



Ph.D. értekezés tézisei

A vas homeosztázis, oxidatív mutagenézis és az antibiotikum rezisztencia evolúciójának kapcsolata

Méhi Orsolya Katinka

Témavezető:

Dr. Pál Csaba, tudományos főmunkatárs

Biológia Doktori Iskola, SZTE TTIK

MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Biokémiai Intézet

Szeged

2014

Bevezetés

Az antibiotikum rezisztencia jelensége napjaink nagyon is aktuális és sürgető orvostudományi problémáját képviseli. A rezisztens törzsek megjelenése nemcsak a fertőző betegségek kezelhetőségét veszélyezteti, hanem számos olyan gyógyászati kezelést és beavatkozást is, melyekhez elengedhetetlen az antibiotikumok alkalmazása. Az antibiotikum rezisztencia jelenségének vizsgálata orvosbiológiai vonatkozásai mellett evolúcióbíológiai szempontból is jelentős, hiszen egyike azon kevés evolúciós folyamatoknak, amelyeket valós időben lehet vizsgálni.

Mikroorganizmusok esetén a két legfontosabb mechanizmus az antibiotikum rezisztencia kialakulásában a horizontális génátadás (gén-transzfer), valamint a rezisztenciát okozó kromoszómális (endogén) mutációk felhalmozása. Antibiotikum- és baktériumtörzs-függő lehet, hogy melyik mechanizmus révén alakul ki a rezisztencia, de gyakran a két mechanizmus együtt járul hozzá egy igen magas rezisztenciaszint kialakulásához.

Számos antibiotikum esetén (pl. fluorokinolonok, rifampicinek) a rezisztencia kialakulása elsődlegesen a kezelés során, újonnan (*de novo*) megjelenő kromoszómális mutációk hatására történik. A mutációk révén kialakuló rezisztencia mechanizmusok három fő kategóriába sorolhatók: 1) az antibiotikum célmolekulájának módosulása, 2) az antibiotikum transzportjának módosulása (bejutásának csökkenése vagy kipumpálásának növelése), 3) az antibiotikumot lebontó vagy hatástalanító enzimek expressziójának megemelkedése.

Munkánk során az endogén mutációk révén, *de novo* módon kialakuló antibiotikum-rezisztencia jelenségére összpontosítottunk, letális dózisú ciprofloxacín alkalmazása esetén. A fluorokinolonok családjába tartozó ciprofloxacín a klinikumban széles körben alkalmazott ölé hatású (baktericid) antibiotikum. Vizsgálatainkhoz az alapvető módszertant a rövid távú laboratóriumi evolúciós kísérletek jelentették, amelyeket az *Escherichia coli* Gram-negatív baktériummal végeztünk.

Célkitűzések

Két megközelítésből vizsgáltuk a rezisztencia kialakulásának hátterében álló mechanizmusokat, az alábbi két kérdésre keresve a választ:

1) Vannak-e olyan nem esszenciális gének *E. coli* esetén, amelyek hiánya felgyorsítja a rezisztencia kialakulását letális dózisú antibiotikum alkalmazása esetén? Ha igen, ez milyen mechanizmus(ok) révén valósul meg?

2) Milyen szerepe van az intracelluláris vas-homeosztázisnak a ciprofloxacinnal szembeni rezisztencia kialakulásában?

Alkalmazott módszerek

- *E. coli* kultúrák tenyésztése
- Elektrokompetens sejtek készítése és transzformáció
- Antibiotikumok minimális gátló koncentrációjának meghatározása
- Antibiotikumokkal szemben *de novo* módon kialakuló rezisztencia mérése rövid távú, magas áteresztőképességű evolúciós kísérlettel
- Túlélés-vizsgálatok antibiotikum jelenlétében
- Rifampicines és Lac reverziós mutációs ráta mérések
- Fluoreszcencia alapú promóter-aktivitás vizsgálatok
- Antibiotikum hatására történő reaktív oxigéngyök-termelés mérése redox-érzékeny fluoreszcens festék segítségével
- Molekuláris biológiai módszerek és eljárások: genomi DNS-, RNS-, és plazmid izolálás, polimeráz-láncreakció, agaróz-gélelektroforézis, alapvető DNS klónozási technikák, gendelációk létrehozása P1 fág-transzdukciós eljárással.
- Membrán-permeabilitás mérés Hoechst festék felhalmozódási teszttel
- Microarray alapú génexpressziós vizsgálatok

Eredmények összefoglalása

A géinaktiváció szerepének vizsgálatához egy genom léptékű keresést végeztünk a közel 4000 egyszeres géndeléciós törzset tartalmazó *Escherichia coli* kollekción (KEIO) felhasználva. A vizsgálat eredményeként öt olyan gént azonosítottunk, amelyek deléciója jelentősen megnövelte a ciprofloxacinnal szembeni rezisztens populációk megjelenési gyakoriságát a vad típushoz képest. A kódolt fehérje funkciója szempontjából az azonosított gének három különböző kategóriába sorolhatók: DNS hibajavítás (*mutS*, *mutH*, *mutL*), transzlációs pontosság biztosítása (*miaA*) és vas-homeosztázis szabályozása (*fur*). Közös jellemzőjük viszont az, hogy hiányukban megemelkedik a sejt spontán mutációs rátája, vagyis mutátor fenotípust kölcsönöznek, ami jelentősen megnöveli a rezisztencia kialakulásának esélyét. Eredményeink hangsúlyozzák a mutátor genotípusok rezisztencia kialakulását előmozdító szerepét. Szélsőséges antibiotikum stressz esetén a magas mutációs ráta előnyt jelent a bakteriális populációk számára, mivel megnöveli a túlélést biztosító rezisztencia mutációk megjelenési esélyét.

A vas-homeosztázis szabályozásában központi szerepet játszó *fur* gén kihalászása a genom léptékű vizsgálat során az intracelluláris vas-egyensúly és az antibiotikum rezisztencia kapcsolatára irányította a figyelmünket. Igazoltuk, hogy a vas-egyensúly felbomlása elősegíti a rezisztencia kialakulását letális dózisu (a vad típusú *E. coli* törzs minimális gátló koncentrációjának hatszorosa) ciprofloxacinnal szemben.

A transzkriptomikai vizsgálat eredményei alapján ciprofloxacinnal szembeni kezelés hatására a Δfur genotípusra specifikus módon génexpressziós átrendeződés történik. A vasfelvételben szerepet játszó gének jelentős részét tették ki a megváltozott expressziót mutató géneknek.

Kimutattuk, hogy az intracelluláris szabad vas koncentrációjának szabályozása kulcsfontosságú szerepet tölt be a ciprofloxacinnal szembeni rezisztencia kialakulásában. A magas intracelluláris szabad vaskoncentráció ugyanis a hidroxilgyök generáló Fenton reakció "táplálásán" keresztül oxidatív stresszt eredményez. Ez utóbbi pedig oxidatív mutagenézisen keresztül mutációk megjelenéséhez, és azok következményeként

rezisztencia kialakulásához vezethet. Gátolva a sziderofórokhoz kötött vasfelvételt, serkentve az intracelluláris vasraktározást vagy vaskelátor alkalmazásával minimalizálva a szabad vas koncentrációját, csökkenthető volt a ciprofloxacín rezisztens populációk megjelenése a Δfur törzs esetében.

Az intracelluláris szabad vas koncentrációja mellett a szuperoxid koncentrációja is meghatározó tényező az antibiotikum rezisztencia kialakulását illetően. A szuperoxid hatástalanításában deficiens, magas szuperoxid-szinttel rendelkező $\Delta sodAB$ törzs a Fur deficiens törzshöz hasonlóan megemelkedett gyakorisággal képez rezisztens populációkat. Ez a hatás vaskoncentráció függő, mivel a sziderofór-közvetített vasfelvétel gátlásával ebben az esetben is csökkenthető volt a rezisztencia kialakulása. A megemelkedett szuperoxid- és vaskoncentráció tehát egymás hatását erősítve járulnak hozzá az oxidatív mutagenézishez és a rezisztencia kialakulásához. Ugyanakkor anaerob körülmények között a Δfur és $\Delta sodAB$ törzsek esetén egyaránt drasztikusan lecsökkent a rezisztens populációk megjelenési gyakorisága az aerob környezethez képest, ami alátámasztja az oxidatív mutagenézis jelentős szerepét a rezisztencia kialakulásának folyamatában.

Korábbi munkák kimutatták, hogy az ölő hatású (baktericid) antibiotikumok felpörgetik a légzési láncot és változásokat idéznek elő a vasháztartásban is, ami oxidatív stressz kialakulásához vezet. Reaktív oxigéngyök-méréseink alapján az általunk alkalmazott ciprofloxacín kezelés az intracelluláris reaktív oxigéngyökök szintjét enyhé, de szignifikáns módon megemeli, hozzájárulva az oxidatív stressz fokozásához. Azt feltételezzük, hogy a megemelkedett intracelluláris vaskoncentráció és a ciprofloxacín okozta oxidatív stressz egymást erősítve járulnak hozzá a rezisztencia kialakulásához.

Az SOS válaszban szerepet játszó, hibázásra hajlamos Pol IV és Pol V polimerázok mutáció generáló aktivitása csak csekély mértékben járul hozzá a rezisztenciát okozó mutációk megjelenéséhez a Δfur törzs esetében. Feltételezéseink szerint az oxidált nukleotidok jelentős részének beépítése a DNS szálba a Pol III replikatív polimeráz által történhet. A MutS fehérje túltermeltetésével kimutattuk, hogy a Δfur törzs esetében a rezisztenciát okozó mutációk megjelenése nem függ a metilirányított DNS hibajavító rendszer oxidatív károsodásokat javító aktivitásától.

Az általunk alkalmazott kísérleti körülmények között a ciprofloxacín által kiváltott oxidatív stressz egy magas intracelluláris szabad vaskoncentrációval társulva, az oxidatív mutagenézisen keresztül a rezisztencia kialakulását segíti elő, és nem az öló hatást. Ennek alapján az antibiotikumok által indukált oxidatív stressz fokozása, amit más munkákban javasolnak, nem megfelelő stratégia az antibiotikumok hatékonyságának növelésére, mivel a reaktív oxigéngyökök mutagenézisben betöltött szerepe hangsúlyosabb az öló hatásnál.

Az értekezéshez kapcsolódó publikációk

Méhi O, Bogos B, Csörgő B, Pál C. 2013. **Genomewide Screen for Modulators of Evolvability under Toxic Antibiotic Exposure**. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**:3453–3456.

I.F.: 4.606

Méhi, O., Bogos, B., Csörgő, B., Pál, F., Nyerges, Á., Papp, B., Pál, C. 2014. **Perturbation of Iron Homeostasis Promotes the Evolution of Antibiotic Resistance**. *Mol Biol Evol* **31**: 2793–2804.

I.F.: 14.308

Egyéb publikációk

Fehér T, Bogos B, Méhi O, Fekete G, Csörgő B, Kovács K, Pósfai G, Papp B, Hurst LD, Pál C. 2012. **Competition between Transposable Elements and Mutator Genes in Bacteria**. *Mol Biol Evol* **29**:3153–3159.

I.F.: 10.353

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**.

I.F.: 11.340

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**. *Nat Commun* **5**.

I.F.: 10.015