

**Ph.D. értekezés tézisei**

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

**Dunai Anett**

**Témavezető: Dr. Pál Csaba, tudományos főmunkatárs**

**Biológia Doktori Iskola**

**Biokémiai Intézet**

**ELKH Szegedi Biológiai Kutatóközpont**

**SZTE-TTIK**

**2022**

**Szeged.**

## Bevezetés

Az antibiotikumok széles körben elterjed és nem megfelelő használata, számos multidrog rezisztens baktérium megjelenéséhez vezetett, amely komoly közegészségügyi problémát jelent az orvostudomány számára. Az antibiotikum rezisztencia jelenségének vizsgálata azonban nem csak orvosbiológiai vonatkozásaiban fontos, hanem evolúció biológiai szempontból is jelentős, hiszen egyike azon kevés evolúciós folyamatoknak, amelyeket valós időben lehet vizsgálni.

Tehát az antibiotikumok tömeges, felelőtlen használata kiterjedt antibiotikum-rezisztenciát okoz, azonban a mai napig nyitott kérdés az, hogy az antibiotikum alkalmazás korlátozása valóban képes-e hozzájárulni a többszörös rezisztenciával bíró baktériumok számának jelentős csökkenéséhez. Az antibiotikumnak történő kitettség során rezisztencia mechanizmusok fitness előnyt jelentenek a baktériumnak az antibiotikumokkal szemben érzékeny versenytársaikkal szemben, ugyanakkor gyógyszermentes környezetben ezek a mechanizmusok növelik a generációs időt és csökkentik a túlélés esélyét. Például a porinexpresszió csökkenése a membrán permeabilitásának korlátozása révén számos antibiotikummal szemben rezisztenciát okoz, de így nem csak az antibiotikumok, hanem a fontos tápanyagok sem képesek kellő mennyiségben bejutni a baktérium sejtbe. Azonban új antibiotikummentes környezethez alkalmazkodva a mikroorganizmusok képesek gyorsan és hatékonyan ellensúlyozni a rezisztencia okozta fitnessköltséget, mivel képesek revertálni az antibiotikum rezisztenciát biztosító mutációt vagy a fitnessüket másodlagos kompenzáló mutációk segítségével feljavítani.

Az eddigi fitness kompenzációval foglalkozó laboratóriumi kísérletek többnyire amellet érvelnek, hogy a kompenzáló mutációk enyhítik a rezisztencia mutációk fitnessköltségeit anélkül, hogy befolyásolnák a rezisztencia mértékét. A legtöbb korábbi laboratóriumi vizsgálat azonban csak egyetlen rezisztencia mutációt hordozó baktériumokra összpontosított, míg az antibiotikum rezisztens klinikai izolátumok általában több ilyen mutációt hordoznak. Ezenkívül a laboratóriumi kísérletekben vizsgált mutációk általában specifikus egyes antibiotikumokra jellemző célgént érintenek, míg a klinikai izolátumok mutációi sokfélék lehetnek, beleértve az efflux pumpa mutációkat és a membrán permeabilitással kapcsolatos mutációkat.

## Célkitűzések

Az antibiotikum-rezisztencia általában olyan fitnessköltséget idéz elő, amely meghatározza az antibiotikum rezisztens baktériumpopulációk sorsát. A rezisztencia költsége azonban mérsékelhető a genomban máshol előforduló kompenzáló mutációkkal. A jelenséget szisztematikusan még nem vizsgálták, ezért munkánk során nagy áteresztő képességű laboratóriumi kompenzáló evolúciós kísérleteket végeztünk, többszörös mutációt hordozó, multidrog rezisztens törzseket vizsgálva az alábbi kérdések rendszerszintű megválaszolására:

- Mekkora az antibiotikum rezisztencia fitnessköltsége 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 háttérében milyen molekuláris mechanizmusok állnak és ezek hogyan befolyásolják a multidrog rezisztenciát antibiotikummentes környezetben?

# Módszerek

## **Antibiotikum rezisztens törzsek**

A 60 multidrog rezisztens kiindulási törzseink egy korábbi kísérletben fokozatosan növelt antibiotikum szelekció mellett evolválatott *E. coli* K12 BW25113 kultúrákból származtak. Az evolúció 12 féle antibiotikum egyikének jelenlétében. A kezdeti szubletális antibiotikum koncentrációt fokozatosan növelve 30-48 nap alatt 20-328-szoros minimális gátlási koncentráció (MIC) növekedést lehetett elérni. A 60 független evolvált vonal (antibiotikumonként 4-6 db) teljes genom szekvenálásának köszönhetően az összes mutáció ismertük, melyek általában a gyógyszercélpontokat, a sejtporomeabilitást vagy az efflux pumpákat érintették.

## **Evolúció antibiotikummentes környezetben**

A fitnessköltséggel rendelkező 23 antibiotikum rezisztens törzsből 6 párhuzamos vonalat indítottunk, melyeket 96 lyukú mikrotiter lemezen evolválatunk 60 napig antibiotikum mentes környezetben.

## **Relatív fitness mérése, a növekedési görbe felvétele**

Az evolválatott vonalakat automata inkubátorba tettük összesen 24 órás mérésre, amiből egy robotkar helyezte a lemezeket 20 percenként OD<sub>600</sub> mérésre a lemez leolvasóba.

A fitness értékeket a növekedési görbe alatti terület (AUGC) kiszámításával határoztuk meg. Egy adott törzs adott időpontban mutatott fitnessét az adott időpontban számolt vad típusú referencia törzsrre normált integrálok mediánjaként kaptuk meg. Az adatok informatikai elemzését Dr. Boros Gábor kollégám végezte el.

## **Az antibiotikum rezisztencia változásnak a mérése**

A minimális gátló koncentrációkat (MIC) standard E-teszt csíkokkal határoztuk meg. A MIC eredményei alapján és a *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI Approved Standard M100, 29th Edition) ajánlásait figyelembe véve három csoportra lehet osztani a minimális gátlási koncentráció által meghatározott értékeket, rezisztens, intermedier és érzékeny.

## **Hoechst akkumulációs mérés**

Az adaptált vonalak membrán permeabilitásának változásait a Hoechst fluorescens festék (H33342 bisbenzimid) intracelluláris akkumulációján alapuló, felskálázható méréssel vizsgáltuk. A mérések informatikai elemzését Dr. Szappanos Balázs kollégám végezte.

## **Egyedi mutációk visszaillesztése pORTMAGE technikával**

A kompenzáló mutációt és a rezisztencia mutációt (külön és kombinálva is), pORTMAGE technika segítségével rekonstruáltuk vad típusú genetikai háttérben, valamint a kompenzáló mutációt visszavittük az eredeti kiindulási rezisztens törzsbe is.

## **Teljes genom szekvenálás**

A lehetséges kompenzáló mechanizmusok azonosítására összesen 10 antibiotikum-rezisztens törzsből származó 15 adaptált vonalat választottunk ki a teljes genom szekvenáláshoz. A szekvenálást, a nyers szekvencia adatok elemzését, majd az azt követő adatelemzési validálást a Szegedi Tudományegyetem Biokémia Intézete végezte, Dr. Bodai László szakmai vezetésével. A teljes genom szekvenálás nyers eredményei az NCBI BioProject adatbázisban elérhetőek: (URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/PRJNA529335>).

# Eredmények

## **Kezdeti fitnessköltség**

Munkánk során 60 laboratóriumban evolválatott rezisztens kiindulási őshöz viszonyított fitnessköltségét határoztuk meg. Összesen 23 genotípus mutatott szignifikáns fitnesscsökkenést az ősi vad típusú törzshöz képest. Kimutattuk, hogy a magas fitnessköltség nagymértékben összefüggésbe hozható a kiindulási rezisztencia mértékével és a mutációk számával, mivel egy magasabb fokú rezisztencia pleiotrópikus hatása nagyobbak bizonyult.

## **Rezisztens törzsek 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 törzssel (T0), amelyek jelentős fitnessvesztést mutattak. Eredményeink alapján az evolvált vonalak 51%-a volt képes szignifikánsan javítani a fitnessét (T60), 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.

## **A rezisztencia változása antibiotikummentes környezetben**

A laboratóriumban evolválatott törzsek antibiotikum érzékenység változásainak rendszerszintű elemzését végeztük el, úgy hogy megmértük a minimális gátló koncentrációt (MIC) 71 szignifikáns fitnessjavulást mutató T60 vonalban, valamint a megfelelő 20 T0 törzsből, 11 féle antibiotikummal szemben. A *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) ajánlásait figyelembe véve három csoportra lehet osztani a minimális gátlási koncentráció által meghatározott értékeket, rezisztens, intermedier és érzékeny. Rezisztenciavesztésnek az adott kategóriák közötti átmenetet értettük. Az általunk vizsgált egy-egy antibiotikumhoz már alkalmazkodott kiindulási törzseknek ezzel egyidejűleg számos más antibiotikummal szemben is rezisztenciát mutattak (azaz multidrog-rezisztensek), így összesen 195 antibiotikum-T60 vonal kombinációját vizsgáltuk meg.

A vizsgált törzsek 54,8%-nál tapasztaltunk rezisztencia csökkenést, A rezisztencia csökkenésének mértéke azonban antibiotikumonként eltérő volt. Például a doxiciklin és tetraciklin rezisztencia gyakran elveszett, míg az aminoglikozid rezisztencia általában megmaradt a T60 vonalakban. Összességében a T60-as vonalak 64,7%-a mutatott jelentős csökkenést legalább egy antibiotikummal szembeni rezisztenciában, és több esetben a multidrog rezisztencia is megszűnt. 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.

### **Kompenzáló mechanizmusok vizsgálata**

A kiindulási törzsek (T0) rezisztenciáért felelős mutációit már a korábbi szekvenálási adatokból ismertük. Hogy betekintsünk a rezisztencia csökkenésének alapjául szolgáló molekuláris mechanizmusokba 15, egymástól függetlenül evolválatott T60 törzset, amelyek szignifikáns fitnessjavulást mutattak, teljes genom szekvenálásnak vetettünk alá. A törzseket 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 deléció 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 rezisztenciamutációk molekuláris visszafordulásának következménye. Úgy tűnik inkább a genom más részeiben található kompenzáló 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.

## Kompenzáló mutációk pleitróp hatása

A teljes genom szekvenálás eredményei alapján megfigyeltük, hogy számos feltételezett kompenzáló mutáció azokkal a géekkel 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 mutáció (*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. 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 rezisztenciaváltozáshoz, 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 antagonistá hatásának a következménye. Hipotézisünket az efflux pumpa hatékonyságát mérő Hoechst fluoreszcens festék (H33342 bisbenzimid) 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. A várttal megegyezően a kiindulási rezisztens 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 visszaállását. 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 fitneszköltséggel 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

## Összefoglalás

- 1) Az antibiotikumok nélküli környezetben a baktériumok fitnessze gyorsan növekedett.
- 2) Az antibiotikumokkal szembeni rezisztencia csökkent vagy teljes elveszett.
- 3) Specifikus mutációk jelentek meg, amelyek képesek egyszerre megváltoztatni a fitneszt és a rezisztencia szintjét.

## Egyezés a klinikai adatokkal

Megállapításaink összhangban állnak a klinikai adatokkal, például egy klinikai tanulmány megvizsgálta a kinolonra érzékeny *E. coli* izolátumok arányát a ciprofloxacinnal szembeni rezisztencia 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 ciprofloxacinnal szembeni 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

## **Az értekezés alapjául szolgáló publikáció**

A Dunai \*, R Spohn\*, Z Farkas\*, V Lázár\*, Á Györkei, G Apjok, G Boross, B Szappanos, G Grézal, A Faragó, L Bodai, B Papp, Cs Pál **Rapid decline of bacterial drug-resistance in an antibiotic-free environment through phenotypic reversion** eLife 2019;8:e47088

\* megosztott első szerzők

## **Egyéb publikáció**

K Bhaumik, A Hetényi, G Olajos, A Martins, R Spohn, L Németh, B Jojart, P Szili, A Dunai, P Jangir, L Daruka, I Földesi, D Kata, Cs Pál, T Martinek **Rationally designed foldameric adjuvants enhance antibiotic efficacy via promoting membrane hyperpolarization** Molecular Systems Design & Engineering , 21–33 (2022)