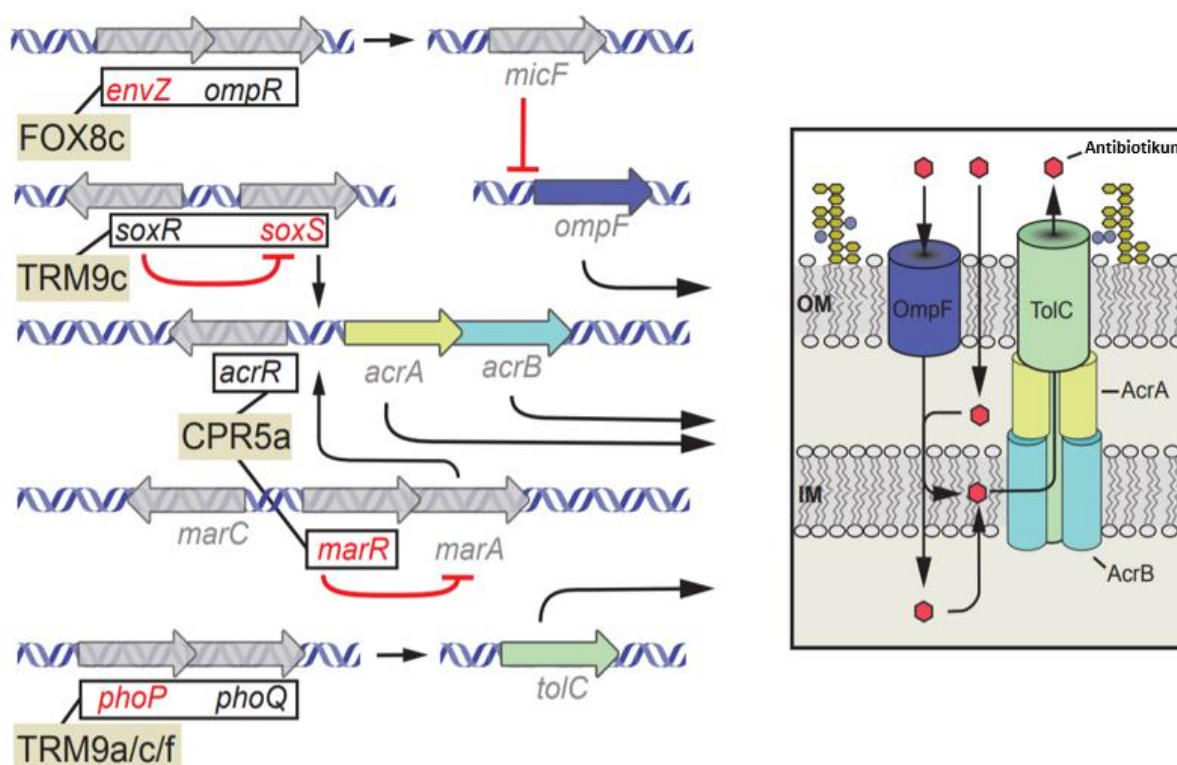
Számos feltételezett kompenzációs mutáció halmozódott fel az antibiotikum elleni védelemben részt vevő transzkripciós szabályozó fehérjékben, amelynek részt vesznek az efflux pumpa szabályozásában (*marR*) (Seoane és Levy, 1995; M. N. Alekshun és Levy, 1999; Duval és mtsai., 2013; Ferenci és Phan, 2015; S), a lipopoliszacharid bioszintézisben (*soxRS*) (Seo és mtsai., 2015) vagy porin csatornák megváltozásában (*envz/ompR*) (Knopp és Andersson, 2015; Phan és Ferenci, 2013).

Az élő szervezetek hatékony mechanizmusokat fejlesztettek ki a környezeti stressz érzékelésére és az ezek elleni védelemben résztvevő gének expressziójának a szabályozására. *E.*

E. coli-ban például a „multiple antibiotic resistant” (*mar*) regulon nem csak az antibiotikumokkal szembeni, hanem a szerves oldószerekkel vagy a fertőtlenítőszerrel szembeni védelemben is szerepet játszik (M. N. Alekshun és Levy, 1999). Az oxidatív stresszre adott reakciót az *E. coli*-ban két fő szabályozó rendszer közvetíti, amelyből az egyik a SoxRS. A SoxR a szuperoxidok jelenlétét érzékeli, majd aktiválja a *soxS* transzkripciót. A megnövekedett SoxS szint ezután aktiválja a célgének expresszióját, amelyek helyreállítják a sérült DNS-t, fenntartják a redox egyensúlyt és védenek a toxikus gyökökkel szemben (Pomposiello és Demple, 2001). Az oxidatív stresszválasz és az antibiotikum-rezisztencia szoros összefüggése a *soxRS* és a *mar* regulon közötti kiterjedt átfedésekben nyilvánul meg (Barbosa és Levy, 2000), mivel a baktericid antibiotikumok ölési mechanizmusa oxidatív károsodásokkal jár (Kohanski és mtsai., 2007), illetve a *mar* regulon számos olyan gént tartalmaz, amelyeket a SoxRS szabályoz az oxidatív stressz hatására. A SoxR és MarR célgénjei között számos efflux pumpa szabályozásáért felelős vagy porinszatórnával összefüggésbe hozható gén szerepel (például: *acrAB*, *tolC*, *marAB*, és *micF*), azonban a SoxRS rendszernek jelentős szerepe van a lipopoliszacharid (LPS) és sejtfal módosításában is (J.-H. Lee és mtsai., 2009). Hasonlóan a fenti példákhoz a PhoPQ kétkomponensű szabályzó rendszer is mind az efflux pumpákra gyakorolt hatásával (Li és mtsai., 2015) mind az LPS modifikációra hatva (Groisman, 2001) hozzájárul a multidrog rezisztenciához.

Esetünkben például a TRM9 rezisztens törzs *phoQ*, *soxR*, *acrR* mutáció révén tett szert rezisztenciára több antibiotikummal szemben is. A 60 napig tartó antibiotikum mentes evolúciót követően, ezek a két komponensű szabályzó rendszerek másik tagjában vagy ugyanazon génben történő, fitness növekedést okozó második mutáció jelent meg. A TRM9c evolválatott T60 vonal esetében a *phoP* génben egy deléció, míg a *soxS* génben egy inszerció járult hozzá a fitness javulásához és ezzel egyidejűleg rezisztencia veszteshez, mi több, az összes keresztrezisztenciát mutató antibiotikummal szemben is. A TRM9f vonalban pedig a *phoP* mutáció mellett a *soxR* génben történt egy újabb mutáció, ami feltehetőleg ellensúlyozni tudta az eredeti rezisztencia mutáció hatását az antibiotikum érzékenységre és a fitness költségre egyaránt. Ezzel szemben a trimetropim rezisztenciáért felelős célpont gént (*folA*) tartalmazó törzsek megtartották rezisztenciájukat, ami azt sugallja, hogy az általános multidrog rezisztenciáért felelős mechanizmusok okozta fitness hátrány kompenzálása gyakrabban jár egyidejűleg rezisztenciavesztéssel is.

CPR5 törzs esetében megfigyelhető volt magában, a célpont génben (*gyrA*) megjelenő második mutáció is. Azonban emellett az antibiotikum mentes evolúciót követően számos más efflux pumpát érintő mutáció (*soxR*, *marR*, *envZ*) is megjelent, így nem állapítható meg, hogy mely mutációnak vagy mutációk kombinációjának milyen mértékű szerepe lehet a rezisztencia veszteséssel együtt járó fitnessz javulásban (16. ábra).



16. ábra. A rezisztenciát biztosító és a kompenzáló mutációk funkcionális összefüggései. A fekete gén nevek a T0 kiindulási törzsek rezisztencia mutációit míg, a piros gén nevek T60 vonalakban található kompenzáló mutációkat jelölik.

Az aminoglikozidok egyedülálló módon proton motoros erőt igényelnek a sejtbe történő bejutáshoz, ezért az aminoglikozid-adaptált vonalak által hordozott membránpotenciálra hatással levő mutációk mind az aminoglikozidok által kiváltott oxidatív stressznek, mind pedig az aminoglikozidok felvételének a mértékét képesek csökkenteni. Az egyik ilyen gyakori génmutáció

a *trkH* gént érinti, amely kálium ionok felvételével járul hozzá a megfelelő membránpotenciál kialakításához (Lázár és mtsai., 2013). A 60 napig tartó antibiotikum szelekció nélküli környezetben történő adaptáció után a Trk kálium felvétel rendszer egy másik tagját kódoló *trkA* génben jelent meg egy újabb mutáció. Feltehetően ez az új mutáció járult hozzá a relatív fitness emelkedéséhez. Azonban ez az új mutáció nem befolyásolta a rezisztencia mértékét. Az elmondottak alapján úgy tűnik, hogy a célpont gén rezisztencia mutáció káros fitness hatását ellensúlyozó mutációk ritkábban jelennek meg a T60 vonalakban, mint a multidrog rezisztenciát ellensúlyozó mutációk és általában nem vonnak maguk után jelentős antibiotikum érzékenység csökkenést.

V.5. Kompenzáló mutációk pleitróp hatása a doxiciklin-rezisztens *E. coli* törzsekben

A teljes genom szekvenálás eredményei alapján megfigyeltük, hogy számos feltételezett kompenzáló mutáció azokkal a génekkel áll funkcionális kapcsolatban, amelyek az általános multidrog rezisztenciáért felelős mechanizmusokat befolyásolják. Ezért, hogy feltárjuk a kompenzáló mutációk biológiai hatását a fitness és a rezisztencia változására, egy olyan doxiciklin rezisztens törzset választottunk részletes elemzésre, amely többféle mechanizmusú antibiotikummal szemben mutat ellenállást, elsősorban az efflux pumpákat befolyásoló rezisztencia mutációk (*acrR*, *marR*) miatt (Lázár és mtsai., 2014). A *marR* génnek nagy klinikai jelentősége van, mivel *E. coli* esetében több korábbi tanulmány is kimutatták mutációjának szerepét az antibiotikum rezisztenciában (Mazzariol és mtsai., 2000; Komp Lindgren és mtsai., 2003;). Ezek a mutációk általában inaktiválják a MarR-t (a MarA represszorát, az *acrAB* és *tolC* transzkripció aktivátorát) vagy az AcrR-t (az *acrAB* operon represszorát), és növelhetik az AcrAB-TolC multidrug efflux pumpák aktivitását (Grkovic és mtsai., 2002).

A 60 napig tartó antibiotikum szelekció nélküli evolúciót követően, egy új *marR* mutációt figyeltünk meg a DOX3 T60 evolváltnál vonalban (**3. függelék**). Feltételeztük, hogy mivel ez a mutáció a *marR* gén promóter régióját érinti, képes újra aktív állapotba hozni a *marR* gént, aminek hatására a *marR* repressziója az eredeti állapotba kerül, így előidézik egy vad típusú efflux pumpa aktivitást. Ennek a vizsgálatára rekonstruált mutáns törzseket hoztunk létre pORTMAGE technika segítségével. A DOX3a T60 vonal feltételezett kompenzáló mutációját és a T0 törzs *marR*

rezisztencia mutációját a vad típusú törzsbe (külön-külön és kombinációban is), illetve a kompenzáló mutációt a rezisztens törzsbe illesztettük vissza.

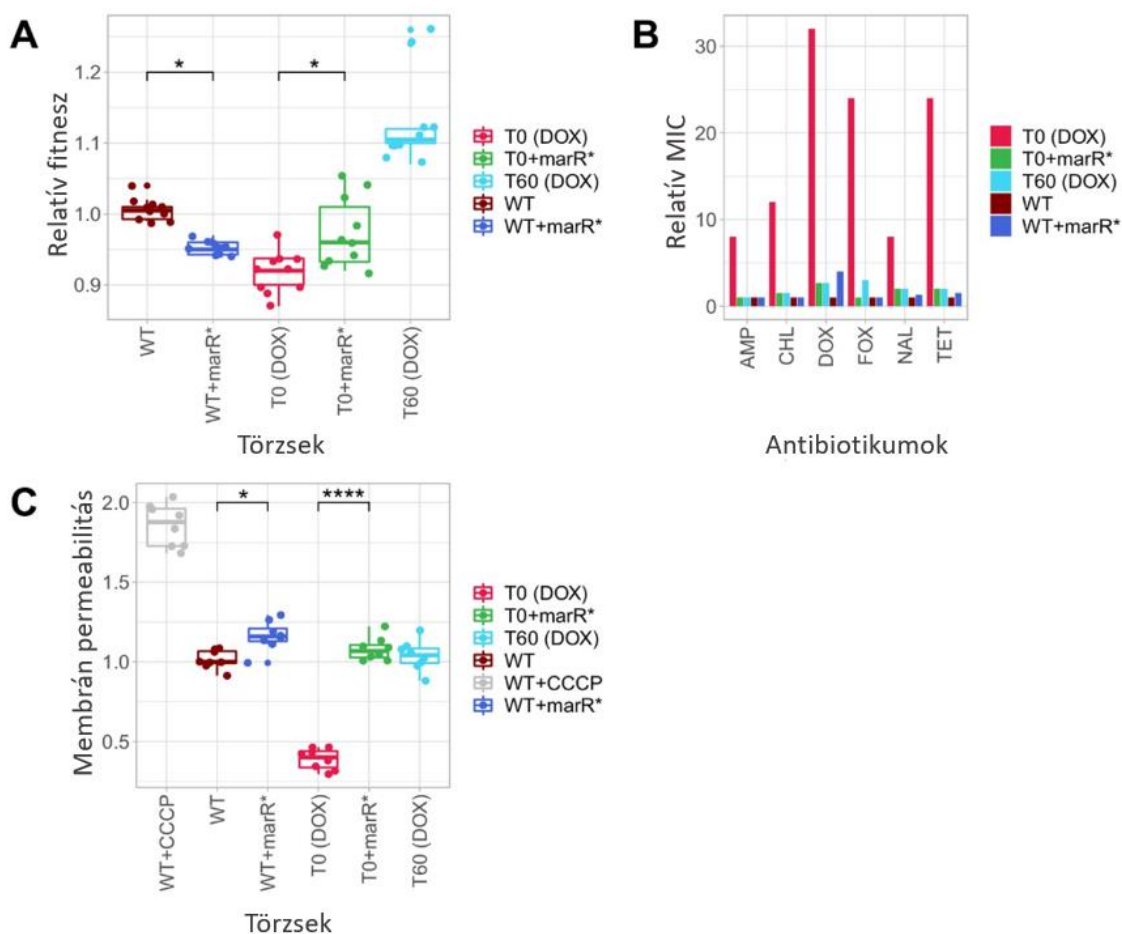
Először megvizsgáltuk a feltételezett kompenzáló mutáció (*marR**) hatását a növekedési sebességre. Azt tapasztaltuk, hogy a mutáció szerepe genetikai háttér függő, mivel a rezisztens törzsben a várttal megegyezően képes kompenzálni az eredeti T0 mutáció fitness hatását. Azonban vad típus *E. coli* törzsbe juttatva, nem emeli a relatív fitness mértékét, sőt inkább csökkenést okoz a növekedésben a kontrol törzshöz viszonyítva, tehát ennek a mutációnak önmagában nincs fitness növelő hatása. Ezek az eredmények az sugallják, hogy valóban a rezisztencia mutáció káros hatásának ellensúlyozása miatt jelent meg ez az új mutáció a 60 napos antibiotikum mentes evolúciót követően.

A következő lépésben a *marR** mutáció rezisztenciára gyakorolt hatását térképeztük fel. A DOX3 törzs nem csak doxiciklinnel szemben mutat rezisztenciát, hanem számos más, különböző hatásmechanizmusú antibiotikumra is. Ezért az antibiotikum érzékenység változását a vad típusú törzshöz viszonyítva E-teszt segítségével mértük le, AMP, CHL, DOX, FOX, NAL és TET esetében. Megfigyeltük, hogy ez az egyetlen kompenzáló mutáció (*marR**) elegendő a kiindulási törzshöz viszonyított nagyfokú rezisztencia változáshoz, sőt több esetben a vad típussal megegyező gyógyszerérzékenység volt tapasztalható.

A fenti eredmények alapján azt feltételeztük, hogy a rezisztencia mértékében és növekedési rátában történt változások a *marR** antibiotikum felvételre gyakorolt antagonista hatásának a következménye. Hipotézisünket az efflux pumpa hatékonyságát mérő Hoechst fluoreszcens festék (H33342 bisbenzimide) intracelluláris akkumulációján alapuló, felskálázható méréssel vizsgáltuk. Amennyiben a festék alacsony szinten mérhető a sejtben, magas efflux aktivitás történik, mivel ebben az esetben a pumpa a sejten kívülre juttatja a fluoreszcens festéket vagy másik lehetőségként egy csökkent membrán átjárhatóság miatt a festék korlátozottan képes a sejtbe bejutni. Pozitív kontrollként CCCP efflux pumpa gátlószert adtunk a vad típusú törzshöz, ebben az esetben az efflux mechanizmusok nem tudnak működni, tehát magas szintű festék felhalmozást látunk. A várttal megegyezően a kiindulási rezisztens DOX3 törzsben, jelezve az aktív efflux pumpa mechanizmust egy meglehetősen alacsony Hoechst felhalmozódást figyeltünk meg a vad típusú törzshöz viszonyítva. Azonban ha ebbe a kiindulási T0 törzsbe visszajuttatjuk a kompenzáló *marR** mutációt, akkor a festék akkumuláció megegyezik a vad típuséval, ami bizonyítja az efflux

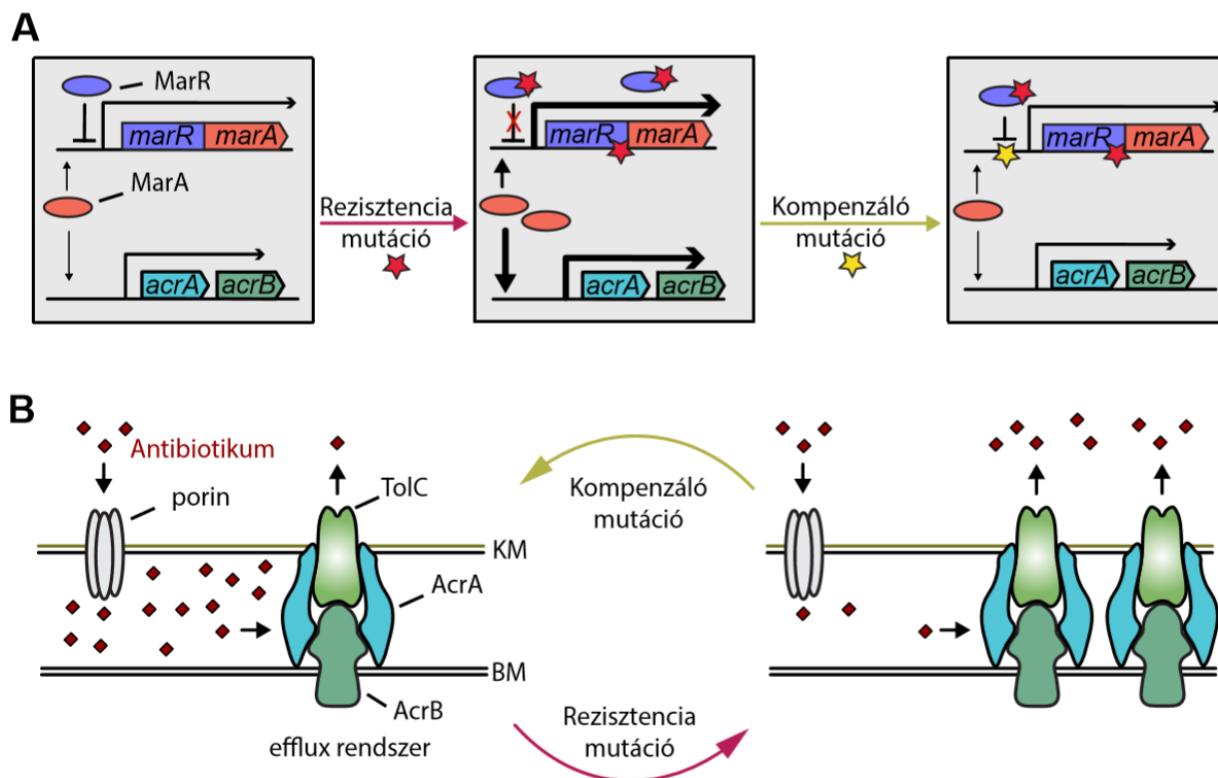
pumpa normál működésének visszaállítását. A *marR** mutáció a vad típusú törzsbe visszaültetve is képes némiképp emelni a festék felhalmozódást, jelezve az efflux mechanizmusra gyakorolt gátló hatását.

Összegezve elmondhatjuk, hogy a kompenzációs mutáció a *marR** promóter régiójában csak egy speciális, antibiotikum-rezisztens genotípusban növelte a baktérium fitneszt. Mellékhatásként ugyanez a mutáció megnövelte a baktériumok érzékenységet több antibiotikummal szemben, valószínűleg az efflux mechanizmusok fokozása révén (17. ábra).



17. ábra. *marR* mutáció hatása A: relatív fitnesz változásra, B: rezisztencia változásra és C: Hoechst festék felhalmozódásra doxiciklin rezisztens törzsekben és a rekonstruktált mutáns törzsekben (WT+marR* és T0+marR*).

A *mar* regulon részletes genetikai elemzése alátámasztja a fenotípus reverzió hipotézisét. A MarR egy transzkripció represszor protein, amely a *marRA* operon így a saját és a MarA transzkripció aktivátor mennyiségét és a MarA által regulált gének expresszióját szabályozza *E. coli*-ban. A *mar* regulon részt vesz számos, az antibiotikum-rezisztenciában részt vevő fehérje, köztük az AcrA/AcrB/TolC multidrug-efflux rendszer szabályozásában. Az antibiotikum-stresszre (például DOX vagy CPR) válaszul a *marR* gyakran mutálódik mind klinikai, mind laboratóriumi körülmények között, ami a *marA* és a *mar* regulon többi tagjának fokozott expressziójához vezet (Praski Alzrigat és mtsai., 2017). Esetünkben a DOX3 törzs mutációt hordoz a *marR* fehérje kódoló szekvenciájában és ez a rezisztencia mutáció fitnessköltséggel jár, elősegítve a további mutációk felhalmozódását. Vizsgálatunk azt mutatja, hogy egy kompenzációs mutációval a *mar* operon promóter régiójában visszaállítható a vad fenotípus, mivel ez növeli a baktériumok fitnessét, továbbá az antibiotikum iránti érzékenységet és helyreállítja a vad típusú efflux pumpa hatékonyságát valószínűleg a *mar* regulon aktivitásának megváltoztatásával (**18. ábra**).



18. ábra. A: A MarR egy transzkripciót szabályozó protein, amely a *marA* gátlásán keresztül szabályozza az *AcrA/AcrB/TolC* efflux rendszer aktivitását. Antibiotikum-stressz hatására a *marR* mutálódik (vörös csillaggal jelölve), ami a *marA* és később a *mar* regulon többi tagjának fokozott expressziójához vezet. A 60 napig tartó antibiotikummentes evolúciót követően egy új kompenzáló mutáció jelenik meg (sárga csillaggal jelölve) ami visszaállítja a vad fenotípust .B: Rezisztencia- és kompenzáló mutáció hatása az efflux pumpa aktivitásra.

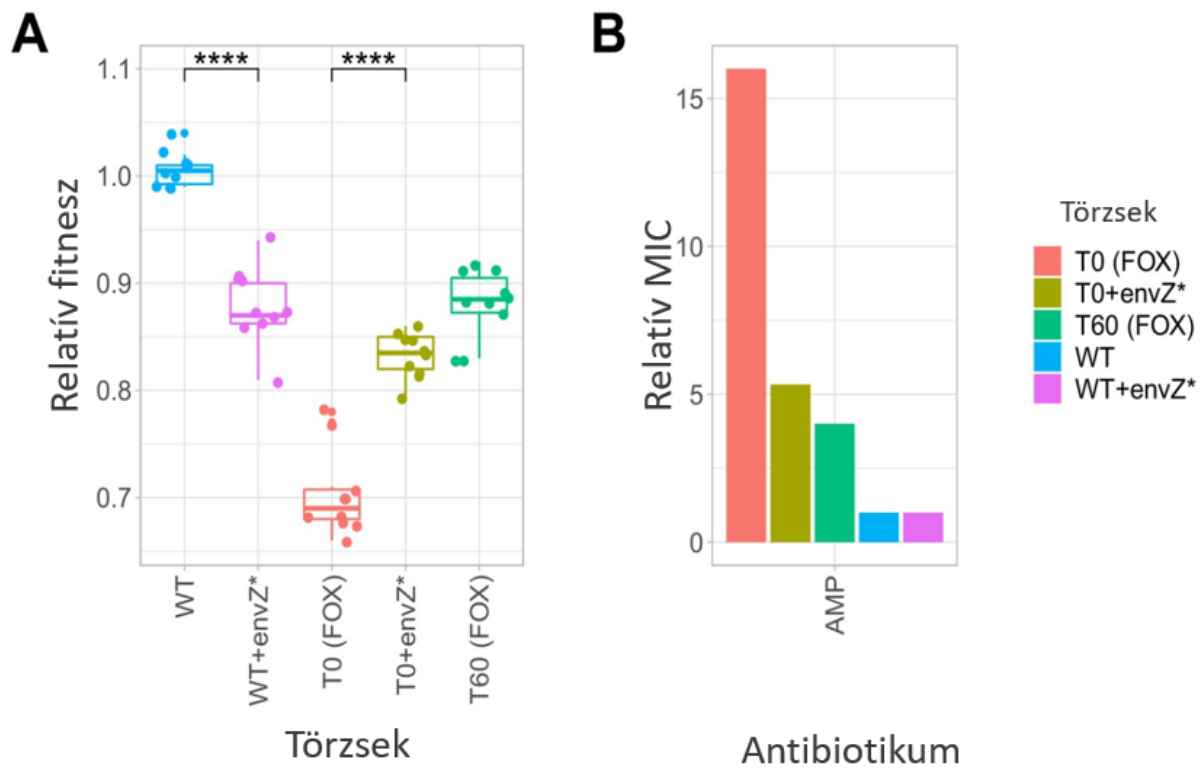
V.6. Kompenzáló mutációk pleiotróp hatása a cefoxitin rezisztens *E. coli* törzsekben

Az előbbieken tárgyalt pleiotróp hatáshoz hasonló mintázatot találtunk a FOX8 kiindulási rezisztens törzsben megjelenő új *envZ* gént érintő kompenzáló mutáció vizsgálata során. Az EnvZ egy, az ozmoregulációban központi szerepet játszó szabályozó protein, ami az OmpR-t foszforilálja. A foszforilált OmpR transzkripció faktoraként működik a fő külső membrán porinokat kódoló gének, az *ompC* és *ompF* expressziójában. Az OmpC és az OmpF csatornákat képeznek a külső membránban, amik lehetővé teszik kis méretű hidofil molekulák passzív diffúzióját. Az OMP-k, különösen az OmpC és OmpF porinok fontos szerepet játszanak az antibiotikumokkal szembeni rezisztencia kialakulásában. Számos antibiotikum, például a karbapenemek, kinolonok, aminoglikozidok és tetraciklinek nem tudnak könnyen diffundálni a külső membránon keresztül (Delcour, 2009). Ehelyett ezek az antibiotikumok porinokat használnak a hidrofób gát leküzdésére és a periplazmába történő transzlokációra. Gyakran az egyszeres mutációk, amelyek a porus tulajdonságait csak kis mértékben változtatják meg elegendőek lehetnek az antibiotikumok felvételének csökkentésére (Bredin és mtsai., 2002; Simonet és mtsai., 2000). Hasonlóképpen azok a mutációk, amelyek a porin elvesztéséhez vagy megváltozásához vezetnek, gyakran megjelennek a rezisztens klinikai izolátumok körében. Például egy klinikai tanulmány alapján az *Enterobacter aerogenes* β -laktám-rezisztens klinikai izolátumainak 40%-ánál hiányoztak a porinok (Charrel és mtsai., 1996).

A csökkent porin expresszió és membránpermeabilitás miatt az antibiotikumokkal szembeni rezisztencia jelentős fitness költséggel jár, mivel az antibiotikumok kizárásával egyidejűleg a fontos tápanyagokat is kizárják a periplazmából (Ferenci, 2005). Az antibiotikummal

történő kezelés során a csökkent tápanyagfelvétel elfogadható kompromisszum lehet, viszont antibiotikumok hiányában az áthatolhatatlan külső membrán hátrányosnak bizonyulhat.

Az általunk vizsgált kiindulási (T0) cefoxitin-rezisztens törzs tartalmaz egy *ompR* és egy *ompC* mutációt, amelyek hatására csökken a porin expresszió és megjelenik a rezisztens fenotípus (Lázár és mtsai., 2014). Azonban ezek a mutációk jelentős fitneszköltséget is okoznak a vad típusú törzshöz képest. Megfigyeléseink alapján, a 60 napig tartó antibiotikum szelekció nélküli evolúciót követően, egy deléció történik az *envZ* génben, amelynek hatására a relatív fitnesz mértéke jelentősen megemelkedik. Ennek a mutációnak a szerepe genetikai háttér függő hasonlóan a korábban már említett *marR** kompenzáló mutációhoz, mivel a rezisztens törzsben képes kompenzálni az eredeti T0 mutációk fitnesz hatását. A vad típusú törzsben viszont épp ellenkezően hat, azaz csökkenést okoz a növekedésben a kontrol törzshöz viszonyítva. Ez az eredmény azt sugallja, hogy valóban a rezisztencia mutáció káros hatásának ellensúlyozása miatt jelent meg az új mutáció a 60 napig tartó antibiotikum mentes evolúciót követően. A porin csatornák helyreállítása nem csak a baktérium növekedésére hat, hanem a gyógyszer érzékenységre is. E-teszttel mért rezisztencia-szint változás alapján, ez az egyetlen kompenzáló mutáció (*envZ*) elegendő volt a kiindulási rezisztens törzshöz viszonyított nagyfokú ampicillin érzékenység változáshoz (**19. ábra**). Hasonló eredményeket figyeltek meg egy korábbi tanulmányban (Knopp és Andersson, 2015), ahol *ompCF* gén deléciós törzseket vizsgálva a rezisztencia mellett, csökkent növekedést tapasztaltak antibiotikummentes közegben. Ennek ellenére, a baktériumok gyorsan tudtak alkalmazkodni egy új, megváltozott antibiotikummentes környezethez és egy kompenzáló mutáció megszerzésével javult a fitneszük és visszaállt az eredeti, vad típusú állapotra az antibiotikum érzékenységük.



19. ábra. Az *envZ* mutáció hatása A: relatív fitness változásra és a B: rezisztencia változásra cefoxitin rezisztens és rekonstruktált mutáns törzsekben.

VI. Eredmények megvitatása

A baktériumok antibiotikumokkal szembeni rezisztenciájának kialakulása és elterjedése egyre súlyosabb közegészségügyi problémát jelent világszerte. Mivel az újonnan bevezetett antibiotikumok is igen hamar elveszítik a hatékonyságukat, a kutatások egyre inkább a rezisztencia mechanizmusok részletesebb megismerésére és új támadási pontok azonosítására fókuszálnak. Az antibiotikum-rezisztencia fennmaradásának befolyásoló tényezői közül talán az egyik legfontosabb az antibiotikum-rezisztencia fitness költsége és azok a kompenzációs mutációk, amelyek antibiotikum szelekció nélküli környezetben képesek a baktérium fitnessének javítására. Azonban a mai napig nyitott kérdés az, hogy az antibiotikum alkalmazás korlátozása valóban képes-e hozzájárulni a többszörös rezisztenciával bíró baktériumok számának jelentős csökkenéséhez. Bár a rezisztencia mutációk gyakran járnak fitness költségekkel, ezek később csökkenhetnek a kompenzációs mutációk felhalmozódása révén. Az eddigi fitness kompenzációval foglalkozó laboratóriumi kísérletek többnyire amellet érvelnek, hogy a kompenzációs mutációk enyhítik a rezisztencia mutációk fitnessköltségeit anélkül, hogy befolyásolnák a rezisztencia mértékét (Andersson és Hughes, 2010). Mindez arra utalt, hogy az antibiotikumok alkalmazás korlátozásának klinikai körülmények között nem sok haszna lehet, mivel így antibiotikum szelekció nélkül is megmaradna a rezisztencia. A legtöbb korábbi laboratóriumi vizsgálat azonban csak egyetlen rezisztencia mutációt hordozó baktériumokra összpontosított, míg az antibiotikum-rezisztens klinikai izolátumok általában több ilyen mutációt hordoznak (Vogwill és MacLean, 2015). Ez a kérdés azért is lényeges, mert az episztatikus kölcsönhatások az antibiotikum-rezisztencia mutációk között igen elterjedtek (Wong, 2017).

A kompenzáció különleges esete a molekuláris reverzió. Ebben az esetben a molekuláris reverzióért felelős mutáció helyreállítja a vad típusú, antibiotikumokkal szemben érzékeny genetikai szekvenciát és ezáltal kiküszöböli a rezisztencia mutációval járó fitness költséget. Azonban azt feltételezzük, hogy a genotípusos reverzió általában egy ritka jelenség, mivel nagyon specifikus mutációs eseményeket igényel, a genom egy jól meghatározott helyén kellene létrejönnie az új kompenzáló mutációnak (Andersson és Hughes, 2010; Durao és mtsai., 2018). Egyes esettanulmányok azt mutatták, hogy a fenotípusos reverzió akkor is előfordulhat, ha az

eredeti rezisztencia mutáció fennmarad, de a kiegészítő mutációk megszerzése egyidejűleg csökkenti a fitness költségét és növeli a baktérium antibiotikumokkal szembeni érzékenységét. Például a sztreptomicin rezisztenciát gyakran az *rpsL* riboszómális protein gén rezisztencia-mutációi közvetítik, de a translációban részt vevő más gének kompenzációs mutációi a sztreptomicin érzékenységre való visszatérést eredményezik (Moura de Sousa és mtsai., 2017). Mivel a fenotípusos reverzió molekuláris célpontjai viszonylag szélesek lehetnek, az antibiotikumokkal szemben érzékeny állapotba való visszatérés valószínűleg sokkal gyakrabban fordul elő, mint ahogy korábban feltételezték.

A fenotípusos reverzió elméletének vizsgálatára nagy áteresztő képességű laboratóriumi kompenzációs evolúciós kísérletet végeztünk különböző antibiotikumokra rezisztens *E. coli* törzseken. Ezek a törzsek 2–13 mutációt hordoztak és fitness költséget mutattak a vad típusú törzshöz képest. Megállapítottuk, hogy antibiotikumoktól mentes környezetben végrehajtott, 60 napig tartó laboratóriumi evolúció az antibiotikum-rezisztens törzsek 51%-ában gyors fitness javulást eredményezett. Ezek közül néhány megközelítette a vad típusú törzs fitnessét. A fitness a laboratóriumi evolúció során javulhat a környezethez való általános alkalmazkodás és/vagy a kompenzációs mutációk felhalmozódása következtében. Ez utóbbiak enyhítik a rezisztencia káros mellékhatásait. A kompenzációs mutációk felhalmozódásának a lehetősége realisabb, mint a környezethez való adaptáció során létrejövő mutációk megjelenése, mivel a kompenzáló mutációk általában antibiotikumok elleni védelem mechanizmusában vagy az általános stresszválaszban részt vevő rezisztencia génekkel voltak funkcionális kapcsolatban. Genetikai/genomikai vizsgálatok során kimutattuk a *marR* és az *envZ* rezisztencia és feltételezett kompenzációs mutációinak epiztatikus kölcsönhatásait is, mivel a laboratóriumi evolúció során növekedett a fitness az adott antibiotikum-rezisztens törzsben, de csökkent a vad típusban.

A *mar* regulon részletes genetikai elemzése alátámasztja a fenotípusos reverzió hipotézisét. A MarR egy transzkripciós szabályozó protein, amely a *marA* regulon aktivitását gátolja az *E. coliban*. A *mar* regulon részt vesz számos, az antibiotikum-rezisztenciában részt vevő gén, köztük az AcrA/AcrB/TolC multidrog-efflux rendszert kódoló gének szabályozásában. Az antibiotikum-stresszre (például DOX vagy CPR) reagálva a *marR* gyakran mutálódik mind klinikai, mind laboratóriumi körülmények között, ami a *marA* és a *mar* regulon többi tagjának fokozott expressziójához vezet (Praski Alzrigat és mtsai., 2017). A vizsgálatainkba bevont DOX3

törzs mutációt hordoz a *marR* fehérje kódoló szekvenciájában és igazoltuk, hogy ez a rezisztencia-mutáció valóban fitness költséggel jár. Azonban eredményeink azt mutatatták, hogy a *mar* operon promóter régiójában megjelenő új mutáció képes megváltoztatni ezt az állapotot. Ez a kompenzációs mutáció növelte a baktériumok fitnessét, a több antibiotikum iránti érzékenységet, és helyreállította a vad típusú membrán efflux mechanizmusokat, valószínűleg a *mar* regulon aktivitásának megváltoztatásával.

Viszont fontos hangsúlyozni, hogy az antibiotikum rezisztencia elvesztése nem azonos valószínűséggel történik az antibiotikum-rezisztens törzsek között. Például tanulmányunkban a DOX és a TET rezisztencia gyakran elveszett, míg az aminoglikozid rezisztencia általában a 60 napos antibiotikum nélküli laboratóriumi evolúció után fennmaradt.

Megfigyeléseink összhangban állnak a klinikai adatokkal. Például egy klinikai tanulmány a kinolonra érzékeny *E. coli* izolátumok arányát vizsgálta a CPR használatának országos korlátozása előtt és után Finnországban. A kutatás kimutatta, hogy a kinolon antibiotikumok csökkent fogyasztásának eredményeként az *E. coli* kinolon rezisztenciája csökkent (Gottesman és mtsai., 2009). Laboratóriumi vizsgálatunk viszont azt is kimutatta, hogy a CPR rezisztencia a populációk 66% -ában csökkent az antibiotikumok nélküli evolúciót követően. Egy másik tanulmány a TRM tartalmú gyógyszerek használatára vonatkozó 24 hónapos önkéntes korlátozás hatását vizsgálta Svédországban húgyúti fertőzésekben izolált TRM *E. coli* törzsek esetében. Megállapították, hogy az összes klinikai izolátum megőrzi a rezisztencia szintjét. Ezek az izolátumok mutációt hordoznak a *folA*-ban, a TRM célgénjében (Brolund és mtsai., 2010). Ezzel a klinikai vizsgálattal egyetértésben azt figyeltük meg, hogy a *folA* mutációval rendelkező TRM *E. coli* törzsek megőrizték rezisztenciájukat a laboratóriumi antibiotikum mentes evolúciót követően. Azonban ezeket az egyezéseket körültekintően kell kezelni, mivel a klinikai és laboratóriumi adatok összehasonlítása nem egyszerű. Például bizonyos országos vagy kórházi korlátozások használata nem képes teljes mértékben kiküszöbölni az antibiotikumok szelekcióját, például a keresztrezisztencia megléte miatt.

Összefoglalva, három fő mintázat jelzi, hogy a fenotípus reverzió az antibiotikumokkal szembeni érzékenység megváltozásában általános lehet a kompenzációs evolúció során:

- i) Az antibiotikumok nélküli környezetben a baktériumok gyors fitnessének növekedése.
- ii) Az antibiotikumokkal szembeni rezisztencia csökkenése vagy teljes elvesztése.
- iii) Specifikus mutációk, amelyek képesek egyszerre megváltoztatni mindkét tulajdonságot.

Eredményeink azt sugallják, hogy az antibiotikum felhasználás korlátozása hasznos megoldás lehet a multidrog-rezisztens baktériumok terjedésének megakadályozására, de csak bizonyos antibiotikumok esetében működhet. Azt is hangsúlyoznunk kell, hogy minden evolúciós kísérletünket antibiotikumok jelenléte nélkül végeztük. A következő logikus lépés a fenotípus reverzió előfordulásának tanulmányozása váltakozó antibiotikum kezelések vagy szubletális antibiotikum dózisoknak való kitettség alatt, mivel ez fordulhat elő valós helyzetekben (Andersson és Hughes, 2014). Vizsgálatunk nyitva hagyja azt a kérdést, hogy az antibiotikumok szelekciójának intenzitása milyen mértékben alakítja ki a későbbi kompenzációs evolúciót és az ezzel járó rezisztencia veszteséget. Végül kutatásunk a kromoszóma rezisztencia mutációkra összpontosított. Még nem tisztázott az a kérdés sem, hogy horizontális géntranszfer esetén a fitness javulása a rezisztenciát biztosító plazmidok elvesztésével vagy a genomban megjelenő új kompenzáló mutációk megjelenésével érhető-e el (Dahlberg és Chao, 2003).

VII. Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni témavezetőmnek Dr. Pál Csabának a lehetőséget, hogy a csoportjában dolgozhattam, hogy stabil munkakörnyezetet teremtett. Köszönöm Neki a munkám során kapott szakmai támogatást és iránymutatást. Köszönöm a dolgozat megírásához nyújtott segítségét is. Köszönettel tartozom korábbi mentoromnak, Dr. Lázár Viktóriának valamint Dr. Spohn Rékának a kísérletekben és a kiértékelésükben nyújtott segítségükért, valamint hogy mindig számíthattam és a mai napig számíthatok segítségükre és tanácsaikra. Hálás köszönettel tartozom a projekt összes résztvevőjének a kísérletekben, a kiértékelésükben és a kéziratok megírásában nyújtott segítségéért:

- Dr. Boross Gábornak, Dr. Szappanos Balázsnak az adatelemzésben nyújtott segítségükért és munkájukért.
- Együttműködő partnereinknek: Dr. Bodai Lászlónak és Faragó Annának a teljes-genom szekvenálás elvégzéséért és az adatok részletekbe menő kielemezéséért.
- Dr. Papp Balázsnak és Dr. Farkas Zoltánnak a dolgozat alapját képező kézirat megírásában nyújtott segítségéért.

Az ELKH SZBK, Biokémiai Intézet Rendszerbiológiai Csoport összes jelenlegi és volt tagjának, amiért fordulhattam hozzájuk kérdésekkel, kérésekkel és számíthattam a segítségükre bármilyen probléma is adódott a labormunka vagy az eredmények kiértékelése során. Külön köszönöm Számel Mónikának a türelmét, segítőkészségét és támogatását; valamint Grézal Gábornak az ábrák szerkeztésében nyújtott segítségét.

Köszönöm az ELKH Szegedi Biológiai Kutatóközpontnak a doktori ösztöndíjat, valamint Pál Csabának az ERC (H2020-ERC-2014-CoG) és GINOP EVOMER (GINOP-2.3.2-15-2016-0002) pályázatokból nyújtott anyagi támogatást. Köszönöm Dr. Galgóczi Lászlónak és Dr. Kereszt Attilának, hogy elvállalták a dolgozatom bírálatát a házi védeésre és hasznos kritikáikkal és megjegyzéseikkel hozzájárultak a dolgozat értékének növeléséhez.

Végezetül köszönöm a családomnak, hogy mindig hittek bennem, mellettem álltak és támogattak.

VIII. Szakirodalmi hivatkozások

- Achouak, W., Heulin, T., & Pagès, J. M. (2001). Multiple facets of bacterial porins. *FEMS Microbiology Letters*, 199(1), 1–7. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2001.tb10642.x>
- Aires, J. R., & Nikaido, H. (2005). Aminoglycosides Are Captured from both Periplasm and Cytoplasm by the AcrD Multidrug Efflux Transporter of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 187(6), 1923–1929. <https://doi.org/10.1128/JB.187.6.1923-1929.2005>
- Alekshun, M. N., & Levy, S. B. (1997). Regulation of chromosomally mediated multiple antibiotic resistance: The mar regulon. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41(10), 2067–2075.
- Alekshun, M. N., & Levy, S. B. (1999). The mar regulon: Multiple resistance to antibiotics and other toxic chemicals. *Trends Microbiol*, 7(10), 410–413.
- Alekshun, M. N., & Levy, S. B. (2007). Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell*, 128(6), 1037–1050. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.03.004>
- Alexander Fleming. (é. n.). *Penicillin. Nobel Lecture, December 11, 1945*. Elérés 2020. január 17., forrás <http://archive.org/details/B-001-026-408-ALL>
- Andersson, D. I. (2006). The biological cost of mutational antibiotic resistance: Any practical conclusions? *Curr Opin Microbiol*, 9(5), 461–465. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.07.002>
- Andersson, D. I., & Hughes, D. (2010). Antibiotic resistance and its cost: Is it possible to reverse resistance? *Nat Rev Microbiol*, 8(4), 260–271. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2319>
- Andersson, D. I., & Hughes, D. (2014). Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. *Nat Rev Microbiol*, 12(7), 465–478. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3270>

- Andersson, D. I., & Levin, B. R. (1999). The biological cost of antibiotic resistance. *Current Opinion in Microbiology*, 2(5), 489–493. [https://doi.org/10.1016/s1369-5274\(99\)00005-3](https://doi.org/10.1016/s1369-5274(99)00005-3)
- Andersson, D. I., Slechta, E. S., & Roth, J. R. (1998). Evidence that gene amplification underlies adaptive mutability of the bacterial lac operon. *Science (New York, N.Y.)*, 282(5391), 1133–1135. <https://doi.org/10.1126/science.282.5391.1133>
- Austin, D. J., Kristinsson, K. G., & Anderson, R. M. (1999). The relationship between the volume of antimicrobial consumption in human communities and the frequency of resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(3), 1152–1156. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.3.1152>
- Avison, M. B. (2005). New approaches to combating antimicrobial drug resistance. *Genome Biology*, 6(13), 243. <https://doi.org/10.1186/gb-2005-6-13-243>
- Barbosa, T. M., & Levy, S. B. (2000). Differential Expression of over 60 Chromosomal Genes in *Escherichia coli* by Constitutive Expression of MarA. *Journal of Bacteriology*, 182(12), 3467–3474. <https://doi.org/10.1128/JB.182.12.3467-3474.2000>
- Bartlett, J. G., Gilbert, D. N., & Spellberg, B. (2013). Seven ways to preserve the miracle of antibiotics. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 56(10), 1445–1450. <https://doi.org/10.1093/cid/cit070>
- Batard, E., Ollivier, F., Boutoille, D., Hardouin, J. B., Montassier, E., Caillon, J., & Ballereau, F. (2013). Relationship between hospital antibiotic use and quinolone resistance in *Escherichia coli*. *Int J Infect Dis*, 17(4), e254-8. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2012.10.005>
- Bhatnagar, K., & Wong, A. (2019). The mutational landscape of quinolone resistance in *Escherichia coli*. *PLOS ONE*, 14(11), e0224650. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224650>

- Billington, O. J., McHugh, T. D., & Gillespie, S. H. (1999). Physiological cost of rifampin resistance induced in vitro in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 43(8), 1866–1869.
- Bjorkman, J., & Andersson, D. I. (2000). The cost of antibiotic resistance from a bacterial perspective. *Drug Resist Updat*, 3(4), 237–245. <https://doi.org/10.1054/drup.2000.0147>
- Blair, J. M. A., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O., & Piddock, L. J. V. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 13(1), 42–51. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3380>
- Blair, J. M., Richmond, G. E., & Piddock, L. J. (2014). Multidrug efflux pumps in Gram-negative bacteria and their role in antibiotic resistance. *Future Microbiology*, 9(10), 1165–1177. <https://doi.org/10.2217/fmb.14.66>
- Blanquart, F., Lehtinen, S., Lipsitch, M., & Fraser, C. (2018). The evolution of antibiotic resistance in a structured host population. *Journal of The Royal Society Interface*, 15(143), 20180040. <https://doi.org/10.1098/rsif.2018.0040>
- Bonhoeffer, S., Lipsitch, M., & Levin, B. R. (1997). Evaluating treatment protocols to prevent antibiotic resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(22), 12106–12111. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.22.12106>
- Bredin, J., Saint, N., Malléa, M., Dé, E., Molle, G., Pagès, J.-M., & Simonet, V. (2002). Alteration of pore properties of *Escherichia coli* OmpF induced by mutation of key residues in anti-loop 3 region. *The Biochemical Journal*, 363(Pt 3), 521–528. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3630521>
- Brogden, R. N., Carmine, A. A., Heel, R. C., Speight, T. M., & Avery, G. S. (1982). Trimethoprim: A Review of its Antibacterial Activity, Pharmacokinetics and Therapeutic

- Use in Urinary Tract Infections. *Drugs*, 23(6), 405–430.
<https://doi.org/10.2165/00003495-198223060-00001>
- Brolund, A., Sundqvist, M., Kahlmeter, G., & Grape, M. (2010). Molecular characterisation of trimethoprim resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* during a two year intervention on trimethoprim use. *PLoS One*, 5(2), e9233.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009233>
- Butler, C. C., Dunstan, F., Heginbotham, M., Mason, B., Roberts, Z., Hillier, S., Howe, R., Palmer, S., & Howard, A. (2007). Containing antibiotic resistance: Decreased antibiotic-resistant coliform urinary tract infections with reduction in antibiotic prescribing by general practices. *Br J Gen Pract*, 57(543), 785–792.
- Cai, S. J., & Inouye, M. (2002). EnvZ-OmpR Interaction and Osmoregulation in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 277(27), 24155–24161.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M110715200>
- Charrel, R. N., Pagès, J. M., De Micco, P., & Mallea, M. (1996). Prevalence of outer membrane porin alteration in beta-lactam-antibiotic-resistant *Enterobacter aerogenes*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40(12), 2854–2858.
- Chopra, I., Hawkey, P. M., & Hinton, M. (1992). Tetracyclines, molecular and clinical aspects. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 29(3), 245–277.
<https://doi.org/10.1093/jac/29.3.245>
- Costelloe, C., Metcalfe, C., Lovering, A., Mant, D., & Hay, A. D. (2010). Effect of antibiotic prescribing in primary care on antimicrobial resistance in individual patients: Systematic review and meta-analysis. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 340, c2096.
<https://doi.org/10.1136/bmj.c2096>

- Dahlberg, C., & Chao, L. (2003). Amelioration of the cost of conjugative plasmid carriage in *Escherichia coli* K12. *Genetics*, 165(4), 1641–1649.
- Davis, B. D., Chen, L., & Tai, P. C. (1986). Misread Protein Creates Membrane Channels: An Essential Step in the Bactericidal Action of Aminoglycosides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(16), 6164–6168. JSTOR.
- De la Cruz, M. A., & Calva, E. (2010). The complexities of porin genetic regulation. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 18(1), 24–36.
<https://doi.org/10.1159/000274309>
- Delcour, A. H. (2009). Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1794(5), 808–816. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.11.005>
- Denamur, E., Bonacorsi, S., Giraud, A., Duriez, P., Hilali, F., Amorin, C., Bingen, E., Andremont, A., Picard, B., Taddei, F., & Matic, I. (2002). High Frequency of Mutator Strains among Human Uropathogenic *Escherichia coli* Isolates. *Journal of Bacteriology*, 184(2), 605–609. <https://doi.org/10.1128/JB.184.2.605-609.2002>
- Denamur, E., & Matic, I. (2006). Evolution of mutation rates in bacteria. *Molecular Microbiology*, 60(4), 820–827. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05150.x>
- Doumith, M., Ellington, M. J., Livermore, D. M., & Woodford, N. (2009). Molecular mechanisms disrupting porin expression in ertapenem-resistant *Klebsiella* and *Enterobacter* spp. Clinical isolates from the UK. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 63(4), 659–667. <https://doi.org/10.1093/jac/dkp029>

- Drlica, K., Malik, M., Kerns, R. J., & Zhao, X. (2008). Quinolone-Mediated Bacterial Death. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(2), 385–392.
<https://doi.org/10.1128/AAC.01617-06>
- Drlica, K., & Zhao, X. (1997). DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61(3), 377–392.
- Du, D., Wang, Z., James, N. R., Voss, J. E., Klimont, E., Ohene-Agyei, T., Venter, H., Chiu, W., & Luisi, B. F. (2014). Structure of the AcrAB-TolC multidrug efflux pump. *Nature*, 509(7501), 512–515. <https://doi.org/10.1038/nature13205>
- Durao, P., Balbontin, R., & Gordo, I. (2018). Evolutionary Mechanisms Shaping the Maintenance of Antibiotic Resistance. *Trends Microbiol*, 26(8), 677–691.
<https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.01.005>
- Duval, V., McMurry, L. M., Foster, K., Head, J. F., & Levy, S. B. (2013). Mutational analysis of the multiple-antibiotic resistance regulator MarR reveals a ligand binding pocket at the interface between the dimerization and DNA binding domains. *J Bacteriol*, 195(15), 3341–3351. <https://doi.org/10.1128/jb.02224-12>
- Džidić, S., Šušković, J., & Kos, B. (2008). Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: Biochemical and genetic aspects. *Food Technology and Biotechnology*, 46, 11–21.
- Edlund, T., & Normark, S. (1981). Recombination between short DNA homologies causes tandem duplication. *Nature*, 292(5820), 269–271.
- Elena, S. F., & Lenski, R. E. (2003). Evolution experiments with microorganisms: The dynamics and genetic bases of adaptation. *Nature Reviews Genetics*, 4(6), 457–469.
<https://doi.org/10.1038/nrg1088>

- Enne, V. I., Bennett, P. M., Livermore, D. M., & Hall, L. M. C. (2004). Enhancement of host fitness by the sul2-coding plasmid p9123 in the absence of selective pressure. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53(6), 958–963.
<https://doi.org/10.1093/jac/dkh217>
- Enne, V. I., Livermore, D. M., Stephens, P., & Hall, L. M. (2001). Persistence of sulphonamide resistance in *Escherichia coli* in the UK despite national prescribing restriction. *Lancet*, 357(9265), 1325–1328. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(00\)04519-0](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(00)04519-0)
- Ferenci, T. (2005). Maintaining a healthy SPANC balance through regulatory and mutational adaptation. *Molecular Microbiology*, 57(1), 1–8. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04649.x>
- Ferenci, T., & Phan, K. (2015). How Porin Heterogeneity and Trade-Offs Affect the Antibiotic Susceptibility of Gram-Negative Bacteria. *Genes*, 6(4), 1113–1124.
<https://doi.org/10.3390/genes6041113>
- Fernández, L., & Hancock, R. E. W. (2012). Adaptive and mutational resistance: Role of porins and efflux pumps in drug resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 25(4), 661–681.
<https://doi.org/10.1128/CMR.00043-12>
- Fourmy, D., Recht, M. I., Blanchard, S. C., & Puglisi, J. D. (1996). Structure of the A site of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA complexed with an aminoglycoside antibiotic. *Science (New York, N.Y.)*, 274(5291), 1367–1371.
<https://doi.org/10.1126/science.274.5291.1367>
- Giedraitienė, A., Vitkauskienė, A., Naginienė, R., & Pavilonis, A. (2011). Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 47(3), 137–146.

- Giraud, A., Matic, I., Tenaillon, O., Clara, A., Radman, M., Fons, M., & Taddei, F. (2001). Costs and Benefits of High Mutation Rates: Adaptive Evolution of Bacteria in the Mouse Gut. *Science*, 291(5513), 2606–2608. <https://doi.org/10.1126/science.1056421>
- Goering, R., Dockrell, H. M., Wakelin, D., Zuckerman, M., Chiodini, P., Roitt, I. M., & Mims, C. (2008). *Attacking the enemy: Antimicrobial agents and chemotherapy*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-04475-2.50037-6>
- Gottesman, B. S., Carmeli, Y., Shitrit, P., & Chowers, M. (2009). Impact of quinolone restriction on resistance patterns of Escherichia coli isolated from urine by culture in a community setting. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 49(6), 869–875. <https://doi.org/10.1086/605530>
- Grkovic, S., Brown, M. H., & Skurray, R. A. (2002). Regulation of Bacterial Drug Export Systems. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(4), 671–701. <https://doi.org/10.1128/MMBR.66.4.671-701.2002>
- Groisman, E. A. (2001). The Pleiotropic Two-Component Regulatory System PhoP-PhoQ. *Journal of Bacteriology*, 183(6), 1835–1842. <https://doi.org/10.1128/JB.183.6.1835-1842.2001>
- Guay, D. R. (2001). An update on the role of nitrofurans in the management of urinary tract infections. *Drugs*, 61(3), 353–364. <https://doi.org/10.2165/00003495-200161030-00004>
- Huovinen, P., Sundström, L., Swedberg, G., & Sköld, O. (1995). Trimethoprim and sulfonamide resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39(2), 279–289.
- Jalal, S., Ciofu, O., Høiby, N., Gotoh, N., & Wretling, B. (2000). Molecular Mechanisms of Fluoroquinolone Resistance in Pseudomonas aeruginosa Isolates from Cystic Fibrosis

- Patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(3), 710–712.
<https://doi.org/10.1128/AAC.44.3.710-712.2000>
- Kahlmeter, G. (2000). The ECO.SENS Project: A prospective, multinational, multicentre epidemiological survey of the prevalence and antimicrobial susceptibility of urinary tract pathogens--interim report. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 46 Suppl 1, 15–22; discussion 63-65.
- Kim, Y.-H., Cha, C.-J., & Cerniglia, C. E. (2002). Purification and characterization of an erythromycin esterase from an erythromycin-resistant *Pseudomonas* sp. *FEMS Microbiology Letters*, 210(2), 239–244. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2002.tb11187.x>
- Knopp, M., & Andersson, D. I. (2015). Amelioration of the Fitness Costs of Antibiotic Resistance Due To Reduced Outer Membrane Permeability by Upregulation of Alternative Porins. *Molecular Biology and Evolution*, 32(12), 3252–3263.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msv195>
- Kobayashi, K., Tsukagoshi, N., & Aono, R. (2001). Suppression of Hypersensitivity of *Escherichia coli* acrB Mutant to Organic Solvents by Integrational Activation of the acrEF Operon with the IS1 or IS2 Element. *Journal of Bacteriology*, 183(8), 2646–2653.
<https://doi.org/10.1128/JB.183.8.2646-2653.2001>
- Kohanski, M. A., Dwyer, D. J., & Collins, J. J. (2010). How antibiotics kill bacteria: From targets to networks. *Nature Reviews. Microbiology*, 8(6), 423–435.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro2333>

- Kohanski, M. A., Dwyer, D. J., Hayete, B., Lawrence, C. A., & Collins, J. J. (2007). A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell*, 130(5), 797–810.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.06.049>
- Komp Lindgren, P., Karlsson, Å., & Hughes, D. (2003). Mutation Rate and Evolution of Fluoroquinolone Resistance in *Escherichia coli* Isolates from Patients with Urinary Tract Infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(10), 3222–3232.
<https://doi.org/10.1128/AAC.47.10.3222-3232.2003>
- Kristinsson, K. G. (1997). Effect of antimicrobial use and other risk factors on antimicrobial resistance in pneumococci. *Microbial Drug Resistance (Larchmont, N.Y.)*, 3(2), 117–123.
<https://doi.org/10.1089/mdr.1997.3.117>
- Kurland, C. G., Hughes, D., & Ehrenberg, M. (1996). *Limitations of translational accuracy*.
<https://doi.org/10.1006/j.mol.1996.0001>
/paper/Limitations-of-translational-accuracy-Kurland-Hughes/eac1cd09859bf1601e244da1654c8b24007bb950
- 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, C. (2014). Genome-wide analysis captures the determinants of the antibiotic cross-resistance interaction network. *Nature Communications*, 5, 4352.
<https://doi.org/10.1038/ncomms5352>
- Lázár, V., Pal Singh, G., 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, C. (2013). Bacterial evolution of antibiotic hypersensitivity. *Molecular Systems Biology*, 9, 700. <https://doi.org/10.1038/msb.2013.57>

- LeClerc, J. E., Li, B., Payne, W. L., & Cebula, T. A. (1996). High Mutation Frequencies Among *Escherichia coli* and *Salmonella* Pathogens. *Science*, 274(5290), 1208–1211.
<https://doi.org/10.1126/science.274.5290.1208>
- Lee, A., Mao, W., Warren, M. S., Mistry, A., Hoshino, K., Okumura, R., Ishida, H., & Lomovskaya, O. (2000). Interplay between Efflux Pumps May Provide Either Additive or Multiplicative Effects on Drug Resistance. *Journal of Bacteriology*, 182(11), 3142–3150.
<https://doi.org/10.1128/JB.182.11.3142-3150.2000>
- Lee, J.-H., Lee, K.-L., Yeo, W.-S., Park, S.-J., & Roe, J.-H. (2009). SoxRS-Mediated Lipopolysaccharide Modification Enhances Resistance against Multiple Drugs in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 191(13), 4441–4450.
<https://doi.org/10.1128/JB.01474-08>
- Levy, S. B., & Marshall, B. (2004). Antibacterial resistance worldwide: Causes, challenges and responses. *Nature Medicine*, 10(12 Suppl), S122-129. <https://doi.org/10.1038/nm1145>
- Li, X.-Z., Plésiat, P., & Nikaido, H. (2015). The Challenge of Efflux-Mediated Antibiotic Resistance in Gram-Negative Bacteria. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(2), 337–418.
<https://doi.org/10.1128/CMR.00117-14>
- Lipsitch, M. (2001). The rise and fall of antimicrobial resistance. *Trends in Microbiology*, 9(9), 438–444. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(01\)02130-8](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(01)02130-8)
- Lipsitch, M., Bergstrom, C. T., & Levin, B. R. (2000). The epidemiology of antibiotic resistance in hospitals: Paradoxes and prescriptions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(4), 1938–1943.
<https://doi.org/10.1073/pnas.97.4.1938>

- Ma, D., Alberti, M., Lynch, C., Nikaido, H., & Hearst, J. E. (1996). The local repressor AcrR plays a modulating role in the regulation of *acrAB* genes of *Escherichia coli* by global stress signals. *Molecular Microbiology*, 19(1), 101–112. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1996.357881.x>
- MacLean, R. C., Hall, A. R., Perron, G. G., & Buckling, A. (2010). The population genetics of antibiotic resistance: Integrating molecular mechanisms and treatment contexts. *Nature Reviews. Genetics*, 11(6), 405–414. <https://doi.org/10.1038/nrg2778>
- MacLean, R. C., & Vogwill, T. (2014). Limits to compensatory adaptation and the persistence of antibiotic resistance in pathogenic bacteria. *Evolution, Medicine, and Public Health*, 2015(1), 4–12. <https://doi.org/10.1093/emph/eou032>
- Maisnier-patin, S., & Andersson, D. I. (2004). *Adaptation to the deleterious effects of antimicrobial drug resistance mutations by compensatory evolution.*
- Malhotra-Kumar, S., Lammens, C., Coenen, S., Van Herck, K., & Goossens, H. (2007). Effect of azithromycin and clarithromycin therapy on pharyngeal carriage of macrolide-resistant streptococci in healthy volunteers: A randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Lancet (London, England)*, 369(9560), 482–490. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)60235-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)60235-9)
- Marcusson, L. L., Frimodt-Møller, N., & Hughes, D. (2009a). Interplay in the Selection of Fluoroquinolone Resistance and Bacterial Fitness. *PLoS Pathogens*, 5(8). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000541>
- Marcusson, L. L., Frimodt-Møller, N., & Hughes, D. (2009b). Interplay in the Selection of Fluoroquinolone Resistance and Bacterial Fitness. *PLOS Pathogens*, 5(8), e1000541. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000541>

- Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.Journal*, 17(1), 10–12. <https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200>
- Martinez, J. L. (2014). General principles of antibiotic resistance in bacteria. *Drug Discovery Today. Technologies*, 11, 33–39. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2014.02.001>
- Mazzariol, A., Tokue, Y., Kanegawa, T. M., Cornaglia, G., & Nikaido, H. (2000). High-Level Fluoroquinolone-Resistant Clinical Isolates of Escherichia coli Overproduce Multidrug Efflux Protein AcrA. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(12), 3441–3443.
- Melnyk, A. H., Wong, A., & Kassen, R. (2015). The fitness costs of antibiotic resistance mutations. *Evolutionary Applications*, 8(3), 273–283. <https://doi.org/10.1111/eva.12196>
- Menninger, J. R., & Otto, D. P. (1982). Erythromycin, carbomycin, and spiramycin inhibit protein synthesis by stimulating the dissociation of peptidyl-tRNA from ribosomes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 21(5), 811–818. <https://doi.org/10.1128/aac.21.5.811>
- Merker, M., Barbier, M., Cox, H., Rasigade, J.-P., Feuerriegel, S., Kohl, T. A., Diel, R., Borrell, S., Gagneux, S., Nikolayevskyy, V., Andres, S., Nübel, U., Supply, P., Wirth, T., & Niemann, S. (2018). Compensatory evolution drives multidrug-resistant tuberculosis in Central Asia. *ELife*, 7. <https://doi.org/10.7554/eLife.38200>
- Moura de Sousa, J., Balbontín, R., Durão, P., & Gordo, I. (2017). Multidrug-resistant bacteria compensate for the epistasis between resistances. *PLoS Biology*, 15(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2001741>
- Munita, J. M., & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology spectrum*, 4(2). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015>

- Nichols, R. J., Sen, S., Choo, Y. J., Beltrao, P., Zietek, M., Chaba, R., Lee, S., Kazmierczak, K. M., Lee, K. J., Wong, A., Shales, M., Lovett, S., Winkler, M. E., Krogan, N. J., Typas, A., & Gross, C. A. (2011). Phenotypic landscape of a bacterial cell. *Cell*, *144*(1), 143–156. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.11.052>
- Nikaido, H. (1989). Outer membrane barrier as a mechanism of antimicrobial resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *33*(11), 1831–1836.
- Nikaido, H. (1996). Multidrug efflux pumps of gram-negative bacteria. *Journal of Bacteriology*, *178*(20), 5853–5859.
- Nikaido, H. (2003). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, *67*(4), 593–656. <https://doi.org/10.1128/membr.67.4.593-656.2003>
- Nikaido, H., Rosenberg, E. Y., & Foulds, J. (1983). Porin channels in *Escherichia coli*: Studies with beta-lactams in intact cells. *Journal of Bacteriology*, *153*(1), 232–240.
- Nikaido, H., & Thanassi, D. G. (1993). Penetration of lipophilic agents with multiple protonation sites into bacterial cells: Tetracyclines and fluoroquinolones as examples. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *37*(7), 1393–1399.
- Nyerges, Á., Csörgő, B., Nagy, I., Latinovics, D., Szamecz, B., Pósfai, G., & Pál, C. (2014). Conditional DNA repair mutants enable highly precise genome engineering. *Nucleic Acids Research*, *42*(8), e62. <https://doi.org/10.1093/nar/gku105>
- Nyerges, Á., Csörgő, B., Nagy, I., Bálint, B., Bihari, P., Lázár, V., Apjok, G., Umenhoffer, K., Bogos, B., Pósfai, G., & Pál, C. (2016). A highly precise and portable genome engineering method allows comparison of mutational effects across bacterial species.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(9), 2502–2507. <https://doi.org/10.1073/pnas.1520040113>
- Oethinger, M., Podglajen, I., Kern, W. V., & Levy, S. B. (1998). Overexpression of the marA or soxS Regulatory Gene in Clinical Topoisomerase Mutants of *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42(8), 2089–2094. <https://doi.org/10.1128/AAC.42.8.2089>
- Oliver, A., Cantón, R., Campo, P., Baquero, F., & Blázquez, J. (2000). High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science (New York, N.Y.)*, 288(5469), 1251–1254. <https://doi.org/10.1126/science.288.5469.1251>
- Pagès, J.-M., James, C. E., & Winterhalter, M. (2008). The porin and the permeating antibiotic: A selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 6(12), 893–903. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1994>
- Paulander, W., Maisnier-Patin, S., & Andersson, D. I. (2009). The Fitness Cost of Streptomycin Resistance Depends on rpsL Mutation, Carbon Source and RpoS (σ S). *Genetics*, 183(2), 539–546. <https://doi.org/10.1534/genetics.109.106104>
- Payne, D. J., Gwynn, M. N., Holmes, D. J., & Pompliano, D. L. (2007). Drugs for bad bugs: Confronting the challenges of antibacterial discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 6(1), 29–40. <https://doi.org/10.1038/nrd2201>
- Petráčková, D., Janeček, J., Bezoušková, S., Kalachová, L., Techniková, Z., Buriánková, K., Halada, P., Haladová, K., & Weiser, J. (2013). Fitness and proteome changes accompanying the development of erythromycin resistance in a population of *Escherichia coli* grown in continuous culture. *MicrobiologyOpen*, 2(5), 841–852. <https://doi.org/10.1002/mbo3.121>

- Phan, K., & Ferenci, T. (2013). A design-constraint trade-off underpins the diversity in ecologically important traits in species *Escherichia coli*. *The ISME Journal*, 7(10), 2034–2043. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.82>
- Piddock, L. J. V. (2012). The crisis of no new antibiotics—What is the way forward? *The Lancet. Infectious Diseases*, 12(3), 249–253. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(11\)70316-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(11)70316-4)
- Piddock, L. J., Walters, R. N., & Diver, J. M. (1990). Correlation of quinolone MIC and inhibition of DNA, RNA, and protein synthesis and induction of the SOS response in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 34(12), 2331–2336.
- Pienaar, J. A., Singh, A., & Barnard, T. G. (2016). The viable but non-culturable state in pathogenic *Escherichia coli*: A general review. *African Journal of Laboratory Medicine*, 5(1), 368. <https://doi.org/10.4102/ajlm.v5i1.368>
- Pomposiello, P. J., & Demple, B. (2001). Redox-operated genetic switches: The SoxR and OxyR transcription factors. *Trends in Biotechnology*, 19(3), 109–114. [https://doi.org/10.1016/s0167-7799\(00\)01542-0](https://doi.org/10.1016/s0167-7799(00)01542-0)
- Praski Alzrigat, L., Huseby, D. L., Brandis, G., & Hughes, D. (2017). Fitness cost constrains the spectrum of *marR* mutations in ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72(11), 3016–3024. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx270>
- Pratt, L. A., Hsing, W., Gibson, K. E., & Silhavy, T. J. (1996). From acids to *osmZ*: Multiple factors influence synthesis of the OmpF and OmpC porins in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 20(5), 911–917. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1996.tb02532.x>
- Proctor, R. A., von Eiff, C., Kahl, B. C., Becker, K., McNamara, P., Herrmann, M., & Peters, G. (2006). Small colony variants: A pathogenic form of bacteria that facilitates persistent

- and recurrent infections. *Nature Reviews Microbiology*, 4(4), 295–305.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro1384>
- Randall, C. P., Mariner, K. R., Chopra, I., & O'Neill, A. J. (2013). The target of daptomycin is absent from *Escherichia coli* and other gram-negative pathogens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(1), 637–639. <https://doi.org/10.1128/AAC.02005-12>
- Reynolds, M. G. (2000). Compensatory evolution in rifampin-resistant *Escherichia coli*. *Genetics*, 156(4), 1471–1481.
- Rossolini, G. M., Arena, F., Pecile, P., & Pollini, S. (2014). Update on the antibiotic resistance crisis. *Current Opinion in Pharmacology*, 18, 56–60.
<https://doi.org/10.1016/j.coph.2014.09.006>
- Schrag, S. J., & Perrot, V. (1996). Reducing antibiotic resistance. *Nature*, 381(6578), 120–121.
<https://doi.org/10.1038/381120b0>
- Schrag, S. J., Perrot, V., & Levin, B. R. (1997a). Adaptation to the fitness costs of antibiotic resistance in *Escherichia coli*. *Proceedings. Biological Sciences*, 264(1386), 1287–1291.
<https://doi.org/10.1098/rspb.1997.0178>
- Schrag, S. J., Perrot, V., & Levin, B. R. (1997b). Adaptation to the fitness costs of antibiotic resistance in *Escherichia coli*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 264(1386), 1287–1291.
- Seo, S. W., Kim, D., Szubin, R., & Palsson, B. O. (2015). Genome-wide Reconstruction of OxyR and SoxRS Transcriptional Regulatory Networks under Oxidative Stress in *Escherichia coli* K-12 MG1655. *Cell Reports*, 12(8), 1289–1299.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.07.043>

- Seoane, A. S., & Levy, S. B. (1995). Characterization of MarR, the repressor of the multiple antibiotic resistance (mar) operon in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 177(12), 3414–3419. <https://doi.org/10.1128/jb.177.12.3414-3419.1995>
- Seppälä, H., Klaukka, T., Vuopio-Varkila, J., Muotiala, A., Helenius, H., Lager, K., & Huovinen, P. (1997). The effect of changes in the consumption of macrolide antibiotics on erythromycin resistance in group A streptococci in Finland. Finnish Study Group for Antimicrobial Resistance. *The New England Journal of Medicine*, 337(7), 441–446. <https://doi.org/10.1056/NEJM199708143370701>
- Simonet, V., Malléa, M., & Pagès, J.-M. (2000). Substitutions in the Eyelet Region Disrupt Cefepime Diffusion through the *Escherichia coli* OmpF Channel. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(2), 311–315.
- Sniegowski, P. D., Gerrish, P. J., & Lenski, R. E. (1997). Evolution of high mutation rates in experimental populations of *E. coli*. *Nature*, 387(6634), 703–705. <https://doi.org/10.1038/42701>
- Sr, P. (2001). Humans as the world’s greatest evolutionary force. *Science (New York, N.Y.)*, 293(5536). <https://doi.org/10.1126/science.293.5536.1786>
- Strateva, T., & Yordanov, D. (2009). *Pseudomonas aeruginosa* – a phenomenon of bacterial resistance. *Journal of Medical Microbiology*, 58(9), 1133–1148. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.009142-0>
- Sulavik, M. C., Houseweart, C., Cramer, C., Jiwani, N., Murgolo, N., Greene, J., DiDomenico, B., Shaw, K. J., Miller, G. H., Hare, R., & Shimer, G. (2001). Antibiotic susceptibility profiles of *Escherichia coli* strains lacking multidrug efflux pump genes. *Antimicrobial*

- Agents and Chemotherapy*, 45(4), 1126–1136. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.4.1126-1136.2001>
- Sundqvist, M., Geli, P., Andersson, D. I., Sjölund-Karlsson, M., Runehagen, A., Cars, H., Abelson-Storby, K., Cars, O., & Kahlmeter, G. (2010a). Little evidence for reversibility of trimethoprim resistance after a drastic reduction in trimethoprim use. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(2), 350–360. <https://doi.org/10.1093/jac/dkp387>
- Sundqvist, M., Geli, P., Andersson, D. I., Sjölund-Karlsson, M., Runehagen, A., Cars, H., Abelson-Storby, K., Cars, O., & Kahlmeter, G. (2010b). Little evidence for reversibility of trimethoprim resistance after a drastic reduction in trimethoprim use. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(2), 350–360. <https://doi.org/10.1093/jac/dkp387>
- Sung, W., Ackerman, M., Miller, S., Doak, T., & Lynch, M. (2012). Drift-barrier hypothesis and mutation-rate evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109, 18488–18492. <https://doi.org/10.1073/pnas.1216223109>
- Taber, H. W., Mueller, J. P., Miller, P. F., & Arrow, A. S. (1987). Bacterial uptake of aminoglycoside antibiotics. *Microbiological Reviews*, 51(4), 439–457. <https://doi.org/10.1128/mr.51.4.439-457.1987>
- Taddei, F., Matic, I., Godelle, B., & Radman, M. (1997). To be a mutator, or how pathogenic and commensal bacteria can evolve rapidly. *Trends in Microbiology*, 5(11), 427–428; discussion 428-429. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(97\)01157-8](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(97)01157-8)
- Tipper, D. J., & Strominger, J. L. (1965). Mechanism of action of penicillins: A proposal based on their structural similarity to acyl-D-alanyl-D-alanine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 54(4), 1133–1141.

- Tolmasky, M. E. (2000). Bacterial resistance to aminoglycosides and beta-lactams: The Tn1331 transposon paradigm. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*, 5, D20-29. <https://doi.org/10.2741/tolmasky>
- Trindade, S., Sousa, A., Xavier, K. B., Dionisio, F., Ferreira, M. G., & Gordo, I. (2009). Positive Epistasis Drives the Acquisition of Multidrug Resistance. *PLOS Genetics*, 5(7), e1000578. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000578>
- Tu, Y., & McCalla, D. R. (1975). Effect of activated nitrofurans on DNA. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 402(2), 142–149. [https://doi.org/10.1016/0005-2787\(75\)90032-5](https://doi.org/10.1016/0005-2787(75)90032-5)
- Ventola, C. L. (2015). The Antibiotic Resistance Crisis. *Pharmacy and Therapeutics*, 40(4), 277–283.
- Vogwill, T., & MacLean, R. C. (2015). The genetic basis of the fitness costs of antimicrobial resistance: A meta-analysis approach. *Evolutionary Applications*, 8(3), 284–295. <https://doi.org/10.1111/eva.12202>
- Von Döhren, H. (2004). Antibiotics: Actions, origins, resistance, by C. Walsh. 2003. Washington, DC: ASM Press. 345 pp. \$99.95 (hardcover). *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, 13(11), 3059–3060. <https://doi.org/10.1110/ps.041032204>
- Walsh, C. (2000). Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature*, 406(6797), 775–781. <https://doi.org/10.1038/35021219>
- Wang, H. H., Isaacs, F. J., Carr, P. A., Sun, Z. Z., Xu, G., Forest, C. R., & Church, G. M. (2009). Programming cells by multiplex genome engineering and accelerated evolution. *Nature*, 460(7257), 894–898. <https://doi.org/10.1038/nature08187>

- Webber, M. A., & Piddock, L. J. V. (2003). The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51(1), 9–11.
<https://doi.org/10.1093/jac/dkg050>
- Weinreich, D. M., & Chao, L. (2005). Rapid evolutionary escape by large populations from local fitness peaks is likely in nature. *Evolution; International Journal of Organic Evolution*, 59(6), 1175–1182.
- Weinstein, M. P. & Clinical and Laboratory Standards Institute. (2019). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*.
- Wise, E. M., & Park, J. T. (1965). Penicillin: Its basic site of action as an inhibitor of a peptide cross-linking reaction in cell wall mucopeptide synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 54(1), 75–81.
- Wong, A. (2017). Epistasis and the Evolution of Antimicrobial Resistance. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00246>
- Wright, G. D. (2014). Something old, something new: Revisiting natural products in antibiotic drug discovery. *Canadian Journal of Microbiology*, 60(3), 147–154.
<https://doi.org/10.1139/cjm-2014-0063>
- Zhang, A., Rosner, J. L., & Martin, R. G. (2008). Transcriptional activation by MarA, SoxS and Rob of two tolC promoters using one binding site: A complex promoter configuration for tolC in Escherichia coli. *Molecular Microbiology*, 69(6), 1450–1455.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06371.x>

IX. Összefoglalás

Az antibiotikumok széles körben elterjedt és nem megfelelő használata, számos multidrog-rezisztens baktérium megjelenéséhez vezetett, ami komoly közegészségügyi problémát jelent. Mivel az újonnan bevezetett gyógyszerek is igen hamar elveszítik a hatékonyságukat, a kutatások egyre inkább az antibiotikum rezisztencia mechanizmusok részletesebb megismerésére és új támadáspontok fejlesztésére fókuszálnak.

A rezisztencia megjelenésének és stabilitásának az egyik fontos jellemzője a rezisztencia fitness költsége, azaz a rezisztencia mechanizmusoknak a baktérium növekedésére és túlélésére gyakorolt hatásai. Az antibiotikumnak történő kitettség során a rezisztencia mechanizmusok fitness előnyt jelentenek a baktérium számára szenzitív versenytársaikkal szemben, azonban gyógyszermentes környezetben ezek a mechanizmusok növelhetik a generációs időt és csökkenthetik a túlélés esélyét. Egy új, antibiotikum-mentes környezethez adaptálódva azonban a baktériumok képesek gyorsan és hatékonyan ellensúlyozni a rezisztencia okozta fitness költséget másodlagos kompenzációs mutációk segítségével. Az eddigi fitness kompenzációval foglalkozó laboratóriumi kísérletek többnyire egyetlen rezisztencia mutációt hordozó baktériumokra összpontosítottak, azonban az antibiotikum-rezisztens klinikai izolátumok általában több rezisztencia mutációt hordoznak.

Munkánk során ezért egy nagy áteresztő képességű laboratóriumi kompenzációs evolúciós kísérletet végeztünk többszörös mutációt hordozó törzsekben a multidrog rezisztenciával járó fitness költségek rendszerszintű meghatározására, és annak a kérdésnek megválaszolására, hogy a fitness javulásért felelős kompenzációs mutációk hatására milyen mértékben változik meg a rezisztencia mértéke antibiotikummentes környezetben.

Munkánk során 60 laboratóriumban evolúciós kiindulási őshöz viszonyított fitness költségét és az ősi típushoz képest szignifikáns fitnesscsökkenést mutató 23 genotípus 60 nap utáni fitness javulását határoztuk meg. Kimutattuk, hogy a magas fitness költség nagymértékben összefüggésbe hozható a kiindulási rezisztencia mértékével és a mutációk számával, mivel egy magasabb fokú rezisztencia pleiotrópikus hatása nagyobbak bizonyult.

Az antibiotikum szelekció megszűnése után a rezisztencia fitness költségét a baktériumok gyorsan és hatékonyan voltak képesek ellensúlyozni. Azonban a fitness helyreállító kompenzációs mutációk előfordulását, típusát és számát több tényező is befolyásolta, köztük a rezisztencia mechanizmusa. Eredményeink alapján az evolált vonalak 51%-a volt képes szignifikánsan javítani a fitnessét, sőt némely törzs megközelíti a vad típusú törzs fitness értékét is. A különböző antibiotikumra adaptált törzsek között jelentős különbségek voltak a relatív fitness értékek között, ami alátámasztja az adott antibiotikumra jellemzően kialakuló mutációk szerepét. Antibiotikum csoportonként eltérő gének és ezzel eltérő mechanizmusok járulhatnak hozzá a rezisztenciához, a fitness javulásáért felelős kompenzáló gének pedig általában ugyanabban a rezisztencia génben vagy azonos szabályzó rendszert érintő génekben jelennek meg.

Következő lépésként a több mutációt is hordozó, laboratóriumban evoláltatott törzsek antibiotikum érzékenység változásainak rendszerszintű elemzését végeztük el. A *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) ajánlásait figyelembe véve három csoportra lehet osztani a minimális gátlási koncentráció által meghatározott értékeket, rezisztens, intermediér és érzékeny. Rezisztencia vesztésnek az adott kategóriák közötti átmenetet értettük: A vizsgált törzsek 54,8%-nál tapasztaltunk rezisztencia csökkenést, sőt több klón esetében igen magas 80-100%-os rezisztencia vesztés volt megfigyelhető, azaz a gyógyszerérzékenységük visszaállt a vad típusú törzs szintjére. Általánosságban azok a multidrog-rezisztens törzsek, amelyek a legmagasabb fitnessjavulásra tettek szert nem csak az adott antibiotikumra, hanem az összes keresztrezisztenciát mutató antibiotikumra is veszítettek rezisztenciájukból. Azoknál a törzseknél pedig ahol megmaradt a rezisztencia többnyire csekély mértékű volt a fitness javulása.

A teljes genom szekvenálás eredményei alapján megfigyeltük, hogy számos feltételezett kompenzáló mutáció azokkal a génekkel van funkcionális kapcsolatban, amelyek az általános multidrog rezisztenciáért felelős mechanizmusokat befolyásolják. Ezért, hogy feltárjuk a kompenzáló mutációk biológiai hatását a fitness és a rezisztencia változására, egy olyan doxiciklin rezisztens törzset választottunk részletes elemzésre, amely többféle mechanizmusú antibiotikummal szemben mutatott ellenállást az efflux pumpákat befolyásoló rezisztencia mutációk (*acrR*, *marR*) megjelenése miatt. A 60 napos antibiotikum mentes evolúciót követően egy új mutációt figyeltünk meg a *marR* promóter régiójában. Az eredeti rezisztencia és az új kompenzáló mutációk funkcionális kapcsolatának vizsgálatára rekonstruált mutáns törzseket

hoztunk létre pORTMAGE technika segítségével. Összegezve, a kompenzációs mutáció a *marR** génben az antibiotikum-rezisztens genotípusban növelte a baktérium fitneszt. Mellékhatásként ugyanaz a mutáció növelte a baktériumok érzékenységét a többi antibiotikummal szemben, mivel helyreállítja a vad típusú efflux pumpa hatékonyságot valószínűleg a *mar* regulon aktivitásának megváltoztatásával. Hasonló mintázatot találtunk egy cefoxitin-rezisztens törzsben melynek rezisztencia mutációi (*ompR*, *ompC*) csökkent porin expresszió idéznek elő. A csökkent porin expresszió és membránpermeabilitás miatt az antibiotikumokkal szembeni rezisztencia jelentős fitness költséggel jár, mivel az antibiotikumok kizárásával egyidejűleg a fontos tápanyagokat is kizárják a periplazmából. Azonban az új *envZ* gént érintő kompenzáló mutáció a porin csatornák helyreállításával párhuzamosan növelte a fitneszt és csökkentette az ampicillin rezisztenciát

Megállapításaink összhangban állnak a klinikai adatokkal, például egy klinikai tanulmány megvizsgálta a kinolonra érzékeny *E. coli* izolátumok arányát a ciprofloxacin használatának országos korlátozása előtt és után Finnországban. A kutatás kimutatta, hogy a kinolon antibiotikumok csökkent fogyasztásának eredményeként az *E. coli* kinolon rezisztenciája csökkent. Laboratóriumi vizsgálatunk viszont azt is kimutatta, hogy a ciprofloxacin rezisztencia az eredetileg rezisztens populációk 66%-ában csökkent az antibiotikumok nélküli evolúciót követően. Egy másik tanulmány a trimetoprim-tartalmú gyógyszerek használatára vonatkozó 24 hónapos önkéntes korlátozás hatását vizsgálta Svédországban a húgyúti fertőzésekben izolált trimetoprim-rezisztens *E. coli* törzsek esetében. Megállapították, hogy az összes olyan klinikai izolátum megtartja a rezisztencia szintjét, amik mutációt hordoznak a *folA*-ban, a trimetoprim célpontgénjében. Ezzel a klinikai vizsgálattal egyetértésben mi is azt figyeltük meg, hogy a *folA* mutációval rendelkező trimetoprim-rezisztens *E. coli* törzsek megőrizték rezisztenciájukat az antibiotikum-mentes laboratóriumi evolúciót követően

X. Summary

The intensive and inappropriate use of antibiotics has led to the increased frequency of multidrug resistance in both hospital- and community acquired infections. Understanding the evolutionary forces behind the clinical dynamics of antibiotic resistance (acquisition, maintenance and reversion) can guide the development of future strategies for controlling resistance in clinical pathogens.

In the absence of antibiotics, resistance mechanisms generally confer deleterious effects, typically observed as an increased generation time and reduced survival inside the host. This fitness cost could lead to the loss of resistance when the antibiotic is not present. Nevertheless, bacteria can adapt to this new environment (the absence of antibiotic) and increase their fitness. There are two possible ways how bacteria can increase fitness, either by decreasing resistance or by keeping their resistance through specific secondary mutations. According to the literature, compensatory second-site mutations that partially or fully restore fitness and maintain the resistance are more common than reversion to drug sensitivity. At the same time, a few clinical studies support the restoration of susceptibility, once antibiotic usage is decreased. Earlier studies on compensation have focused on bacteria carrying a single resistance mutation, but antibiotic-resistant clinical isolates usually carry multiple resistance mutations.

We applied a high-throughput experimental approach to study on the efficacy and phenotypic impact of compensatory evolution in *Escherichia coli* strains carrying multiple resistance mutations. We aimed to answer the question what kind process is driven by compensatory mutations that reduce both resistance level and the pleiotropic side effects of antibiotic-resistance mutations.

We estimated fitness by measuring individual fitness of each of the 60 antibiotic-resistant strains and the corresponding wild-type strain in an antibiotic-free medium. In total, 23 antibiotic-resistant strains showed significantly reduced growth compared to the ancestral wild-type strain. We detected strains with especially low fitness values in the antibiotic-free medium that were found to carry more resistance mutations and display especially high levels of resistance.

To investigate potential changes in resistance phenotypes upon evolution in an antibiotic-free environment, we initiated parallel laboratory evolutionary experiments with 23 antibiotic-resistant strains for 60 transfers. Fifty-one percent of these lines were found to exhibit significantly improved fitness, and the analysis has revealed major differences in relative fitness across strains adapted to different antibiotics, indicating that adaptation is mainly driven by the set of resistance mutations present in the initial resistant strains. Generally, the resistant mutations and compensatory mutations influenced the same regulation system or the same gene.

Next we measured the minimum inhibitory concentrations in 71 T60 lines showing significant fitness improvement and the corresponding T0 strains against a set of 11 antibiotics. Using the CLSI resistance break-point cut-offs, we categorized each strain as being resistant, intermediate or susceptible to each investigated antibiotic. A decline in resistance was defined by transitions between these categories. Strikingly, we found that resistance declined in as high as 54,8% of the strains, moreover, several strains showed massive 80-100% resistance loss, i.e. resistance restored to wild type. Generally, for multidrug resistant strains with increased fitness, we found a decrease in cross-resistance against several other antibiotics. However, resistant strains with only trifling fitness increase could maintain their resistance.

Based on whole-genome sequencing we found that several putative compensatory mutations accumulated in functionally-related transcriptional regulatory proteins involved in anti-drug defence. To gain insights into how the compensatory mutations effect fitness and antibiotic resistance level, we first focused on a multidrug-resistant strain laboratory evolved against doxycycline that carries mutations in the *acrR* and *marR* efflux pump system. Following 60 days of evolution in antibiotic free medium, a new mutation appeared in the promoter region of *marR*. We examined functional relationship between initial resistance and compensatory mutations with the help of pORTMAGE, which we used to reconstruct mutant strains. In summary, a compensatory mutation in the *marR* promoter region could restore both the efflux pump activity and the fitness, but in the same time led to the loss of multidrug resistance. Similar patterns held for a cefoxitin resistant strain carrying mutation in *ompR* and *ompC*, that change outer membrane diffusion. Reduction of porin expression causes resistance to antibiotics by reducing the membrane permeability, but it comes at a significant cost because not only antibiotics, but also important nutrients are simultaneously excluded from the periplasm. However, compensatory mutation in

envZ restore the original state of porin expression and simultaneously increase the fitness and decrease ampicillin resistance.

Our findings appear to be consistent with clinical data. For instance, a Finnish retrospective study assessed the proportion of quinolone-susceptible *E. coli* urine isolates before and after a nationwide restriction of ciprofloxacin use was implemented in Finland. The research revealed that a reduced consumption of quinolone antibiotics resulted in a significant decrease in quinolone-resistance of *E. coli*. Our laboratory study also shows that ciprofloxacin-resistance has declined in 66% of initially resistant populations, following a long-term exposure to antibiotic-free medium. Another study examined the impact of a 24-month voluntary restriction on the use of trimethoprim-containing drugs in Sweden on the prevalence of trimethoprim-resistant *E. coli* isolated from urinary-tract infections. All clinical isolates were found to retain their resistance levels and carried mutation in *folA*, the target gene of trimethoprim, even after 24 months of trimethoprim restriction. In agreement with this clinical study, we have found that all five trimethoprim resistant *E. coli* strains with a *folA* resistance mutation have maintained their resistance following laboratory evolution in antibiotic-free medium.

XI. Függelék

1.Függelék. Kiindulási törzsek rezisztencia mértéke és mutációinak száma. T0: Kiindulási rezisztens törzs, WT: vad típusú törzs

Törzsek	Kiindulási fitnesz	P érték	Mutációk száma	Rezisztencia szint (T0/WT)
AMP8	0,97	0,007111	5	24,00
CHL2	0,91	6,61E-19	4	32,00
CHL7	0,96	3,78E-05	5	32,00
CPR5	0,68	1,13E-46	4	521,74
CPR9	0,81	6,48E-33	13	130,43
DOX3	0,97	0,008405	2	32,00
FOX8	0,93	1,00E-08	6	128,00
KAN1	0,78	4,26E-35	7	128,00
KAN4	0,61	1,67E-44	8	128,00
KAN6	0,70	5,28E-09	8	16,00
KAN8	0,64	4,72E-21	12	85,33
NIT2	0,94	7,17E-06	4	85,33
NIT8	0,90	3,96E-17	7	85,33
TET3	0,95	0,000531	2	24,00
TET8	0,90	1,97E-09	3	16,00
TOB10	0,82	1,68E-39	6	336,84
TOB4	0,60	2,88E-47	13	673,68
TOB8	0,63	6,72E-25	11	673,68
TOB9	0,70	8,03E-42	13	673,68
TRM10	0,95	0,000229	4	16,00
TRM2	0,93	2,55E-09	3	16,00
TRM7	0,97	0,006965	2	16,00
TRM9	0,94	1,03E-06	5	8,00

2. függelék. A 60 napos antibiotikum mentes evolúciót követően kialakult T60 törzsek rezisztencia vesztésének és fitness javulás mértékeinek összefüggései.

T60 törzsek	Rezisztencia vesztés	Fitness javulás (t60/t0 fitness)
AMP8e	Teljes	1,09
CHL2b	Részleges	1,07
CHL2f	Részleges	1,12
CPR5a	Részleges	1,34
CPR5b	Részleges	1,28
CPR5c	Részleges	1,79
CPR5d	Részleges	1,50
CPR5e	Részleges	1,11
CPR5f	Részleges	1,56
CPR9a	Megmarad	1,44
CPR9b	Megmarad	1,15
CPR9f	Megmarad	1,17
DOX3a	Teljes	1,25
DOX3b	Teljes	1,37
DOX3c	Részleges	1,29
DOX3d	Teljes	1,17
DOX3e	Teljes	1,22
FOX8b	Részleges	1,13
FOX8c	Megmarad	1,28
FOX8d	Részleges	1,07
FOX8e	Megmarad	1,09
FOX8f	Részleges	1,15
KAN1a	Megmarad	1,14
KAN1b	Megmarad	1,21
KAN1c	Megmarad	1,27
KAN1d	Megmarad	1,47
KAN1e	Megmarad	1,32
KAN1f	Megmarad	1,27
KAN4a	Megmarad	1,14
KAN4b	Részleges	1,41
KAN4c	Megmarad	1,16
KAN4d	Részleges	1,09
KAN4e	Részleges	1,17
KAN4f	Részleges	1,12
KAN8a	Teljes	1,37
NIT8a	Részleges	1,04

T60 törzsek	Rezisztencia vesztés	Fitness javulás (t60/t0 fitness)
NIT8b	Részleges	1,35
NIT8d	Részleges	1,13
NIT8e	Részleges	1,12
TET3a	Teljes	1,15
TET3b	Teljes	1,30
TET3c	Teljes	1,34
TET3d	Teljes	1,37
TET3e	Teljes	1,39
TET3f	Teljes	1,30
TET8a	Teljes	1,34
TET8b	Teljes	1,34
TET8c	Részleges	1,30
TET8d	Részleges	1,19
TET8e	Részleges	1,21
TET8f	Teljes	1,32
TOB10b	Megmarad	1,06
TOB10c	Részleges	1,08
TOB10e	Megmarad	1,11
TOB10f	Részleges	1,38
TOB4d	Megmarad	1,16
TOB8a	Megmarad	1,14
TOB8b	Megmarad	1,24
TOB8e	Megmarad	1,13
TOB8f	Megmarad	1,08
TOB9d	Megmarad	1,16
TOB9e	Részleges	1,19
TRM10a	Részleges	1,08
TRM10b	Részleges	1,19
TRM2b	Megmarad	1,12
TRM7b	Részleges	1,08
TRM9a	Teljes	1,22
TRM9b	Részleges	1,07
TRM9c	Teljes	1,18
TRM9e	Részleges	1,05
TRM9f	Részleges	1,10

3.függelék. Szignifikáns fitness javulást mutató 15 evolválatott T60 törzs mutáció. Fekete jelölés: a kiindulási törzsek mutációi, piros jelölés: 60 napos antibiotikum mentes evolúciót követően megjelenő új mutációk.

Törzs	Pozíció	Mutáció	Annotáció	Gén
CHL2b	479,48	A→C	V127G (GTG→GGG)	acrB ←
CHL2b	481,493	IS5 (+) +4 bp	Kódoló (277-280/648 nt)	acrR →
CHL2b	879,103	G→A	intergenikus (-259/-26)	ybjG ← / → mdfA
CHL2b	3,433,524	G→A	L289F (CTC→TTC)	rpoA ←
<i>CHL2b</i>	<i>3,809,168</i>	<i>(A)8→7</i>	<i>intergenikus (-40/+26)</i>	<i>pyrE ← / ← rph</i>
CPR5a	360,752	A→G	V331A (GTG→GCG)	lacI ←
CPR5a	481,442	G→T	E76* (GAG→TAG)	acrR →
CPR5a	2,332,651	C→T	S83S (TCG→TCA)	gyrA ←
CPR5a	4,171,145	T→G	intergenikus (+292/-28)	rplL → / → rpoB
<i>CPR5a</i>	<i>2,332,651</i>	<i>5 bp→5 bp</i>	<i>Kódoló (245-249/2628 nt)</i>	<i>gyrA ←</i>
<i>CPR5a</i>	<i>4,171,144</i>	<i>2 bp→AG</i>	<i>intergenikus (+291/-28)</i>	<i>rplL → / → rpoB</i>
<i>CPR5a</i>	<i>4,267,810</i>	<i>Δ11 bp</i>	<i>Kódoló (414-424/465 nt)</i>	<i>soxR →</i>
<i>CPR5a</i>	<i>4,394,760</i>	<i>(GATGAAAGA)2→3</i>	<i>Kódoló (257/1299 nt)</i>	<i>purA →</i>
<i>CPR5a</i>	<i>3,528,734</i>	<i>(ATAGCATAATCGCCA)1→2</i>	<i>Kódoló (494/1353 nt)</i>	<i>envZ ←</i>
<i>CPR5a</i>	<i>1,613,734</i>	<i>+CTGC</i>	<i>Kódoló (358/435 nt)</i>	<i>marR →</i>
CPR9f	247,344	C→A	intergenikus (+30/-41)	lafU → / → dinB
CPR9f	481,481	IS5 (+) +4 bp	Kódoló (265-268/648 nt)	acrR →
CPR9f	981,427	Δ10 bp	Kódoló (1003-1012/1089 nt)	ompF ←
CPR9f	1,613,634	(GGAAAGG)1→2	Kódoló (258/435 nt)	marR →
CPR9f	1,860,304	Δ2 bp	Kódoló (425-426/747 nt)	mipA ←
CPR9f	2,332,640	T→C	D87G (GAC→GGC)	gyrA ←
CPR9f	2,699,006	Δ25 bp	Kódoló (1454-1478/1800 nt)	lepA ←
CPR9f	3,095,844	Δ2 bp	Kódoló (367-368/720 nt)	trmI ←
CPR9f	3,207,832	Δ3 bp	Kódoló (1427-1429/1842 nt)	rpoD →
CPR9f	3,332,674	+GG	Kódoló (751/810 nt)	mlaF ←
CPR9f	3,370,660	Δ14 bp	Kódoló (107-120/639 nt)	sspA ←
CPR9f	3,571,169	+GCC	Kódoló (918/996 nt)	gntR ←

Törzs	Pozíció	Mutáció	Annotáció	Gén
CPR9f	3,809,302	Δ1 bp	pseudogene (608/669 nt)	rph ←
<i>CPR9f</i>	<i>3,960,067</i>	<i>(ACCATC)1→2</i>	<i>Kódoló (291/1260 nt)</i>	<i>rho →</i>
<i>CPR9f</i>	<i>3,464,145</i>	<i>+TC</i>	<i>Kódoló (544/1185 nt)</i>	<i>tufA ←</i>
<i>CPR9f</i>	<i>2,066,579</i>	<i>Δ594 bp</i>	<i>Kódoló (1560-2153/3120 nt)</i>	<i>flu →</i>
DOX3a	481,157	T→C	intergenikus (-82/-60)	acrA ← / → acrR
DOX3a	1,613,627	T→G	V84G (GTG→GGG)	marR →
DOX3a	3,809,170	Δ1 bp	intergenikus (-42/+24)	pyrE ← / ← rph
<i>DOX3a</i>	<i>1,613,342</i>	<i>T→C</i>	<i>intergenikus (-177/-35)</i>	<i>marC ← / → marR</i>
<i>DOX3a</i>	<i>454,355</i>	<i>G→A</i>	<i>E4E (GAG→GAA)</i>	<i>lon →</i>
<i>DOX3a</i>	<i>2,758,815</i>	<i>Δ8 bp</i>	<i>intergenikus (-303/+50)</i>	<i>yffL ← / ← yffM</i>
DOX3c	481,157	T→C	intergenikus (-82/-60)	acrA ← / → acrR
DOX3c	1,613,627	T→G	V84G (GTG→GGG)	marR →
DOX3c	3,809,170	Δ1 bp	intergenikus (-42/+24)	pyrE ← / ← rph
<i>DOX3c</i>	<i>3,925,734</i>	<i>Δ6 bp</i>	<i>Kódoló (1059-1064/1869 nt)</i>	<i>kup →</i>
<i>DOX3c</i>	<i>1,016,417</i>	<i>A→G</i>	<i>intergenikus (-42/-177)</i>	<i>sulA ← / → sxy</i>
<i>DOX3c</i>	<i>2,064,789</i>	<i>G→T</i>	<i>intergenikus (+97/-231)</i>	<i>yeeP → / → flu</i>
FOX8b	477,976	G→T	F628L (TTC→TTA)	acrB ←
FOX8b	2,305,250	Δ1 bp	Kódoló (979/1104 nt)	ompC ←
FOX8b	3,512,125	A→G	V100A (GTC→GCC)	aroK ←
FOX8b	3,529,618	G→A	P109L (CCG→CTG)	ompR ←
FOX8b	3,809,185	C→T	intergenikus (-57/+9)	pyrE ← / ← rph
FOX8b	4,624,661	C→T	R156H (CGC→CAC)	rob ←
<i>FOX8b</i>	<i>3,528,849</i>	<i>Δ1 bp</i>	<i>Kódoló (379/1353 nt)</i>	<i>envZ ←</i>
FOX8c	477,976	G→T	F628L (TTC→TTA)	acrB ←
FOX8c	2,305,250	Δ1 bp	Kódoló (979/1104 nt)	ompC ←
FOX8c	3,512,125	A→G	V100A (GTC→GCC)	aroK ←
FOX8c	3,529,618	G→A	P109L (CCG→CTG)	ompR ←
FOX8c	3,809,185	C→T	intergenikus (-57/+9)	pyrE ← / ← rph
FOX8c	4,624,661	C→T	R156H (CGC→CAC)	rob ←
<i>FOX8c</i>	<i>3,529,601</i>	<i>G→A</i>	<i>R115C (CGT→TGT)</i>	<i>ompR ←</i>
KAN1b	388,423	Δ5,466 bp	IS3-mediated	yaiT-[yaiW]

Törzs	Pozíció	Mutáció	Annotáció	Gén
KAN1b	446,837	IS5 (-) +4 bp	Kódoló (227-230/948 nt)	cyoA ←
KAN1b	3,465,120	T→C	D585G (GAC→GGC)	fusA ←
KAN1b	3,467,682	T→A	H77L (CAC→CTC)	rpsL ←
KAN1b	3,601,549	T→A	V580E (GTG→GAG)	zntA →
KAN1b	3,910,015	A→C	F241V (TTC→GTC)	atpD ←
KAN1b	4,026,755	G→A	G84D (GGT→GAT)	trkH →
<i>KAN1b</i>	<i>2,861,510</i>	<i>A→G</i>	<i>V201V (GTT→GTC)</i>	<i>nlpD ←</i>
<i>KAN1b</i>	<i>3,430,901</i>	<i>G→A</i>	<i>S342N (AGC→AAC)</i>	<i>trkA →</i>
<i>KAN1b</i>	<i>3,809,219</i>	<i>Δ82 bp</i>		<i>[rph]–[rph]</i>
KAN4c	388,423	Δ5,466 bp	IS3-mediated	yaiT–[yaiW]
KAN4c	446,837	IS5 (+) +4 bp	Kódoló (227-230/948 nt)	cyoA ←
KAN4c	824,537	T→A	T298S (ACC→TCC)	ybhG ←
KAN4c	2,394,845	Δ1 bp	Kódoló (190/1338 nt)	nuoF ←
KAN4c	3,133,367	G→T	S104* (TCG→TAG)	hybF ←
KAN4c	3,207,160	T→A	L252Q (CTG→CAG)	rpoD →
KAN4c	3,465,073	A→C	F601V (TTT→GTT)	fusA ←
KAN4c	3,465,582	A→T	M431K (ATG→AAG)	fusA ←
KAN4c	3,467,682	T→A	H77L (CAC→CTC)	rpsL ←
KAN4c	3,767,010	T→G	L457R (CTG→CGG)	mtlA →
KAN4c	4,026,743	T→A	L80Q (CTG→CAG)	trkH →
KAN4c	4,062,420	T→A	S73C (AGC→TGC)	yihQ ←
<i>KAN4c</i>	<i>1,161,409</i>	<i>G→A</i>	<i>intergenikus (+268/-132)</i>	<i>ycfP → / → ndh</i>
<i>KAN4c</i>	<i>1,236,099</i>	<i>IS1 (-) +8 bp</i>	<i>Kódoló (1422-1429/1737 nt)</i>	<i>cvrA ←</i>
<i>KAN4c</i>	<i>1,489,382</i>	<i>IS1 (+) +9 bp</i>	<i>intergenikus (-54/-155)</i>	<i>ycdI ← / → ydcJ</i>
<i>KAN4c</i>	<i>3,133,367</i>	<i>G→T</i>	<i>S104* (TCG→TAG)</i>	<i>hybF ←</i>
TOB8a	187,375	A→C	E11A (GAG→GCG)	tsf →
TOB8a	388,423	Δ4,219 bp	IS3-mediated	yaiT–[sbmA]
TOB8a	446,837	IS5 (+) +4 bp	Kódoló (227-230/948 nt)	cyoA ←
TOB8a	1,178,276	Δ15 bp		[potD]–[potC]
TOB8a	1,986,174	G→A	A42V (GCG→GTG)	pgsA ←
TOB8a	2,080,768	(G)7→8	intergenikus (-173/+42)	yoeI ← / ← yeeY

Törzs	Pozíció	Mutáció	Annotáció	Gén
TOB8a	2,395,369	Δ1 bp	Kódoló (163/501 nt)	nuoE ←
TOB8a	2,449,375	IS5 (+) +4 bp	intergenikus (-250/+428)	yfcV ← / ← sixA
TOB8a	3,465,208	C→A	G556C (GGT→TGT)	fusA ←
TOB8a	3,465,325	G→T	H517N (CAT→AAT)	fusA ←
TOB8a	3,467,682	T→A	H77L (CAC→CTC)	rpsL ←
TOB8a	4,026,743	T→A	L80Q (CTG→CAG)	trkH →
TOB8a	3,809,219	Δ82 bp		[rph]–[rph]
<i>TOB8a</i>	<i>918,773</i>	<i>Δ2 bp</i>	<i>Kódoló (54-55/2277 nt)</i>	<i>clpA →</i>
<i>TOB9e</i>	<i>61,298</i>	<i>G→T</i>	<i>S656* (TCA→TAA)</i>	<i>rapA ←</i>
TOB9e	388,423	Δ12,767 bp	IS3-mediated	yaiT–proC
TOB9e	443,8	C→T	W106* (TGG→TAG)	cyoC ←
TOB9e	1,180,593	T→G	Q153P (CAG→CCG)	potA ←
TOB9e	1,986,148	A→T	F51I (TTT→ATT)	pgsA ←
TOB9e	2,080,483	Δ1 bp	Kódoló (61/1359 nt)	plaP ←
TOB9e	3,100,905	G→T	P537Q (CCG→CAG)	speC ←
TOB9e	3,177,134	C→A	intergenikus (+452/+38)	zupT → / ← ribB
TOB9e	3,465,045	G→T	P610Q (CCA→CAA)	fusA ←
TOB9e	3,466,333	C→A	G181C (GGT→TGT)	fusA ←
TOB9e	3,910,847	2 bp→GA	Kódoló (778-779/864 nt)	atpG ←
TOB9e	3,912,025	G→A	A398V (GCA→GTA)	atpA ←
TOB9e	4,026,743	T→G	L80R (CTG→CGG)	trkH →
<i>TOB9e</i>	<i>709,397</i>	<i>G→A</i>	<i>L128L (CTG→CTA)</i>	<i>pgm →</i>
TOB10b	388,423	Δ12,767 bp	IS3-mediated	yaiT–proC
TOB10b	444,818	Δ15 bp	Kódoló (1266-1280/1992 nt)	cyoB ←
TOB10b	2,360,814	A→C	S89R (AGT→CGT)	arnC →
TOB10b	2,389,670	C→T	W87* (TGG→TAG)	nuoI ←
TOB10b	3,465,095	A→T	F593L (TTT→TTA)	fusA ←
TOB10b	3,466,164	T→G	Y237S (TAC→TCC)	fusA ←
<i>TOB10b</i>	<i>919,984</i>	<i>+A</i>	<i>Kódoló (1265/2277 nt)</i>	<i>clpA →</i>
<i>TOB10b</i>	<i>1,178,016</i>	<i>IS1 (–) +9 bp</i>	<i>Kódoló (262-270/1047 nt)</i>	<i>potD ←</i>
<i>TOB10b</i>	<i>3,809,170</i>	<i>Δ1 bp</i>	<i>intergenikus (-42/+24)</i>	<i>pyrE ← / ← rph</i>

Törzs	Pozíció	Mutáció	Annotáció	Gén
TRM9a	455,676	G→T	D445Y (GAT→TAT)	lon →
TRM9a	481,433	IS5 (+) +4 bp	Kódoló (217-220/648 nt)	acrR →
TRM9a	851,044	Δ16 bp	Kódoló (142-157/921 nt)	ldtB ←
TRM9a	1,184,68 2	Δ1 bp	Kódoló (551/1461 nt)	phoQ ←
TRM9a	4,267,83 3	C→T	A146V (GCA→GTA)	soxR →
<i>TRM9a</i>	<i>2,346,06 6</i>	<i>C→A</i>	<i>intergenikus (-213/-60)</i>	<i>glpT ← / → glpA</i>
<i>TRM9a</i>	<i>880,656</i>	<i>IS4 (+) +13 bp</i>	<i>Kódoló (19-31/285 nt)</i>	<i>ybjH ←</i>
<i>TRM9a</i>	<i>1,185,99 1</i>	<i>Δ5 bp</i>	<i>intergenikus (-88/+77)</i>	<i>phoP ← / ← pur B</i>
<i>TRM9a</i>	<i>3,809,17 0</i>	<i>Δ1 bp</i>	<i>intergenikus (-42/+24)</i>	<i>pyrE ← / ← rph</i>
TRM9c	455,676	G→T	D445Y (GAT→TAT)	lon →
TRM9c	481,433	IS5 (+) +4 bp	Kódoló (217-220/648 nt)	acrR →
TRM9c	851,044	Δ16 bp	Kódoló (142-157/921 nt)	ldtB ←
TRM9c	1,184,68 2	Δ1 bp	Kódoló (551/1461 nt)	phoQ ←
TRM9c	4,267,83 3	C→T	A146V (GCA→GTA)	soxR →
<i>TRM9c</i>	<i>4,267,22 8</i>	<i>(T)7→8</i>	<i>Kódoló (84/324 nt)</i>	<i>soxS ←</i>
<i>TRM9c</i>	<i>1,185,99 1</i>	<i>Δ5 bp</i>	<i>intergenikus (-88/+77)</i>	<i>phoP ← / ← pur B</i>
<i>TRM9c</i>	<i>3,809,17 0</i>	<i>Δ1 bp</i>	<i>intergenikus (-42/+24)</i>	<i>pyrE ← / ← rph</i>
TRM9f	455,676	G→T	D445Y (GAT→TAT)	lon →
TRM9f	481,433	IS5 (+) +4 bp	Kódoló (217-220/648 nt)	acrR →
TRM9f	851,044	Δ16 bp	Kódoló (142-157/921 nt)	ldtB ←
TRM9f	1,184,68 2	Δ1 bp	Kódoló (551/1461 nt)	phoQ ←
TRM9f	4,267,83 3	C→T	A146V (GCA→GTA)	soxR →
<i>TRM9f</i>	<i>1,185,99 1</i>	<i>Δ5 bp</i>	<i>intergenikus (-88/+77)</i>	<i>phoP ← / ← pur B</i>
<i>TRM9f</i>	<i>3,809,21 9</i>	<i>Δ82 bp</i>		<i>[rph]–[rph]</i>
<i>TRM9f</i>	<i>4,267,46 7</i>	<i>C→T</i>	<i>A24V (GCG→GTG)</i>	<i>soxR →</i>