

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

Ph.D. értekezés

Méhi Orsolya Katinka

Témavezető: Dr. Pál Csaba

Biológia Doktori Iskola

MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Biokémiai Intézet

SZTE TTIK

Szeged

2014

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés.....	1
A tudományos munka jelentősége	1
2. Szakirodalmi áttekintés	5
2.1. Az antibiotikumok és az ellenük kialakuló rezisztencia jelensége	5
2.1.1. Az antibiotikumok általános jellemzése és csoportosítása.....	5
2.1.2. A fluorokinolon antibiotikumok általános jellemzése	6
2.2. Az antibiotikum rezisztencia kialakulásának főbb mechanizmusai	9
2.2.1. Az antibiotikum rezisztencia főbb típusai	9
2.2.2. A fluorokinolon antibiotikumokkal szemben kialakuló rezisztencia jelensége	11
2.3. A mutációs ráta szerepe az antibiotikum rezisztencia kialakulásában.....	12
2.3.1. Konstitutív mutátorok	14
2.3.2. Átmeneti (stresszindukált) mutátorok	15
2.4. Az oxidatív stressz és az antibiotikum rezisztencia kapcsolata	18
2.4.1. A baktericid antibiotikumok által indukált oxidatív stressz	18
2.4.2. A vas-homeosztázis szabályozása és szerepe az oxidatív stressz kialakulásában <i>E. coli</i> -ban.....	19
2.4.2.1. A vasfelvétel szabályozása	20
2.4.2.2. A vasraktározás szabályozása.....	21
2.4.2.3. A vas-homeosztázis fenntartása	22
2.4.3. Az oxidatív stressz sejtkárosító hatásai és az ellenük kialakult fontosabb védekezési mechanizmusok <i>E. coli</i> -ban.....	24
2.4.3.1. A szuperoxid sejtkárosító hatásai elleni védekezés	25
2.4.3.2. A hidrogén-peroxid sejtkárosító hatásai elleni védekezés.....	26
2.4.3.3. A hidroxilgyök citotoxikus és mutagén hatásai.....	27
2.4.4. Az oxidatív stressz kétélű fegyver jellege: letalitás vs mutagenesis	28
2.4.4.1 A vas által közvetített oxidatív mutagenesis	28
2.4.4.2. A vas-közvetített oxidatív mutagenesis és az antibiotikum rezisztencia kapcsolata	29

3. Célkitűzések	31
4. Anyagok és módszerek.....	32
4.1. Felhasznált baktériumtörzsek, plazmidok és oligonukleotid primerek.....	32
4.2. Elektrokompetens sejtek készítése és transzformáció	36
4.3. Antibiotikumok minimális gátló koncentrációjának meghatározása	36
4.4. Antibiotikumokkal szemben <i>de novo</i> módon kialakuló rezisztencia mérése	37
4.5. Genom szintű keresés a gén-inaktiváció szerepének vizsgálatára a ciprofloxacinnal szembeni rezisztencia kialakulásában.....	38
4.6. Túlélés-vizsgálatok antibiotikum jelenlétében	38
4.7. Mutációs ráta vizsgálatok	39
4.7.1. Rifampicines mutációs ráta mérés.....	39
4.7.2. Lac reverziós mutációs ráta mérés	39
4.8. Fluoreszcencia alapú génexpressziós vizsgálatok	40
4.9. Antibiotikum hatására történő reaktív oxigéngyök-termelés mérése dihidrorodamin segítségével.....	41
4.10. Membrán-permeabilitás mérés Hoechst festék felhalmozódási teszttel	42
4.11. Microarray alapú génexpressziós vizsgálatok	42
5. Eredmények	44
5.1. Genom szintű szűrés letális koncentrációjú ciprofloxacinhoz való alkalmazkodást elősegítő géninaktivációk azonosítására.	44
5.1.1. Öt nem esszenciális gén azonosítása, amelyek deléciója megemelkedett evolvabilitást kölcsönöz letális koncentrációjú ciprofloxacinnal szemben.	44
5.1.2. A genom szintű keresés során azonosított gének inaktiválása nem változtatja meg az érzékenységet vagy a túlélési képességet ciprofloxacinnal szemben.....	46
5.1.3. A genom szintű keresés során azonosított gének kiütése növeli a mutációs rátát. .	48
5.1.4. Ciprofloxacinnal szembeni rezisztens $\Delta mutS$ és vad típusú populációk jellemzése a rezisztenciát okozó mutációk típusa alapján.	51
5.2. A vas-közvetített oxidatív mutagenézis és az antibiotikum rezisztencia kapcsolata	53
5.2.1. A vas homeosztázis szabályozó fehérjéjének (Fur) inaktiválása elősegíti a rezisztencia kialakulását letális dózissal szemben.....	53
5.2.2. A Fur regulon plaztikus átrendeződést mutat ciprofloxacinnal szembeni kezelés hatására.	55

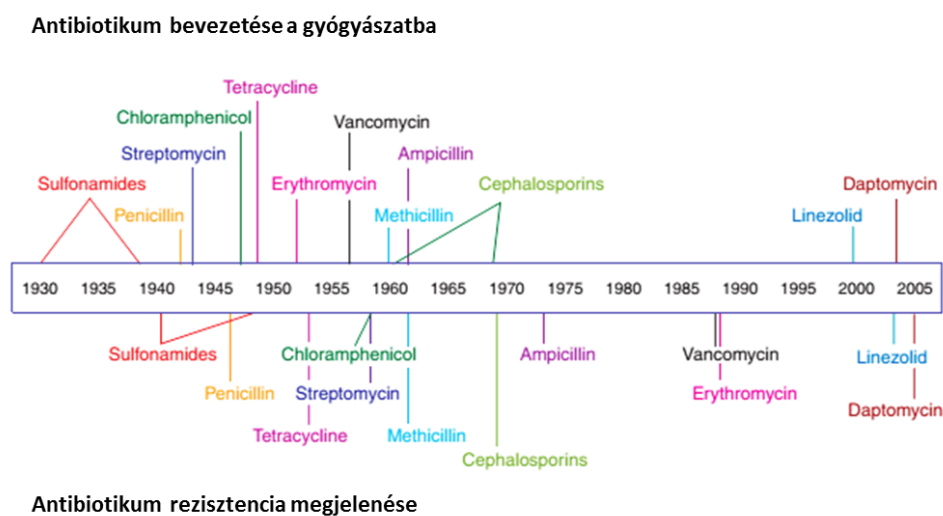
5.2.3. Az intracelluláris szabad vastartalom kulcsfontosságú szerepet tölt be a ciprofloxacinnal szembeni rezisztencia kialakulásában.	59
5.2.4. A szuperoxid szerepe a rezisztencia kialakulásában	62
5.2.5. A megemelkedett intracelluláris vasszint és a ciprofloxacinnal okozta oxidatív stressz egymást erősítve járulnak hozzá a rezisztencia kialakulásához.	63
5.2.6. Az anaerob körülmények gátolják a rezisztencia kialakulását.....	66
5.2.7. A Δfur evolvabilitási képessége túlnyomórészt független a hibázásra hajlamos DNS polimerázok és a MutS fehérje aktivitásától.	67
6. Az eredmények megvitatása.....	69
6.1. A baktériumsejt spontán mutációs rátáját növelő mechanizmusok elősegítik az antibiotikum rezisztencia kialakulását.	69
6.2. A vas-közvetített oxidatív stressz szerepe az antibiotikum rezisztencia kialakulásában.	71
6.2.1. A vas-egyensúly felbomlása elősegíti a rezisztencia kialakulását letális koncentrációjú ciprofloxacinnal szemben.	71
6.2.2. Ciprofloxacinnal kezelés hatására átrendeződik a Fur regulon.....	71
6.2.3. Az intracelluláris szabad vastartalom kulcsfontosságú szerepet tölt be a ciprofloxacinnal szembeni rezisztencia kialakulásában.	72
6.2.4. A megemelkedett intracelluláris vastartalom és a ciprofloxacinnal indukált oxidatív stressz egymást erősítve járulnak hozzá a rezisztencia kialakulásához.	74
6.2.5. A Δfur törzs emelkedett evolvabilitási képessége O_2 -függő.....	75
6.2.6. A Δfur evolvabilitási képessége túlnyomórészt független a hibázásra hajlamos DNS-polimerázok és a MutS fehérje aktivitásától.	75
7. Gyakorlati következtetések	78
Köszönetnyilvánítás	79
Szakirodalmi hivatkozások	80
Saját publikációk jegyzéke	94
Összefoglalás	95
Summary	99
Függelék	102

1. Bevezetés

A tudományos munka jelentősége

Az antibiotikumokkal szembeni rezisztencia kialakulásának hátterében álló általános törvényszerűségek és kiváltó tényezők feltérképezése és tisztázása kiemelt orvostudományi jelentőséggel bír (Neu, 1992). Az antibiotikum rezisztens törzsek megjelenése nemcsak a fertőző betegségek kezelhetőségét veszélyezteti, hanem számos olyan gyógyászati kezelést és beavatkozást is, melyekhez elengedhetetlen az antibiotikumok alkalmazása (Levy és Marshall, 2004).

Az antibiotikum rezisztencia jelenségének vizsgálata ugyanakkor evolúcióbíológiai szempontból is jelentős, hiszen egyike azon kevés evolúciós folyamatoknak, amelyeket valós időben lehet vizsgálni (Martinez, 2014). Evolúciós megközelítésből az antibiotikumok gyógyászatba való bevezetése egy hosszú távú evolúciós kísérlet kezdetének is felfogható. Az elmúlt hat évtizedben ugyanis „szemtanúi” lehetünk annak a fegyverkezési versenynek, amely a gyógyászat és a fertőző kórokozók között zajlik (Andersson és Levin, 1999). A mikroorganizmusok bravúros adaptációs képességét bizonyítja az, hogy az újabb és újabb antibiotikumok bevezetését szabályszerűen követte az adott antibiotikumokra rezisztens törzsek megjelenése (1. ábra).



1. ábra. A főbb antibiotikumok gyógyászatba való bevezetése és a rezisztencia megjelenésének időrendi ábrázolása. ((Clatworthy és mtsai., 2007) nyomán).

A többszörösen rezisztens (multirezisztens) törzsek, amelyek a gyógyászatban alkalmazott antibiotikumok többségével szemben ellenállóak, világszerte azzal fenyegetnek, hogy a csökkent kezelhetőség miatt számos fertőző betegség újra járvány méreteket ölthet (Walsh, 2003a). A 2014. áprilisi jelentésében az Egészségügyi Világszervezet (World Health Organization, WHO) felhívja a figyelmet arra, hogy az antibiotikum rezisztencia világszintű fenyegetést jelent a közegészségügy számára. A 114 országot átölelő felmérés hét különböző baktériumtörzsrre koncentrált, amelyek olyan közönséges, de súlyos betegségeket okoznak, mint a tüdőgyulladás, hasmenés, húgyúti fertőzések, szepszis vagy a gonorrhoea. Több antibiotikum esetében tapasztaltak csökkent vagy megszűnt hatékonyságot ezekkel a fertőzésekkel szemben. Az *E. coli* által okozott húgyúti fertőzések kezelésére használt fluorokinolonok például számos országban hatástalannak bizonyultak a páciensek több mint felénél (World Health Organization, 2014) (<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/amr-report/en/>). Más adatok szerint, az Egyesült Államokban a *Staphylococcus aureus* MRSA (Methicillin-resistant Staphylococcus aureus) vonalainak igen magas mortalitás tulajdonítható, kiváltképp a HIV fertőzésben szenvedő betegek esetében (Crum-Cianflone és mtsai., 2007).

Mikroorganizmusok esetén a két legfontosabb mechanizmus az antibiotikum rezisztencia kialakulásában a horizontális génátadás (gén-transzfer), valamint a rezisztenciát okozó kromozómális (endogén) mutációk felhalmozása. Antibiotikum- és baktériumtörzsfüggő lehet, hogy melyik mechanizmus révén alakul ki a rezisztencia, de gyakran a két mechanizmus együtt járul hozzá egy igen magas rezisztenciaszint kialakulásához (Levy és Marshall, 2004).

Azt gondolhatnánk, hogy az antibiotikum rezisztencia megjelenése az antibiotikumok gyógyászatba való bevezetéséhez köthető. Ez nincs teljesen így, mivel az antibiotikumok jelentős része a természetben előforduló molekulák leszármazottja, amelyeket a mikroorganizmusok évmilliók óta használnak egymás ellen, alakítva a mikrobiális közösségek szerkezetét (Allen és mtsai., 2010). Az antibiotikum rezisztencia tehát nem új keletű jelenség, hanem valószínűleg egyidős az antibiotikum-termelő fajok megjelenésével, hiszen ezek a fajok rendelkeznek a megfelelő védekezési mechanizmusokkal is a saját maguk által termelt „kémiai fegyver” ellen (D’Costa és mtsai., 2011). Az antibiotikumok enzimatisz uton történő hatástalanítása egyike ezeknek a védekezési stratégiáknak (Davies, 1994). Az antibiotikum bioszintéziséért felelős és a rezisztenciát biztosító gének gyakran ugyanannak az operonnak a részei, ami lehetővé teszi összehangolt szabályozásukat (Hubbard és Walsh,

2003). A talajlakó mikroorganizmus-közösségekben rejlő hatalmas rezisztencia-potenciálra világított rá az a munka, amely során változatos életterekből származó talajmintákból törzseket izoláltak és jellemezték őket érzékenységük szempontjából 21 különböző antibiotikummal szemben. A *Streptomyces* génuszba tartozó közel 500 törzs jellemzése során a törzsek átlagosan 7-8 antibiotikummal szemben rezisztensnek bizonyultak (D'Costa és mtsai., 2006). Ez az eredmény rávilágít arra, hogy a talajlakó és más környezetben élő mikrobiális közösségek a rezisztencia-faktorok „gyűjtőtartályaként” szolgálhatnak és potenciálisan képesek lehetnek ezen faktorok továbbítására a kórokozó fajoknak (D'Costa és mtsai., 2006; Davies, 1994; Nesme és mtsai., 2014).

Fontos azonban megjegyezni, hogy mi, emberek is nagymértékben hozzájárultunk és jelenleg is hozzájárulunk a multirezisztens kórokozók megjelenéséhez és globális elterjedéséhez. Az antibiotikumok helytelen, mértéktelen és gyakran ellenőrizetlen használata nemcsak a gyógyászatban, hanem például az állattenyésztésben is jelentősen felgyorsította a rezisztens kórokozók megjelenését és elterjedését (Palumbi, 2001; Teuber, 2001; Walsh, 2003a).

Sürgetővé vált tehát olyan kiegészítő terápiás stratégiákat kidolgozni, amelyekkel csökkenteni lehet az ellenálló baktériumtörzsek megjelenésének esélyét, így megőrizvén az alkalmazott antibiotikumok hatékonyságát. Az elmúlt hét évtized „evolúciós kísérletéből” világossá vált ugyanis, hogy az új antibiotikumok kifejlesztése csak rövid távú megoldást jelentene, hiszen ezekkel szemben is belátható időn belül megjelennek a rezisztens kórokozó törzsek. Különböző típusú próbálkozások léteznek a gyógyászatban a rezisztencia megjelenési esélyének csökkentésére és ezáltal az antibiotikum terápia hatékonyságának növelésére. Ilyenek például a kombinációs terápiák, amelyek esetén két vagy több, általában egymás hatását erősítő antibiotikumot együttesen alkalmaznak (jellemzően egy béta-laktám antibiotikumot egy fluorokinolon vagy aminoglikozid antibiotikummal), vagy az antibiotikumot egy más jellegű adjuvánssal együtt alkalmazzák. Utóbbi esetben, az alkalmazott adjuváns a rezisztencia kialakulási esélyét csökkenti (pl. a béta-laktamáz-gátló klavulánsav), vagy erősíti az antibiotikum hatását (pl. a kolisztin antimikrobiális peptid) (Tamma és mtsai., 2012; Worthington és Melander, 2013).

A rezisztens kórokozók elleni küzdelemben egy ígéretes irányvonalat képviselnek a peptid alapú antibiotikumok (antimikrobiális peptidek), melyek antimikrobiális tulajdonságaik mellett a veleszületett immunrendszer végrehajtóiként (immunmódosítókként) is működnek.

Antimikrobiális hatásukat jellemző módon a sejtmembrán integritásának megbontása révén érik el, de pontos hatásmechanizmusuk kevésbé ismert és intenzíven kutatott. Mivel igen hatékony antimikrobiális szereknek bizonyulnak egyre inkább a rezisztencia kutatás középpontjába kerülnek. Utóbbi kutatások célja annak feltárása, hogy milyen eséllyel alakul ki velük szemben rezisztencia, összehasonlításban az antibiotikumokkal (Gruenheid and Le Moual, 2012; Hancock, 2001).

Doktori munkám az endogén mutációk révén, *de novo* módon kialakuló antibiotikum-rezisztencia jelenségére összpontosít, letális antibiotikum dózis alkalmazása esetén. Ehhez az alapvető módszertant a rövid távú laboratóriumi evolúciós kísérletek jelentették, amelyeket az *Enterobacteriaceae* családba tartozó *Escherichia coli* Gram-negatív baktériummal végeztünk. A molekuláris biológia ígaslovának is nevezett kólibaktérium kiváló modellorganizmus, mivel laboratóriumi körülmények között könnyen és gyorsan tenyészthető, valamint rendkívül gazdag molekuláris és genetikai adatmennyiség áll rendelkezésünkre róla (Elena és Lenski, 2003). Kommenzalistaként az *E. coli* a humán bélflóra legsikeresebb fakultatív anaerob baktériumtörzsét képviseli. Virulencia faktorokkal felfegyverkezett patogén változatai, ún. patotípusai viszont számos betegséget (húgyúti és emésztőszervi megbetegedéseket, szepszist, agyhártyagyulladást) okozhatnak (Kaper és mtsai., 2004), ami szintén indokolja modellorganizmusként való felhasználását.

2. Szakirodalmi áttekintés

2.1. Az antibiotikumok és az ellenük kialakuló rezisztencia jelensége

2.1.1. Az antibiotikumok általános jellemzése és csoportosítása

Az antibiotikumok (elnevezésük alapján „élet elleni” ágensek) olyan vegyületek, amelyek különböző mikroorganizmusokban (baktériumok, gombák, más egysejtűek) a sejtek életben maradása szempontjából létfontosságú folyamatokat gátolnak. Lehetnek természetes, más mikroorganizmusok által termelt vegyületek (például a *Penicillium notatum* penészgomba által termelt penicillin), vagy pedig ember által előállított félszintetikus vagy szintetikus származékok (Walsh, 2003b). Gyógyászati szempontból népszerűségük abban rejlik, hogy hatásukat a mikroorganizmusokra specifikusan fejtik ki, anélkül, hogy jelentősen beleavatkoznának az emberi szervezet életfolyamataiba. Specifitásuk annak köszönhető, hogy olyan sejt-folyamatokat gátolnak, amelyek csak a baktériumokra jellemzőek (pl. sejt-falszintézis, folsav szintézis), vagy a baktérium-specifikus célmolekulákat (pl. bakteriális riboszóma-alegységek) támadják (Walsh, 2003b).

Attól függően, hogy az antimikrobiális hatásuk letális (azaz baktériumokat ölő) vagy csak növekedés-gátló, megkülönböztetünk baktericid, illetve bakteriosztatikus antibiotikumokat (Walsh, 2003b). Ezen a kétféle típusú, gyógyászatban hasznított hatásukon kívül azonban a természetben (pl. a talajban) jellemzően előforduló, gátló koncentráció alatti tartományban sokkal széleskörűbb és árnyaltabb hatáskörrel rendelkeznek (Davies és mtsai., 2006). A legfontosabbnak ezek közül a mikrobiális közösségek fajok közti kémiai kommunikációjában betöltött szerepüket tartják a génexpressziót módosító hatásuk révén (Davies, 2006; Yim és mtsai., 2006). Kimutatták, hogy az antibiotikumok dózis-függő, ún. hormetikus választ váltanak ki: rendkívül alacsony koncentrációban hatásuk génexpressziót módosító, míg magas koncentrációban növekedés-gátló illetve ölő (Calabrese és Baldwin, 2002; Fajardo és Martínez, 2008).

Az alapján, hogy milyen létfontosságú sejt-funkciót gátolnak, öt nagyobb kategóriájukat különböztetjük meg: sejt-fal-szintézis gátlók, fehérjeszintézis gátlók, DNS-

szintézis gátlók, RNS-szintézis gátlók és folsav-szintézis gátlók (Kohanski és mtsai., 2010a; Levy és Marshall, 2004; Walsh, 2003b) (**1. táblázat**).

Hatásmechanizmus	Fontosabb antibiotikum családok
Sejtfal-szintézis gátlása	Penicillinek, Cefalosporinok, Karbapenemek, Monobaktámok, Glikopeptidek
Fehérje-szintézis gátlása	Tetraciklinek, Aminoglokozidok, Oxazolidononok, Streptograminok, Ketolidok, Makrolidek, Linkozamidok
DNS-szintézis gátlók	Fluorokinolonok
RNS-szintézis gátlók	Rifampicin
Folsav-szintézis gátlók	Szulfonamidok, Trimetoprim
Egyéb mechanizmus	Daptomicin, Metronidazol

1. táblázat. A fontosabb antibiotikum családok hatásmechanizmus alapján történő csoportosítása (Levy és Marshall, 2004) nyomán.

Az antibiotikumnak a specifikus célmolekulájához való kapcsolódása eredményeként egy komplex, többszintű válaszreakció indul be a sejtben, ami biokémiai, molekuláris és ultrastruktúrális szintű változásokat egyaránt magába foglal (Kohanski és mtsai., 2010a). Elsődleges sejtszintű hatásaikat tekintve a kinolonok a DNS giráz (topoizomeráz II) vagy topoizomeráz IV gátlása révén kettős szálú DNS töréseket hoznak létre (Drlica és mtsai., 2008), a rifamicinek az RNS polimeráz β -alegységének gátlása révén leállítják a DNS-függő RNS szintézist, a sejtfal-szintézis gátlók megbontják a sejt struktúrális integritását, míg a fehérjeszintézis gátlók a sejt energetikai háztartásába avatkoznak bele a riboszómákhoz való kötődés, illetve a fehérjék hibás translációja révén (Kohanski és mtsai., 2010a).

2.1.2. A fluorokinolon antibiotikumok általános jellemzése

Doktori munkám középpontjában a fluorokinolonok családjába tartozó ciprofloxaccinnal szemben kialakuló rezisztencia jelenségének vizsgálata állt. Az 1980-as évek végén bevezetett fluorokinolonok az egyik leggyakrabban alkalmazott antibiotikumcsaládot képviselik a gyógyászatban. Ez elsősorban gyors ölőképességüknek és széles

hatásspektrumuknak (aerob Gram-negatív és Gram-pozitív fajok, néhány anaerob Gram-negatív faj) köszönhető (Drlica et al., 2008; Redgrave et al., 2014). A humán gyógyászatban való alkalmazásukon kívül az állatgyógyászatban és állattenyésztésben való alkalmazásuk is igen jelentős (Brown, 1996; Collignon, 2005). Az 1995-2009-es időszakban Európában és az Amerikai Egyesült Államokban egyaránt jelentős emelkedés volt tapasztalható a kinolon antibiotikumok, elsősorban a második- és harmadik-generációs kinolonok felhasználásában a járóbetegek körében. Ebben az időszokban a második-generációs kinolonok (elsősorban a ciprofloxacin) tették ki a felhasznált kinolonok több mint 50%-át (Adriaenssens et al., 2011; Linder et al., 2005) Az Élelmiszer és Gyógyszer Hatóság adatai szerint 2011-ben az Amerikai Egyesült Államokban megközelítőleg 23 millió járóbeteg számára írtak fel fluorokinolon antibiotikumot, melyeknek a 70%-át a ciprofloxacin jelentette (<http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/ucm365050.htm>).

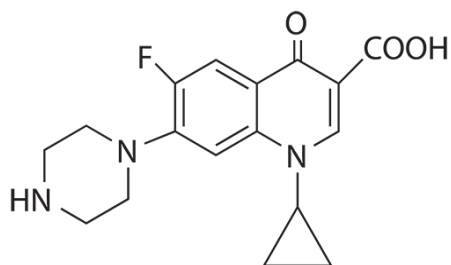
Négy generációjukat különböztetjük meg : első-generációs kinolonok (nalidixinsav - mint az elsőként izolált kinolon -, oxolinsav), második generációs kinolonok (pl. norfloxacin, ciprofloxacin, ofloxacin), harmadik generációs kinolonok (pl. sparfloxacin, gatifloxacin), negyedik generációs kinolonok (pl. moxifloxacin, gemifloxacin). A második, harmadik és negyedik generációs kinolonok a nalidixinsavnak módosított szerkezetű, hatékonyabb baktériumölő aktivitású és szélesebb hatásspektrumú szintetikus származékai (Redgrave és mtsai., 2014).

A kinolon antibiotikumok elsődleges célpontja Gram-negatív baktériumokban a DNS-giráz (topoizomeráz II), míg Gram-pozitív baktériumokban a topoizomeráz IV (Drlica, 1999). Bár a kétféle topoizomeráz hasonló mechanizmus alapján működik és mindkettő esszenciális feladatot lát el a DNS replikációban, funkciójuk eltér egymástól (Drlica és mtsai., 2008). A DNS giráz az újonnan keletkező DNS (illetve RNS) szál elongációját segíti elő, azáltal, hogy ATP-függő módon negatív csavarulatokat visz be a DNS szálba, így megszüntetve a replikációs vagy transzkripciós komplex előtt kialakuló torziós (csavarodási) feszültséget a DNS-ben (Chen és mtsai., 1996). A DNS giráz a *gyrA* és *gyrB* által kódolt alegységekből épül fel és A₂B₂ tetramerként kapcsolódik a DNS-hez (Drlica és Zhao, 1997). A GyrA alegység feladata a torziós feszültség megszüntetése, amit azáltal valósít meg, hogy hasítja a kettős szálú DNS-t és a kettős szálú intakt DNS egy szakaszát átbújtatja ezen a törésen, majd újból összekapcsolja a foszfodiészter kötésekkel. Mindehhez a GyrB alegység által megkötött és hidrolizált ATP energiáját használja fel (Reece és mtsai., 1991). A topoizomeráz IV-nek dekaténáló szerepe van, azaz elválasztja egymástól a topológiailag kapcsolt leány

kromoszómákat a replikáció végső fázisában (Drlica, 1999; Levine és mtsai., 1998). A DNS girázhoz hasonlóan kétféle alegységből épül fel, amelyeket a *parC* és *parE* gének kódolnak és ugyancsak A₂B₂ tetramerként kötődik a DNS-hez (Peng és Marians, 1993).

A fluorokinolonok nemcsak egyszerűen a DNS giráz vagy a topoizomeráz IV aktivitását szüntetik meg, hanem DNS kettős törést indukáló ágensekké alakítják át ezeket az enzimeket, azáltal, hogy egy hármast, ún. "törött" komplexben (fluorokinolon – topoizomeráz - DNS) tartva őket megakadályozzák a DNS végek (foszfodiészter kötések) újbóli összekapcsolását. A hármast létrejött megakadályozza a replikációs gépezet továbbhaladását, leállítva ezáltal a DNS szintézist, ami a sejt növekedésének leállításához, majd sejtthálához vezethet (Chen és mtsai., 1996; Drlica, 1999). Kinolon típusától függően változik, hogy a kromoszóma feldarabolódás letális hatásának megnyilvánulásához szükséges-e az oxigén jelenléte és/vagy a működőképes fehérjeszintézis, vagy pedig fehérjeszintézistől és oxigén jelenlététől független módon is megnyilvánul ez a hatás (Drlica és mtsai., 2008; Malik és mtsai., 2006, 2007). A DNS kettős törések aktiválják a RecA fehérje koproteáz aktivitását, ami elősegíti a LexA represszor fehérje autoproteolízisét és végső soron indukálja az SOS stresszválaszban szerepet játszó géneket (Courcelle és Hanawalt, 2003; Foster, 2007).

Az általunk alkalmazott ciprofloxacint a második generációs karboxikinolonok csoportjába tartozik. Szerkezetileg szoros hasonlóságot mutat a norfloxacinnal, azzal az eltéréssel, hogy az 1-es pozícióban ciklopropil csoportot tartalmaz etil csoport helyett (Barry és mtsai., 1984). Gátolt fehérjeszintézis és oxigén hiányában is kifejti ölü hatását, de anaerob körülmények között magasabb koncentráció mellett fejti ki ugyanazt a hatást (Lewin és mtsai., 1991; Malik és mtsai., 2007).



2. ábra. A ciprofloxacint szerkezeti képlete

2.2. Az antibiotikum rezisztencia kialakulásának főbb mechanizmusai

Az antibiotikumokkal szemben kialakuló rezisztencia jelenségére már maga Alexander Fleming is rávilágított csupán néhány évvel a penicillin felfedezése után: „Valószínűleg nem létezik olyan kemoterápiás szer amelyre a baktériumok megfelelő körülmények között ne lennének képesek ellenállással [rezisztenciával] reagálni” (Fleming, 1946) (Alekszun és Levy, 2007). Ahogy azt már Fleming is felismerte, a jelenség mögött egy evolúciós alkalmazkodási folyamat rejlik, hiszen az antibiotikum(ok)nak való kitettség egy stressztényezőt és ebből kifolyólag egy erős szelektációs nyomást jelent a mikroorganizmusok számára. Ilyen körülmények között azok az egyedek fognak kiszelektálódni és elterjedni a populációban, amelyek genetikai anyaguk módosulásán keresztül ellenállóképességet (rezisztenciát) biztosító mechanizmusokat alakítottak ki az antibiotikummal szemben (Martinez és mtsai., 2009). Definíció szerint, egy mikroorganizmus érzékeny egy adott antibiotikum hatásával szemben, ha nem rendelkezik sem horizontális géntranszfer útján szerzett, sem kromoszómális mutáción alapuló rezisztencia mechanizmussal az adott szerrel szemben. Ellenkező esetben rezisztensnek tekinthető az adott antibiotikummal szemben (Martinez, 2014).

2.2.1. Az antibiotikum rezisztencia főbb típusai

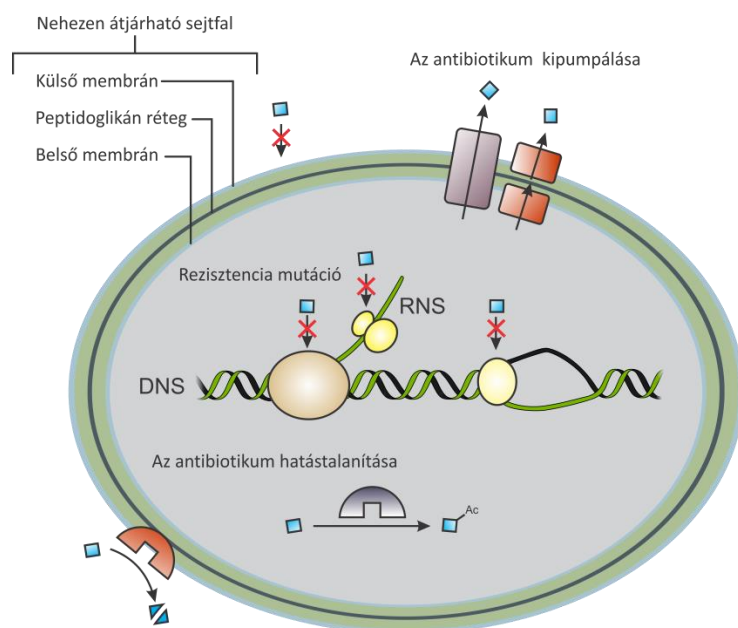
Két fő kategóriáját különböztetjük meg az antibiotikum rezisztenciának: természetes és szerzett rezisztenciát. Természetes rezisztenciáról beszélünk, amikor egy mikroorganizmus strukturális vagy funkcionális jellemzőinek köszönhetően ellenálló egy adott antibiotikum hatásával szemben. A természetes rezisztencia többféle okból adódhat. Néhány ezek közül: 1) az antibiotikum képtelen bejutni az adott mikroorganizmusba, vagy 2) aktívan eltávolítódik onnan (pl. efflux pumpák működése által), 3) az antibiotikum nem rendelkezik célmolekulával az adott sejtben, vagy 4) bizonyos enzimek hatástalanítják a sejtben vagy még a bejutást megelőzően, a sejtben kívül (Fernández és Hancock, 2012).

A szerzett rezisztencia két fő úton alakulhat ki: 1) az antibiotikummal szemben ellenállást biztosító, újonnan keletkező (endogén) mutációk megjelenése révén, vagy 2) a rezisztenciát biztosító gének horizontális úton történő megszerzésével (Alekszun és Levy,

2007). A kétféle mechanizmus gyakran egymással kölcsönhatva járul hozzá igen magas rezisztencia-szint kialakulásához, ugyanakkor antibiotikum- és fajfüggő, hogy melyik mechanizmus járul hozzá domináns módon a rezisztencia kialakulásához (Martinez és mtsai., 2009).

A rezisztencia faktor horizontális megszerzése történhet plazmid vagy konjugatív transzpozon közvetítette konjugációval, bakteriofág közvetítette transzdukcióval, szabad DNS általi transzformációval (Levy és Marshall, 2004), vagy transzpozonok és integronok közvetítésével (Mazel, 2006). Az átadás megvalósulhat nemcsak ugyanazon nemzetségen belüli fajok között, hanem filogenetikailag egymástól távol álló csoportok között is, például Gram-pozitív és Gram-negatív fajok között is (Courvalin, 1994).

Számos antibiotikum esetén (pl. fluorokinolonok, rifampicinek) a rezisztencia elsődlegesen a terápia során, újonnan megjelenő kromoszómális mutációk révén alakul ki (Martinez és Baquero, 2000; Alekshun és Levy, 2007).



3. ábra. Az antibiotikum rezisztencia kialakulásában szerepet játszó legfontosabb mechanizmusok Gram-negatív baktérium esetén: 1) rezisztencia mutációk megjelenése az antibiotikum célmolekuláját kódoló gén(ek)ben, 2) nehezen átjárható sejtfa, 3) az antibiotikum kipumpálása efflux pumpák által, 4) az antibiotikum enzimatikus hatástalanítása a sejten belül vagy kívül ((Allen és mtsai., 2010) nyomán).

A mutációk révén kialakuló rezisztencia mechanizmusok három fő kategóriába sorolhatók: 1) az antibiotikum célmolekulájának módosulása, 2) az antibiotikum transzportjának (bejutásának vagy kipumpálásának) módosulása, 3) az antibiotikumot lebontó vagy hatástalanító enzimek expressziójának megemelkedése (Alekszun and Levy, 2007; Allen és mtsai., 2010; Jayaraman, 2009) (**3. ábra**).

2.2.2. A fluorokinolon antibiotikumokkal szemben kialakuló rezisztencia jelensége

A fluorokinolon antibiotikumok esetében a mutációk okozta rezisztencia mechanizmusok közül az antibiotikum célpontjának (DNS giráz vagy topoizomeráz IV) alegységeit kódoló génekben (*gyrA*, *gyrB* valamint *parC*, *parE*) megjelenő mutációk képezik a rezisztencia kialakulásának leggyakoribb forrását (Drlica és Malik, 2003; Hooper, 2001). A rezisztenciát biztosító mutációk Gram-negatív baktériumok, így *E. coli* esetén is elsődlegesen a *gyrA* gén 5' végének közelében elhelyezkedő QRDR (quinolone resistance determining region) régióban jelennek meg. A leggyakrabban megjelenő mutációk az S83L és D87G aminosavcsereket okozó mutációk (Nakamura és mtsai., 1989; Yoshida és mtsai., 1991). Gram-pozitív baktériumokban a *parC* gén QRDR régiójában jelennek meg elsődlegesen mutációk. Mindkét gén esetén a QRDR régió az enzim aktív centrumában lévő tirozin kodonja közelében helyezkedik el. Az ebben a régióban megjelenő mutációk lecsökkentik a fluorokinolon enzimhez való kötődését, ami rezisztencia kialakulásához vezet (Alekszun és Levy, 2007; Hooper, 2001). A fluorokinolonokkal szembeni rezisztencia kialakulásának másik forrását az antibiotikum transzportját (csökkent bejutását vagy megnövekedett kipumpálását) befolyásoló mutációk jelentik, melyek hatására lecsökken az antibiotikum effektív intracelluláris koncentrációja (Fernández és Hancock, 2012). Ezek a mutációk a fluorokinolonok kipumpálását végző efflux pumpák (pl. AcrAB-TolC), illetve az őket szabályozó fehérjék génjeiben (pl. *marA*, *marR*) (Maneewannakul és Levy, 1996), valamint az általános porinok génjeiben (pl. *ompF*) jelennek meg (Drlica és Malik, 2003; Fernández és Hancock, 2012; Kern és mtsai., 2000).

Az esetek legnagyobb részében a mutációk megjelenése lépcsőzetes (graduális) és a klinikai szempontból releváns rezisztencia-szint kialakulásához *E. coli*-ban több mutáció megjelenése szükséges (Hooper, 2001; Marcusson és mtsai., 2009). Az igen magas rezisztencia-szinttel rendelkező klinikai törzsek több targetmutációt és efflux pumpa mutációt

tartalmazzak, és gyakran multirezisztens (mar – multiple antibiotic resistance) fenotípust mutatnak (Cohen és mtsai., 1989; Morgan-Linnell és mtsai., 2009). Ciprofloxacin esetében a közepesen magas rezisztenciával (0.06-4 µg/ml) rendelkező *E. coli* vonalak általában csak egy *gyrA* mutációt hordoznak és csak ritkán tartalmaznak mutációt a *parC* génben is. Ezzel ellentétben a magas rezisztenciával rendelkező *E. coli* klinikai törzsek (≥ 4 µg/ml) több *gyrA* és legalább egy *parC* mutációt hordoznak (Bagel és mtsai., 1999; Heisig, 1996).

Ugyanakkor, a fluorokinolonokkal szemben nemcsak endogén mutációk révén alakulhat ki rezisztencia, hanem plazmid-közvetített horizontális génátadás révén is. A legismertebb ezek közül a plazmidon elhelyezkedő *qnr* géncsalád tagjai által biztosított rezisztencia jelensége (Strahilevitz és mtsai., 2009). A pentapeptid ismétlődést tartalmazó Qnr (quinolone resistance) fehérjék a DNS girázhoz való kötődésük révén védik azt a fluorokinolonok hatása ellen, egy antitoxin-szerű funkciót betöltve (Tran és Jacoby, 2002). Ugyancsak plazmid által kódolt az a gén is, amely egy aminoglikozid acetiltransferáz változatot kódol AAC(6')-Ib-cr, amely a ciprofloxacin módosítása révén csökkenti annak aktivitását (Robicsek és mtsai., 2006). Ezek a plazmid-közvetített rezisztencia mechanizmusok jelentősen hozzájárulhatnak a klinikai relevanciájú, igen magas rezisztencia megjelenéséhez, azáltal, hogy alacsony vagy közepes rezisztenciát biztosítva alapot szolgáltatnak a mutációk megjelenéséhez (Strahilevitz és mtsai., 2009).

2.3. A mutációs ráta szerepe az antibiotikum rezisztencia kialakulásában

Az evolúció két legfontosabb mozgatórugója a variabilitás („az evolúció alapanyaga”) és a szelekció (Bell, 1997). Ugyanez érvényes az antibiotikum rezisztencia mikrobiális evolúciójára is, ahol a genetikai variabilitást a random mutációk biztosítják, míg a szelekciót az antibiotikum jelenléte, mint stressztényező. Ha a két paraméter emelkedést mutat - nő a genetikai variabilitás (a mutációs ráta megemelkedése révén) vagy a szelekció erőssége (túlzott antibiotikum használat miatt) – az maga után vonja a rezisztencia kialakulásának megnövekedett gyakoriságát is (Martinez és mtsai., 2009).

A természetben ritkán, vagy csak rövid ideig előforduló stabil növekedési körülmények között egy klonális populáció számára „előnyös” a spontán mutációs rátáját alacsony szinten tartani a káros mutációk megjelenésének megelőzése végett (Drake, 1991a).

Ugyanakkor a mutációk határozzák meg az evolúció ritmusát és módját, és maga a mutációs ráta is alanya az evolúciós folyamatoknak (Sung és mtsai., 2012). DNS vírusok és prokarióták esetén a nukleotidhely/generációra vonatkoztatott mutációs ráta fordítottan arányos a genommérettel, és egy állandó érték körül mozog (Drake, 1991b). Soksejtű eukarióták esetén viszont pozitív összefüggés figyelhető meg a generációra vonatkoztatott mutációs ráta és a genomméret között (Lynch, 2010). Előzetes feltételezésekkel (Drake, 1991b) ellentétben a mutációs ráta küszöbértékét nem a fiziológias megkötések határozzák meg, hanem sokkal inkább a genetikai sodródás által korlátozott természetes szelekció mértéke, ami az effektív populációmérettől függ (Lynch, 2010; Sung és mtsai., 2012). *E. coli*-val végzett legújabb vizsgálatok ugyanakkor kimutatták, hogy adott genotípuson belül, a genom egy meghatározott részére vonatkozó mutációs ráta plasztikusan változhat a sejt-sejt közötti interakciók hatására, negatív korrelációt mutatva a populációsűrűséggel (Krašovec és mtsai., 2014).

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, illetve laboratóriumi és klinikai körülmények között egyaránt (Denamur és mtsai., 2002; Matic és mtsai., 1997; Oliver és mtsai., 2000; Sniegowski és mtsai., 1997). Erős szelekciós nyomás mellett a mutátor genotípusok gyorsan elterjedhetnek a populációban, annak igen jelentős részét (> 1%) képezve (LeClerc és mtsai., 1996). Ezáltal jelentős szerepet töltenek be a mikrobiális evolúcióban (Sniegowski és mtsai., 1997; Taddei 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 evolvabilitásnak (Giraud és mtsai., 2001). Ennek megfelelően evolúciós sikerességükhöz a baktérium populációknak folyamatosan finomhangolni kell a mutációs rátájukat (Denamur és Matic, 2006).

Attól függően, hogy a sejt mutációs rátája állandó jelleggel magas vagy csak meghatározott stressz körülmények között emelkedik meg, megkülönböztetünk konstitutív (permanens) mutátorokat, illetve átmeneti (tranzien) mutátorokat (Foster, 2005).

2.3.1. Konstitutív mutátorok

A konstitutív mutátorok döntő többségben a DNS replikációban vagy hibajavításban szerepet játszó enzimeket kódoló génekben megjelenő funkcióvesztéssel vagy -csökkenéssel járó mutációknak köszönhetően jelennek meg (Horst és mtsai., 1999). A mutátor fenotípust okozó géneket mutátor géneknek is nevezik és *E. coli*-ban 4 fő kategóriájukat különböztetjük meg annak alapján, hogy milyen hibajavítási vagy más típusú folyamatban játszanak szerepet: 1) a DNS-replikáció hűségét biztosító (proofreading) aktivitásban (pl. *mutD*), 2) a metilirányított DNS-hibajavításban (metil-directed mismatch repair) (*mutS*, *mutL*, *mutH*, *uvrD*), 3) a DNS oxidatív károsodásainak elkerülésében (pl. *mutT*, *oxyR*, *sodA*) és az oxidatív károsodások kijavításában (pl. *mutM*, *mutY*) és 4) a transzlációs hűséget biztosító folyamatokban (pl. *miaA*) (Chopra és mtsai., 2003; Miller, 1996). A vad típushoz viszonyított spontán mutációs rátában való eltérés alapján különböző erősségű mutátor törzseket különböztetünk meg (Chopra és mtsai., 2003). A legerősebb ismert mutátor fenotípust *E. coli*-ban a Pol III általános DNS-polimeráz exonukleáz aktivitásáért felelős epszilon alegység génjében (*mutD*)(*dnaQ*) bekövetkező pontmutáció okozza (Schaaper és Radman, 1989).

A természetben leggyakrabban előforduló mutátor baktériumtörzsek a metilirányított hibás-párosodás DNS-javításban (angolul: metyl-directed mismatch repair) deficiens törzsek, ezek közül is a legelterjedtebbek a MutS deficiens törzsek (Chopra és mtsai., 2003; LeClerc és mtsai., 1996). A hibás-párosodás DNS-javításnak kiemelkedő szerepe van a genom integritásának megőrzésében, amit az is tükröz, hogy a hibajavító folyamatban résztvevő fehérjék egy része evolúciósan konzervált, a prokariótáktól az emberig (Schofield és Hsieh, 2003). A sejt mutációs rátáját alacsony szinten tartja azáltal, hogy felismeri és kijavítja azokat a DNS hibákat (hibás bázispárosodásokat valamint 1-4 nukleotid hosszúságú inszerció és deléció hurkokat), amelyek a replikáció és a homológ rekombináció során, illetve különböző DNS károsító anyagok hatására keletkeznek (Horst és mtsai., 1999; Junop és mtsai., 2003; Wyrzykowski és Volkert, 2003). *Escherichia coli*-ban a MutS, MutL, MutH és UvrD fehérjék központi szerepet játszanak ebben a DNS hibajavítási folyamatban. Az őket kódoló gének deléciója vagy csökkent expressziója a sejt össz-mutációs rátájának és a nem homológ rekombináció gyakoriságának megemelkedéséhez vezet, hiper-mutagén és hiper-rekombináns fenotípust eredményezve (Iyer és mtsai., 2006; Schofield és Hsieh, 2003). Ezen mutátor törzsek mutációs rátája a vizsgált baktériumfajtól és mutációs ráta tesztől függően változhat, *E. coli*-ban 100-1000-szerese a vad típusénak (Miller, 1996).

A mutátor genotípusok és ezen belül a metilirányított DNS hibajavításban deficiens vonalak egy jelentős veszélyforrást képviselnek az antibiotikum rezisztens baktériumtörzsek megjelenésében (Chopra és mtsai., 2003; Gould és mtsai., 2007; Miller és mtsai., 2004b; Wiegand és mtsai., 2008a). A metilirányított DNS hibajavításban deficiens vonalak nemcsak a rezisztencia kialakulásához szükséges mutációk megjelenési gyakoriságát növelik meg, hanem a hiper-rekombináns fenotípusuk miatt a különböző fajok közti horizontális géntranszfer esélyét is (Stambuk és Radman, 1998). Az antibiotikum jelenléte, mint stresszkörülmény egy erős pozitív szelekciót jelent a mutátor genotípusok elterjedése irányába, amelyek az általuk biztosított előnyös rezisztencia mutációkkal való kapcsoltságuk révén „potyautasként” terjednek el a populációban. A krónikus fertőzések során is ez a pozitív szelekció érvényesül. A cisztás fibrózist okozó *Pseudomonas aeruginosa* törzsek igen jelentős része mutátor fenotípusú (Oliver és mtsai., 2000). Más patogén baktériumtörzsek (pl. *E. coli*, *Salmonella enterica*) esetén is tapasztalták a mutátorok magas arányú előfordulását (Denamur és mtsai., 2002; LeClerc és mtsai., 1996). A mutátor fenotípus ugyanakkor nemcsak az antibiotikum rezisztencia megjelenését segíti elő, hanem a különböző virulencia faktorok megszerzését és a kolonizációs képességet is pozitívan befolyásolja (Oliver és Mena, 2010).

2.3.2. Átmeneti (stresszindukált) mutátorok

A konstitutív mutátor genotípusok esetében a megemelkedett mutációs ráta biztosította adaptációs előnnyel együtt jár a káros mutációk gyakoribb megjelenési valószínűségének fitness terhe is. Léteznek azonban olyan bakteriális mechanizmusok is, amelyek csak stresszkörülmények esetén, viszonylag szabályozott módon emelik meg a mutációs rátát, felszabadítva ez által a sejtet az állandóan jelen lévő mutációs tehertől (Bjedov és mtsai., 2003). Ezeknek a stresszindukált mutagenezis folyamatoknak általános jellemzője, hogy különböző stressztényezők hatására (pl. DNS károsodás, éhezés, antibiotikumok vagy mutagén anyagok jelenléte, hőmérsékletváltozás) központi szabályozó elemek génexpressziós és metabolikus változásokat idéznek elő, amelyek gyakori következménye a sejt mutációs rátájának a megemelkedése (Foster, 2007). A stresszindukált mutagenezis folyamatoknak többféle, részben átfedő útvonala ismert attól függően, hogy milyen stressztényező aktiválja őket és milyen szabályozó elem irányítása alatt állnak. A ma ismert legfontosabb útvonalak *E. coli*-ban a következők: 1) a DNS károsodás által indukált és LexA represszor fehérje által

szabályozott SOS válasz, 2) az éhezés/stacioner fázis által indukált és az RpoS (σ^{38}) alternatív szigma faktor által szabályozott általános stresszválasz, 3) a hőstressz által indukált és az RpoH (σ^{32}) alternatív szigma faktor által szabályozott hő sokk válasz, 4) az aminosav éhezés által indukált és a guanozin-tetra-foszfát (ppGpp) jelmolekula által szabályozott stringens válasz (Foster, 2005).

A felsorolt stresszindukált útvonalak közül a leggyakrabban az SOS válasz során indukálódó hibázásra hajlamos DNS polimerázok (Pol II, Pol IV, Pol V) aktivitásának hatására emelkedik meg a sejt mutációs rátája (Schlacher és Goodman, 2007). Ha a DNS különböző tényezők hatására (pl. UV sugárzás, DNS kettős törést okozó antibiotikumok, káros metabolikus intermedierek, magas nyomás, stb) károsodást szenved, több mint 40 gén indukálódik szabályozott módon *E. coli*-ban az ún. SOS válasz keretén belül, a LexA represszor fehérje inaktiválódásának eredményeként (Friedberg és mtsai., 2002; Kelley, 2006). A DNS károsodás hatására közvetlen vagy közvetett módon egyes-szálú DNS szakaszok keletkeznek, amelyeket a RecA rekombináz fehérje felismer és kapcsolódik hozzájuk. A keletkezett RecA - egyes-szálú DNS nukleoprotein komplex serkenti a LexA represszor fehérje autoproteolízisét, ami az SOS gének derepresszációhoz vezet (Foster, 2007). A derepresszációzott gének között vannak a ún. magas hibaszázalékú vagy hibázásra hajlamos DNS polimerázok génjei is. Ezen polimerázok aktivitásának köszönhető a sejt mutációs rátájának megemelkedése az SOS válasz indukációjának egyik következményeként (Goodman, 2002).

A hibázásra hajlamos DNS polimerázok a fennálló stressz idejére, az elakadt replikáció helyén átveszik a Pol III polimeráz helyét, mivel azzal ellentétben a károsodott DNS-t is képesek sokszorozítani. Ezáltal biztosított a sejt túlélése, ami viszont együtt jár a csökkent hűségű replikáció eredményeként megjelenő pontmutációk és deléciók okozta mutációs teherrel. *E. coli*-ban az Y-polimerázok családjába tartozó Pol IV és Pol V polimerázok hibarátája 2-4 nagyságrenddel nagyobb, mint a Pol III replikációs polimeráznak (Tippin és mtsai., 2004). Máig vitatott, hogy ezen polimerázok mutációgeneráló tulajdonsága a stressz körülményekhez való alkalmazkodást segíti elő (Shee és mtsai., 2011), vagy egyszerűen csak „mellékterméke” a sejt túlélését biztosító fiziológiai szerepüknek, az alacsonyabb replikációs hűségükből adódóan (Andersson és mtsai., 2010).

A DNS károsodás természetétől és szekvenciakörnyezetétől függően mindhárom DNS polimeráznak (Pol II, Pol IV, Pol V) szerepe van a stressz-indukált mutagenézis folyamatában

(Friedberg és mtsai., 2002; Napolitano és mtsai., 2000). Ugyanakkor, a *dinB* illetve *umuDC* gének által kódolt Pol IV és Pol V polimerázoknak kiemelt szerepet tulajdonítanak az oxidált nukleotidok beépítése által okozott mutagenézisben (Yamada és mtsai., 2006). A három polimeráz közti fő szerepfelosztás a következő: Pol II - elakadt replikációs villa újraindítása, Pol V – (hibás) bázispárosítás, Pol IV – (hibás) bázispárosítást követő lánchosszabbítás.

A Pol V többféle típusú DNS lézió keresztül képes szintézist végezni, mint a Pol IV, de aktivációjához szükséges az UmuD alegységek RecA által elősegített autoproteolitikus hasítása, akárcsak a LexA esetében. Mindkét polimeráz „proofreading”ellenőrző aktivitás hiányában hibázásra hajlamos sértetlen és károsodott DNS-en egyaránt (Tippin és mtsai., 2004). A Pol IV elsődleges feladata a lézió való áthaladást követő lánchosszabbítás (Goodman, 2002) és a Pol V-el ellentétben SOS és LexA független módon is indukálódhat, az RpoS általános stresszválasz-regulátor pozitív szabályozása alatt. Ez az indukció *E. coli* esetében a késői stacioner fázisú sejtekben, éhezési körülmények között történik meg és biztosítja a Pol IV magas koncentrációját több napon keresztül (Layton és Foster, 2003). A Pol IV polimerázt kódoló *dinB* gén túlexpresszálatása stressz körülmények hiányában is mutagén hatású, és elsősorban pontmutációk és egy-nukleotidos deléciók megjelenéséhez vezet (Kobayashi és mtsai., 2002; Kuban és mtsai., 2005; Wagner és Nohmi, 2000). Ezen kívül a Pol IV polimeráznak kulcsfontosságú szerepet tulajdonítanak az oxidált guanin (8-oxo-dGTP) deoxiadenozinnal szembeni hibás beépítésében, hozzájárulva ez által a GC – TA transzverziók megjelenéséhez, amelyek a megemelkedett oxidatív stressz indikátorai (Foti és mtsai., 2012).

Stressz körülmények közötti mutációs ráta növelő aktivitásuknak köszönhetően az SOS válaszban részt vevő polimerázok (Pol IV, Pol V, Pol II) fontos szerepet játszanak az antibiotikumokkal szembeni rezisztencia kialakulásában. Nemcsak *in vitro* kísérletekkel, hanem *in vivo* egérmodellben is igazolták, hogy az SOS válasz indukálódásában gátolt patogén *E. coli* törzs esetén jelentősen lecsökkent a ciprofloxacín és rifampicin antibiotikumokkal szemben kialakuló rezisztens populációk gyakorisága (Cirz és Romesberg, 2007; Cirz és mtsai., 2005). Ennek alapján az antibiotikumokkal szembeni rezisztencia kialakulását csökkentő egyik lehetséges terápiás stratégiaként javasolták az SOS válasz vagy a hibázásra hajlamos polimerázok indukálódásának specifikus szerekkel való gátlását (Cirz és Romesberg, 2007).

Kimutatták, ugyanakkor, hogy maguk az antibiotikumok is indukálhatnak mutagenezist különböző mechanizmusokon keresztül. A DNS kettős törést okozó fluorokinolon antibiotikumokon kívül a sejtfalszintézis-gátló β -laktám antibiotikumok is indukálják az SOS választ a DpiBA két-komponensű szignáltranszdukciós rendszeren keresztül (Cirz és mtsai., 2005; Miller és mtsai., 2004a). A béta-laktámok mutagén hatása ugyanakkor az SOS választól függetlenül is megvalósul a Pol IV polimerázt kódoló *dinB* indukcióján keresztül (Pérez-Capilla és mtsai., 2005). Utóbbi esetben a mutagén hatás megnyilvánulásához szükséges a metilirányított DNS-hibajavító rendszer aktivitásának csökkenése, ami RpoS által szabályozott (Gutierrez és mtsai., 2013).

Ezen kívül kimutatták azt is, hogy a baktericid antibiotikumok szubletális koncentrációban reaktív oxigéngyökök generálásán keresztül is indukálhatnak mutagenezist (Kohanski és mtsai., 2010b).

2.4. Az oxidatív stressz és az antibiotikum rezisztencia kapcsolata

2.4.1. A baktericid antibiotikumok által indukált oxidatív stressz

Néhány éve bevezettek egy olyan mechanisztikus modellt, amely azt feltételezi, hogy a baktericid antibiotikumok ölü hatása, a célmolekula-specifikus folyamatok mellett, egy közös mechanizmusra, reaktív oxigéngyökök generálására vezethető vissza, függetlenül a specifikus célmolekulától. Ezt a radikálisan új elképzelést kiterjesztették Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumokra egyaránt (Dwyer és mtsai., 2009, 2014; Kohanski és mtsai., 2007), sőt gombaölő (fungicid) szerekre is *Candida albicans* és *Saccharomyces cerevisiae* esetében (Belenky és mtsai., 2013).

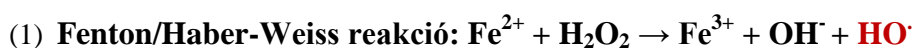
Baktériumok esetében a modell értelmében az elsődleges antibiotikum-célmolekula kölcsönhatás következményeként egy olyan fiziológias reakciósorozat indul be, amely változásokat idéz elő a sejt anyagcseréjében és a légzési láncban, és végeredményeként oxidatív károsodásoknak tulajdonítható sejthalálhoz vezet. Az antibiotikumnak a célmolekulá(i)val való kölcsönhatásának következményeként fokozódik a sejt NADH-felhasználása, ami felpörgeti az elektrontranszportláncot (légzési láncot). Utóbbi eredményeként szuperoxid (O_2^-) termelődik és a sejt NADH tartalékai átmenetileg

lecsökkennek. A szuperoxid károsítja a Fe-S centrummal rendelkező enzimeket, melyekből Fe^{2+} szabadul fel, ami a Fenton reakció táplálása révén a rendkívül reaktív hidroxilgyök ($\text{OH}\cdot$) képződéséhez vezet. A keletkezett hidroxilgyök a legfontosabb sejtalkotók (DNS, fehérjék, lipidek) károsítása révén a sejt halálához vezet (Dwyer és mtsai., 2007; Kohanski és mtsai., 2010a).

A Fe-S centrumok szintéziséért felelős IscS fehérje hiányában a baktericid antibiotikumokkal történő kezelés hatására csökkent hidroxilgyök-termelést mértek a vad típushoz képest (Kohanski és mtsai., 2007). Ez az eredmény rávilágít a Fe-S tartalmú enzimek Fe-S centrumaiból felszabaduló vas jelentős szerepére a hidroxilgyök-termelésben. Emellett génexpressziós vizsgálatokkal kimutatták, hogy a DNS-giráz gátló norfloxacinval való kezelés hatására számos vasfelvételben szerepet játszó gén expressziója megváltozik, olyan génekkel együtt, amelyek a Fe-S centrumok szintézisében, illetve az oxidatív stressz elleni védekezésben játszanak szerepet (Dwyer és mtsai., 2007). A baktericid antibiotikumok általi oxidatív stressz-indukciónak tehát fontos tényezője a sejt vas-homeosztázisának felbomlása (Dwyer és mtsai., 2007, 2014).

2.4.2. A vas-homeosztázis szabályozása és szerepe az oxidatív stressz kialakulásában *E. coli*-ban

A vas nélkülözhetetlen eleme az élő szervezeteknek, egyike az ősi anaerob környezetekben elsőként megjelent kofaktoroknak (Andrews és mtsai., 2003). Ugyanakkor kiemelt szereppel bír a sejten belüli oxidatív stressz kialakulásában is (Touati, 2000). A Fenton reakciónak (1) köszönhetően a magas intracelluláris vaskoncentráció hidroxilgyök képződését eredményezi, ami mutációk keletkezéséhez és/vagy letális oxidatív károsodáshoz vezet (Touati és mtsai., 1995).



Ennek megfelelően az intracelluláris szabad vaskoncentráció szabályozása kiemelt fontossággal bír normál állapotban és oxidatív stressz-körülmények között még inkább

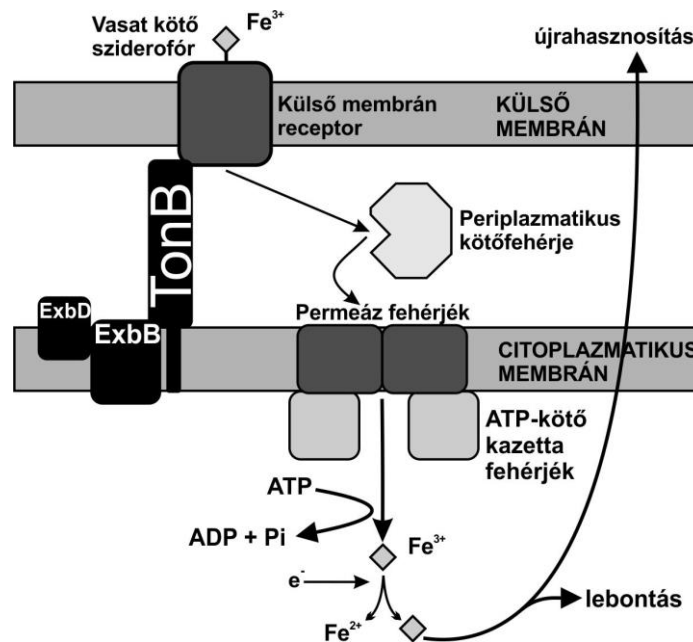
(Touati, 2000). Ezt támasztja alá az is, hogy oxidatív stressz esetén az OxyR és a SoxR stresszválasz fehérjék aktiválják a vasfelvételt gátló Fur szabályozó fehérje génjének expresszióját, megelőzve a magas intracelluláris szabad vasszint oxidatív stresszt fokozó hatásának kialakulását (Zheng és mtsai., 1999). Emellett az OxyR aktiválja a vasraktározó Dps fehérje génjének expresszióját is, ezáltal is hozzájárulva az intracelluláris szabad vastartalom csökkentéséhez (Zheng és mtsai., 2001).

Baktériumokban az intracelluláris vas-egyensúly alapvetően négy különböző stratégia összehangolt alkalmazásán keresztül valósul meg, melyek a következők: 1) a magas vaskötőképességű fehérjék (sziderofórok) által közvetített Fe^{3+} -felvétel szabályozása, 2) az intracelluláris vasraktározás szabályozása, 3) a vasfelhasználás szabályozása a vastartalmú fehérjék expressziójának regulációja révén, és 4) a vastöbblet reaktív oxigéngyökképző hatásai elleni védekezés. Az egyes stratégiák részvételi aránya a vas-homeosztázis megteremtésében a növekedési fázistól, a környezettől és fajtól függően változhat (Andrews és mtsai., 2003).

2.4.2.1. A vasfelvétel szabályozása

Aerob környezetben élő baktériumfajok esetében a vas felvétele elsősorban Fe^{3+} formában, a baktérium által szintetizált és szekretált magas vaskötőképességű fehérjékhez, ún. sziderofórokhoz (pl. enterobaktin, ferrikróm, aerobaktin) kötötten történik (Neilands, 1995). Anaerob környezetben vagy alacsony oxigénszint mellett viszont Fe^{2+} formában is történhet a vasfelvétel, *E. coli* esetén a feoAB gének által kódolt transzporteren keresztül (Ratledge és Dover, 2000). Gram-negatív baktériumok esetén a Fe^{3+} -sziderofór komplexek felvétele a külső membrán speciális, porinszerű receptorain keresztül történik. A periplazmatikus téren és a citoplazmatikus membránon való áthaladást követően a Fe^{3+} Fe^{2+} -á redukálódik a citoplazmában és leválik a szállító fehérjéjéről (Andrews és mtsai., 2003) (**4. ábra**). *E. coli* esetén a külső membránon keresztüli aktív transzporthoz szükséges energiát a citoplazmatikus membrán proton motoros ereje (proton-motive force) szolgáltatja a TonB energiaátalakító fehérje közvetítésével (Braun, 1995). A citoplazmatikus membránban helyet foglaló ExbB-ExbD-TonB fehérjekomplex periplazmába nyúló TonB fehérjéje kapcsolatot teremt a belső és külső membrán között, átalakítva a proton motoros erőt az aktív transzporthoz szükséges

energiává. *E. coli* esetén a TonB mutánsok nem képesek a Fe^{3+} -sziderofór komplexek és a B12 vitamin felvételére (Letain és Postle, 1997).



4. ábra. A sziderofór-közvetített vasfelvétel sematikus ábrája Gram-negatív baktériumok esetén ((Andrews és mtsai., 2003) nyomán).

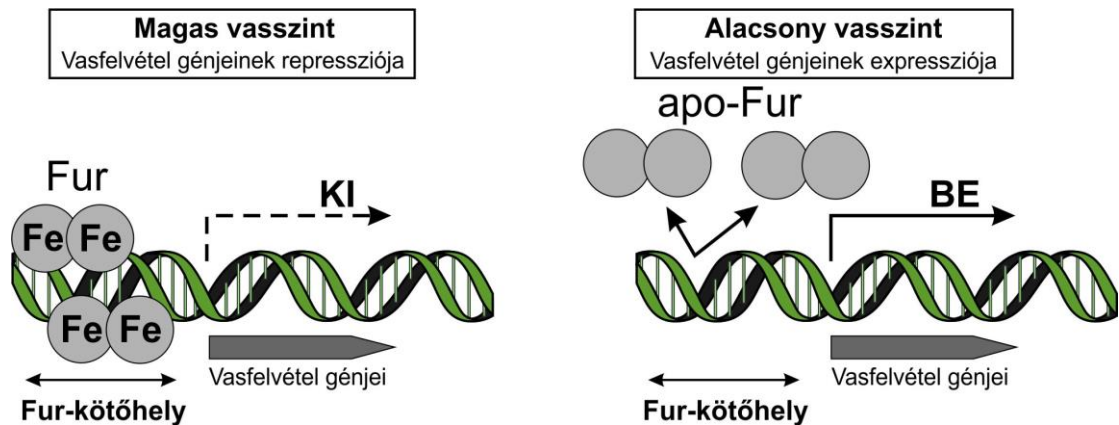
2.4.2.2. A vasraktározás szabályozása

A hatékony és megfelelően szabályozott vasfelvételen kívül a vasraktározásnak és az intracelluláris vasraktárak szükség esetén történő mozgósításának is kulcsfontosságú szerepe van a vas-homeosztázis megteremtésében. A baktériumok három típusba tartozó vasraktározó fehérjével rendelkeznek: a hem-mentes ferritinekkel (pl. FtnA), a hem-tartalmú bakterioferritinekkel (pl. Bfr) és a Dps fehérjékkel (pl. Dps). Közös jellemzőjük, hogy gömb alakú fehérjék, melyek egy központi üreggel rendelkeznek. A 24 monomerből felépülő ferritinek és bakterioferritinek ~ 2000 - 3000 vas-atomot, míg a 12 monomerből felépülő Dps fehérjék ~ 500 vas-atomot képesek tárolni. A tárolandó vasat redukált formában veszik fel, majd egy ferroxidációs lépést követően oxidált formában tárolják (Andrews, 1998; Andrews és mtsai., 2003). *E. coli*-ban az elsődleges vasraktározó fehérje az FtnA, ami a raktározott vas $\sim 50\%$ -áért felelős. A növekedés exponenciális fázisát követően, vasfüggő módon indukálódik, a Fur fehérje szabályozása alatt és biztosítja az intracelluláris vasellátást

vasszegény körülmények között (Abdul-Tehrani és mtsai., 1999; Nandal és mtsai., 2010). A DNS-kötésre képes Dps (DNA-binding proteins from starved cells) fehérjék a ferritinektől és bakterioferritinektől eltérően a tárolandó vas oxidációjára elsősorban H_2O_2 -t használnak O_2 helyett (Andrews, 1998). *E. coli* esetén az éhezés és oxidatív stressz hatására erősen expresszálódó Dps fehérje kettős úton védi a DNS-t az oxidatív károsodástól: egyrészt a DNS-hez való fizikai kapcsolódása révén, másrészt pedig a Fenton reakció során potenciálisan keletkező hidroxilgyök mennyiségének csökkentésével (Chiancone és Ceci, 2010; Zhao és mtsai., 2002).

2.4.2.3. A vas-homeosztázis fenntartása

E. coli-ban és számos más baktériumfajban is az intracelluláris vas-homeosztázis elsődleges szabályozó fehérjéje a Fur (Ferric Uptake Regulator) transzkripciós faktor, amely *E. coli*-ban több mint 90 gén expresszióját szabályozza a vas elérhetőségétől függő módon (Escolar és mtsai., 1999; Hantke, 1981; McHugh és mtsai., 2003). A Fur fehérje homodimer formában kötődik a represszált gén(ek) operátor régiójához, a leggyakrabban egy-egy Fe^{2+} iont kötve. A Fe^{2+} kofaktorként (korepresszorként) működik. Megkötése konformációváltozást idéz elő, ami közel 1000-szeresre növeli a Fur kapcsolódási affinitását az általa szabályozott gének promóterének „vas doboznak” (iron box) nevezett 19 bp hosszú palindróm szekvenciájához (Saito és mtsai., 1991). Megfelelő intracelluláris vastartalom mellett a Fur által szabályozott gének represszált, míg vashiány esetén aktivált állapotban vannak (Andrews és mtsai., 2003) (5. ábra). Elsődleges szerepkörét tekintve a Fur gátolja a vaskötést, azáltal, hogy gátolja a Fe^{3+} felvételében szerepet játszó magas vaskötőképességű fehérjék, ún. sziderofórok szintézisében és membránon keresztüli transzportjában szerepet játszó gének expresszióját. Emellett fokozza a vasraktározást, és végeredményként alacsonyan tartja az intracelluláris szabad vaskoncentrációt (Abdul-Tehrani és mtsai., 1999). Represszor funkciója mellett a Fur aktivátorként is működhet, ami három mechanizmus révén valósulhat meg: 1) indirekt módon, a RihB kis-RNS gátlásán keresztül (pl. a Fe SOD aktiválása), 2) fokozva az RNS polimeráz promóterhez való kapcsolódását (Teixidó és mtsai., 2011), 3) antirepresszorként működve (pl. az FtnA vasraktározó fehérje génjének szabályozása) (Nandal és mtsai., 2010).



5. ábra. A Fur-mediált vasfüggő génrepresszió sematikus bemutatása ((Andrews és mtsai., 2003) nyomán).

A Fur ugyanakkor szerepet játszik az oxidatív stressz elleni védelemben, azáltal, hogy közvetlen vagy közvetett úton szabályozza a szuperoxid lebontását végző szuperoxid diszmutázok működését (Troxell és Hassan, 2013), illetve *Staphylococcus aureus* esetén pozitívan szabályozza a H₂O₂-ot hatástalanító KatA kataláz expresszióját (Horsburgh és mtsai., 2001). Normál körülmények között, megfelelő vasellátottság mellett a Fur indirekt módon aktiválja a Fe SOD szuperoxid diszmutázt, azáltal, hogy gátolja az enzimet kódoló *sodB* gén mRNS-ét degradáló RihB kis RNS-t (Massé és Gottesman, 2002). Ezzel egyidőben represszálja a Mn SOD génjének expresszióját (Niederhoffer és mtsai., 1990). Vashiányos körülmények vagy oxidatív stressz esetén a Fur inaktívulódik, aminek eredményeként a Fe SOD inaktívul, míg a Mn SOD aktívul válik (Escolar és mtsai., 1999; Varghese és mtsai., 2007). A Δfur törzs részleges szuperoxid diszmutáz deficiens törzsként is viselkedik, mivel a Fe SOD nem aktiválódik, és a Mn SOD csökkent aktivitásul. Utóbbi abból adódik, hogy a magas intracelluláris vastartalom miatt a kofaktorként működő mangán verseng a vassal az enzimhez való kötődésért (Troxell és Hassan, 2013). Sokoldalú funkciói között a Fur szabályozza a citrát-kör néhány enzimének aktivitását is (Hantke, 1987) és szerepet játszik patogén baktériumok esetén a toxintermelésben és a virulenciában is (Horsburgh és mtsai., 2001; Mey és mtsai., 2005; Torres és mtsai., 2010).

2.4.3. Az oxidatív stressz sejtkárosító hatásai és az ellenük kialakult fontosabb védekezési mechanizmusok *E. coli*-ban

Az oxidatív stresszt okozó reaktív oxigéngyökök káros hatásai ellen az élő szervezeteknek különféle védekezési mechanizmusokat kellett kiépíteniük. Az érme másik oldalát nézve viszont, mutációk generálásán keresztül valószínűleg ugyanezek a reaktív oxigéngyökök járultak hozzá a földi élőlények bámulatos sokszínűségének kialakulásához (Sessions és mtsai., 2009; Touati, 2000).

Aerob környezetekben a legnagyobb fiziológiai jelentőséggel bíró káros reaktív oxigéngyökök a sejtekben a szuperoxid (O_2^-), a hidrogén peroxid (H_2O_2) és a hidroxil gyök (OH^\cdot). A reaktív oxigéngyökök káros hatásaival szemben a prokarióta és eukarióta sejtek egyaránt egy olyan enzimmészlettel „szerelkeztek fel”, melynek tagjai a védekezésben, a hatástalanításban vagy az oxidatív károsodások kijavításában játszanak szerepet. Az oxidatív stresszválasz központi szabályozó fehérjéi *E. coli*-ban a megemelkedett hidrogén peroxid koncentráció által aktivált OxyR (Tao és mtsai., 1991) és a szuperoxidot generáló redox-aktív vegyületek által aktivált SoxR (superoxide response) (Greenberg és mtsai., 1990). Transzkripció szabályozáson keresztül ez a két redox-érzékeny regulátor fehérje „vezényli le” a különböző antioxidáns védekezési mechanizmusokat (Farr és Kogoma, 1991). Már igen alacsony (~ 200 nM) intracelluláris H_2O_2 aktiválja az OxyR transzkripció faktort a fehérje aktív centrumában lévő egyik cisztein oxidálódásának eredményeként kialakuló diszulfid kötés konformációváltoztató hatása révén (Åslund és mtsai., 1999). Az önmagát negatívan szabályozó OxyR pozitívan szabályozza többek között a hidrogén peroxid lebontását végző KatG kataláz és Ahp hidroperoxid reduktáz génjeinek expresszióját (Tao és mtsai., 1991; Zheng és mtsai., 2001). A szuperoxid stresszválasz esetén a SoxR aktivációja a fehérje Fe-S centrumának oxidációja révén történik. Az aktivált SoxR tovább aktiválja a SoxS-t, ami indukálja a stresszválasz effektorait kódoló gének expresszióját (Nunoshiba és mtsai., 1992; Wu és Weiss, 1991). Ez a regulon többek között pozitívan szabályozza a szuperoxid lebontását végző Mn SOD enzimet, a vas homeosztázis központi regulátorát (Fur) és az oxidatív DNS károsodások kijavításában szerepet játszó IV-es endonukleázt (AP endonukleáz). Ugyanakkor a SoxRS regulon aktiválódása az OmpF porinfehérje translációjának negatív szabályozásán illetve a *marRAB* (multiple antibiotic resistance) és *acrAB* operonokba tartozó gének expressziójának pozitív szabályozásán keresztül multirezisztens fenotípust kölcsönöz a baktériumsejteknek (Pomposiello és mtsai., 2001).

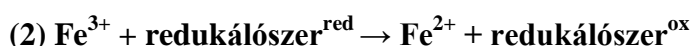
2.4.3.1. A szuperoxid sejtkárosító hatásai elleni védekezés

A szuperoxid egyik sejtkárosító hatása a Fe-S centrum tartalmú dehidratázok (pl. a citrátkör akonitáz B és fumaráz A, B enzimeinek) inaktiválásából adódik. A szuperoxid által oxidált Fe-S centrum instabillá válik, és a komplexből Fe^{2+} szabadul fel (Flint és mtsai., 1993; Imlay, 2006). A Fe-S centrum tartalmú enzimek inaktiválódása során történő Fe^{2+} -felszabadulásnak azonban citotoxikus következményei vannak, mivel a Fe^{2+} a Fenton reakcióban való részvételével hozzájárul az igen reaktív hidroxil gyök ($\text{HO}\cdot$) képződéséhez (Keyer és Imlay, 1996; Keyer és mtsai., 1995; Nunoshiba és mtsai., 1999).

E. coli-ban a szuperoxid hidrogén peroxidra való lebontásáért három féle szuperoxid diszmutáznak nevezett metalloenzim felelős: két citoplazmatikus enzim, a mangán kofaktoral működő, *sodA* által kódolt Mn SOD és a Fe^{2+} kofaktoral működő, *sodB* által kódolt Fe SOD, illetve egy periplazmatikus réz-cink kofaktorokkal működő Cu-Zn SOD (Imlay, 2013). A citoplazmatikus diszmutázok aktivitása a Fur fehérje szabályozása alatt áll és ezáltal intracelluláris vaskoncentráció-függő. A Mn SOD szintézisét ugyanakkor a SoxRS regulon is pozitívan szabályozza (Greenberg és mtsai., 1990). Bár a Mn SOD és Fe SOD enzimek hasonló rátával képesek hatástalanítani a szuperoxidot, elsődleges fiziológiai szerepeik *E. coli*-ban eltérőek: a Mn SOD hangsúlyosabb szerepet tölt be a DNS oxidatív stressz elleni védelmében, míg a Fe SOD a szuperoxid-érzékeny citoplazmatikus enzimek védelmében (Hopkin és mtsai., 1992). *E. coli* esetén a SOD nullmutáns (ΔsodAB) jelentősen megemelkedett O_2 -függő spontán mutációs rátával rendelkezik a vad típushoz viszonyítva és magas érzékenységet mutat a szuperoxid generáló redox-ciklizáló ágensekkel (pl. paraquat) szemben. A SOD mutánsban a megemelkedett mutagenitás függetlennek bizonyult a RecA fehérje aktivitásától és az SOS választól (Farr és mtsai., 1986; Touati, 2000).

2.4.3.2. A hidrogén-peroxid sejtkárosító hatásai elleni védekezés

A hidrogén peroxid citotoxikus hatása elsődlegesen abból fakad, hogy a Fenton reakcióban való részvételével hozzájárul a rendkívül reaktív hidroxil gyök képződéséhez. Ebből fakadóan ez a hatás közvetlenül függ az intracelluláris szabad vas (Fe^{2+}) koncentrációjától (Imlay és Linn, 1988), de ugyanakkor függ az oxidált vas újbóli redukálódását (2-es reakcióegyenlet) biztosító redukálószer (pl. redukált szabad flavinok, cisztein) elérhetőségétől is (Park és Imlay, 2003; Woodmansee és Imlay, 2002).



A szabad vas szerepét a hidrogén peroxid citotoxikus hatásában az is alátámasztja, hogy a peroxid stressz által indukált OxyR aktiválja a vasraktározó Dps fehérje expresszióját (Zhao és mtsai., 2002; Zheng és mtsai., 2001), ezáltal csökkentve a Fenton reakció számára elérhető szabad vas mennyiségét. A szuperoxidhoz hasonlóan a H_2O_2 is képes inaktiválni a Fe-S tartalmú dehidratázokat, de ez az inaktiváció csak rövid ideig tart (Jang és Imlay, 2007). Ugyanakkor, hosszabb ideig való kitettség esetén a H_2O_2 károsítja a Fe-S kockák összeszereléséért felelős Isc rendszer fehérjéit is, amelyet a sejt az Isc rendszer szerepét átvevő Suf fehérjék aktivációjával kompenzál (Jang és Imlay, 2010). A hidrogén peroxid és a szuperoxid egyaránt képes károsítani az ún. mononukleáris vas fehérjéket (pl. a Fur fehérjét is), amelyek prosztetikus csoportként egy vasatomot használó enzimek (Anjem és Imlay, 2012; Varghese és mtsai., 2007).

E. coli-ban három enzim játszik kiemelt szerepet a hidrogén peroxid hatástalanításában: az *ahpC* és *ahpF* gének által kódolt alkil hidroperoxid reduktáz (Ahp), a *katG* által kódolt G kataláz (KatG) és a *katE* által kódolt E kataláz (KatE) (Imlay, 2003). Mindhárom enzim hiánya esetén (Hpx⁻ törzs) az *E. coli* megfelelően képes nőni anaerob körülmények között, viszont aerob körülmények között szinte egyáltalán nem. Ez rávilágít a hidrogén peroxid citotoxikus hatására és a hatástalanításának a szükségességére már nagyon alacsony (μM alatti) intracelluláris koncentráció esetén is (Park és mtsai., 2005; Seaver és Imlay, 2001). *E. coli*-ban normális növekedési körülmények között az endogén hidrogén peroxid elsődleges hatástalanító enzime az Ahp, viszont ez a NADH-függő enzim már

alacsony hidrogén peroxid koncentráción (10^{-5} M) telítődik. Magasabb koncentráción a katalázok veszik át a hatástalanító funkciót (Seaver és Imlay, 2001).

2.4.3.3. A hidroxilgyök citotoxikus és mutagén hatásai

A hidroxilgyök a legreaktívabb oxigéngyök, amely a diffúziójával arányos rátával képes reakcióba lépni gyakorlatilag az összes biomolekulával (DNS-el, fehérjékkel, lipidekkel). Erős citotoxikus és mutagén hatással bír, annak köszönhetően, hogy mind a bázisokat, mind a dezoxiribózt képes károsítani a DNS-ben, különféle DNS léziókat okozva (Imlay, 2003). A hidroxilgyök által okozott DNS károsodások döntő többségét az oxidált bázisok jelentik, de vezethet abázikus helyek, DNS lánctörések, DNS-fehérje keresztkötések keletkezéséhez is (Cadet et al., 1999).

Alacsony redox-potenciálja miatt a nitrogén bázisok közül a guanin a legérzékenyebb a hidroxilgyök oxidatív hatásával szemben, aminek eredményeként 8-oxo-guanin képződik (Neeley és Essigmann, 2006). Ez utóbbi gyakran párosodik hibásan adeninnel, ami az oxidatív DNS károsodást fémjelző G:C → T:A, illetve A:T → C:G transzverziók számának megemelkedéséhez vezet (Cadet et al., 1999). Ezen mutációk keletkezésének megelőzése a MutM, MutY és MutT enzimek együttműködése révén valósul meg (Tajiri et al., 1995). A DNS láncban jelen lévő 8-oxo-guanin kijavítása a bázis excíziós javító rendszeren keresztül valósul meg, többek között a MutM és a MutY enzimek segítségével. A DNS glikoziláz aktivitású MutM eltávolítja a 8-oxo-guanint a DNS-ből, aminek eredményeként egy bázis nélküli (abázikus) hely keletkezik. Ez utóbbi az AP endonukleázok közbenjárásán keresztül kijavítódik és végeredményként a 8-oxo-guanin guaninra lesz kicserélve. Ha a 8-oxo-guanin nem távolítódik el, replikáció során a DNS polimeráz magas gyakorisággal adenint épít be hibásan vele szemben. A 8-oxo-guaninnal szemben hibásan beépült adenin eltávolításáért a MutY adenin glikoziláz felelős. A nukleotid raktárakban lévő dGTP oxidációjából keletkező 8-oxo-dGTP-t a MutD enzim dGMP-vé hidrolizálja, megakadályozva ezáltal az oxidált nukleotidok DNS-be való beépülését. Mindhárom enzimnek a hiánya külön-külön is mutátor fenotípust eredményez (Miller, 1996). A guanin oxidációján kívül az adenin oxidációjából származó 2-oxo-adenin mutagén hatása is igen jelentős. Guaninnal való hibás párosodása eredményeként ugyancsak G:C → T:A transzverziók jönnek létre (Nunoshiba et al., 2002).

2.4.4. Az oxidatív stressz kétélű fegyver jellege: letalitás vs mutagenézis

Az intracelluláris oxidatív stressz fokozódása baktericid antibiotikumokkal való kezelés vagy más tényezők hatására két fő, a baktérium sorsa szempontjából ellentétes hatású következménnyel járhat.

Az egyik kézenfekvő hatás az oxidatív károsodásokból adódó sejtölő hatás (Hassett és Imlay, 2007; Imlay, 2003). A másik hatás a mutáció generáló hatás, amely közvetlen vagy közvetett módon valósulhat meg. A mutációk származhatnak a reaktív oxigéngyökök közvetlen interakciójából a DNS-el vagy a nukleotid raktárakban lévő nukleotidokkal (Foti és mtsai., 2012; Kohanski és mtsai., 2010b), vagy pedig közvetett úton, elsősorban az SOS válasz hibázásra hajlamos DNS polimerázainak mutáció-generáló aktivitásának eredményeként (Cirz és mtsai., 2005).

A reaktív oxigéngyökök mutagenézisben betöltött kulcsfontosságú szerepét igazolja a DNS oxidatív károsodásainak megelőzéséért, illetve kijavításáért felelős MutT, MutM illetve MutY enzimek hiányának mutációs rátanövelő hatása (Miller, 1996; Tajiri és mtsai., 1995). Ugyancsak a reaktív oxigéngyökök mutagenézisért felelős szerepét támasztja alá a hatástalanításukban szerepet játszó enzimek (G kataláz és Mn SOD szuperoxid diszmutáz) megemelkedett aktivitása egy hosszú távú evolúciós kísérletből származó, csökkent mutációs rátával rendelkező MutS deficiens *E. coli* vonalak esetén (Turrientes és mtsai., 2013).

2.4.4.1 A vas által közvetített oxidatív mutagenézis

Mivel a Fenton reakción keresztül a magas intracelluláris vaskoncentráció oxidatív stresszt eredményez, annak egyik következményeként szerepet játszik a mutációk megjelenésében is (Touati, 2000). A vas-egyensúly felbomlásának spontán mutációs ráta növelő hatása figyelhető meg a Fur deficiens *E. coli* törzs esetén. A vas-homeosztázist szabályozó Fur fehérje hiányában az intracelluláris vas koncentrációja megnő, abból adódóan, hogy a vasfelvételben szerepet játszó gének folyamatosan aktivált állapotban vannak (Escolar és mtsai., 1999; Touati és mtsai., 1995). Ugyanakkor, mivel az FtnA vasraktározó fehérje nem indukálódik, kevesebb vas raktározódik, mint a vad típusban (Abdul-Tehrani és mtsai., 1999). Kimutatták, hogy a Fur mutáns törzset megemelkedett spontán mutációs ráta jellemzi (Touati,

2000; Touati és mtsai., 1995). A szuperoxid hatástalanításában is deficiens $\Delta fur\Delta sodAB$ hármas mutánsban 2.4-szer magasabb intracelluláris szabad vaskoncentrációt, megemelkedett hidroxilgyök-szintet és 2 nagyságrendnyi mutációs rátaemelkedést detektáltak a vad típushoz viszonyítva. A mutációk döntő többségét az oxidatív károsodást fémjelző G:C \rightarrow T:A és A:T \rightarrow C:G transzverziók tették ki (Nunoshiba és mtsai., 1992).

2.4.4.2. A vas-közvetített oxidatív mutagenézis és az antibiotikum rezisztencia kapcsolata

Annak ismeretében, hogy a baktericid antibiotikumok általi oxidatív stressz-indukciónak fontos tényezője a sejt vas-homeosztázisának felbomlása (Dwyer és mtsai., 2014), valamint a vas-homeosztázis felbomlása a spontán mutációs ráta emelkedését váltja ki (Nunoshiba és mtsai., 1999; Touati és mtsai., 1995), felvetődik a potenciális kapcsolat a vas-közvetített oxidatív mutagenézis és az antibiotikum rezisztencia kialakulása között. Feltehető a kérdés, hogy a baktericid antibiotikumok által kiváltott oxidatív stressz ölü vagy mutagén hatása a dominánsabb a kezelés során.

A baktericid antibiotikumok által indukált oxidatív stressz baktériumölő hatását számos publikáció kérdőjelezte meg a közelmúltban (Keren és mtsai., 2013; Liu és Imlay, 2013; Molina-Santiago és Ramos, 2014; Paulander és mtsai., 2014), és jelenleg is vita tárgyát képezi (Dwyer és mtsai., 2014). Kimutatták ugyanakkor, hogy a szubletális koncentrációjú baktericid antibiotikumok által indukált reaktív oxigéngyök-termelés mutációk megjelenéséhez, és annak következményeként multirezisztens fenotípus megjelenéséhez vezet (Kohanski és mtsai., 2010b). Az oxidatív mutagenézis antibiotikum rezisztencia kialakulásában betöltött szerepére világít rá az a vizsgálati eredmény is, mely szerint antibiotikum rezisztens *E. coli* és *Mycobacterium tuberculosis* vonalak esetén az oxidatív károsodást jelző GC – TA transzverzió és a GC –AT tranzíció arányának értéke jelentősen megnőtt az alapállapothoz képest (Wang és mtsai., 2012). Cisztás fibrózisban szenvedő betegekből izolált, hipermutátor antibiotikum rezisztens *Pseudomonas aeruginosa* vonalak között azonosítottak olyanokat, amelyek funkcióvesztéses mutációkat hordoztak az oxidatív DNS károsodások javításáért, illetve megelőzéséért felelős MutY, illetve MutT enzimek génjeiben. A megemelkedett reaktív oxigéngyökszintnek való kitettség a cisztás fibrózisos betegek tüdejében a javító enzimek deficiens működésével együtt az oxidatív mutagenézis

fokozásán keresztül elősegíti az antibiotikumokkal szembeni rezisztencia kialakulását (Mandsberg et al., 2009).

3. Célkitűzések

Munkánk tágabb értelemben vett célja olyan bakteriális mechanizmusoknak az azonosítása volt, amelyekbe beavatkozva lelassítható a baktériumok antibiotikumokhoz való adaptációs képessége, és ez által jelentősen csökkenthető a rezisztencia kialakulásának esélye. Vizsgálataink során a klinikumban széles körben alkalmazott ciprofloxacinnal szembeni rezisztencia kialakulásának hátterében álló mechanizmusok feltárására összpontosítottunk toxikus antibiotikum-dózis alkalmazása mellett. A géninaktiváció hatásának vizsgálatával, célunk azoknak a nem esszenciális géneknek az azonosítása volt, amelyek hiánya elősegíti a ciprofloxacinnal szembeni rezisztencia kialakulását. Annak ismeretében, hogy a baktericid antibiotikumok oxidatív stresszt indukálnak, és utóbbinak fontos szerepe van a mutagenézis folyamatában, megvizsgáltuk, hogy a megemelkedett oxidatív stressz-szint milyen hatással van a ciprofloxacinnal szembeni rezisztencia evolúciójára. Vizsgálataink során az alapvető módszertant az *E. coli* modellorganizmussal végzett rövid távú laboratóriumi evolúciós kísérletek jelentették.

A következő kérdésekre kerestük a választ:

1. Vannak-e olyan nem esszenciális *Escherichia coli* gének, amelyek hiánya elősegíti az antibiotikum rezisztencia kialakulását toxikus antibiotikum-dózis alkalmazása esetén?
2. Milyen szerepet játszik a vasháztartás az antibiotikum rezisztencia kialakulásában?
3. Hogyan befolyásolja az antibiotikumok által kiváltott megemelkedett oxidatív stressz-szint az antibiotikumokkal szembeni rezisztencia evolúcióját?
4. Hogyan befolyásolják az oxigénmentes (anaerob) körülmények az *E. coli* antibiotikumokhoz való adaptációs képességét?

4. Anyagok és módszerek

4.1. Felhasznált baktériumtörzsek, plazmidok és oligonukleotid primerek

A kísérletekhez vad típusként az *Esherichia coli* BW25113 törzset (Baba és mtsai., 2006) használtuk, amely az Eredmények fejezet ábráin wt (wild type) jelöléssel szerepel. A kísérleteket, ha másként nincs jelezve, 37 °C-on, Luria Bertani (LB) (0.5% NaCl, 0.5% élesztőkivonat, 1% tripton) gazdag táptalajban végeztük. A felhasznált baktériumtörzsek és plazmidok egy része a jelen munka során készült el, másik része pedig három kollekciónól származik: 1) KEIO egyszeres géndeléciós kollekció (Baba és mtsai., 2006), 2) ASKA fehérje túltermelő kollekció (Kitagawa és mtsai., 2006) és 3) fluoreszcens promoter kollekció (Zaslaver és mtsai., 2006). A genom szintű kereséshez a teljes KEIO kollekción (3985 törzs, 2 replikátumban) felhasználtuk, melynek törzsei a kiütött gén helyén egy kanamicin rezisztencia kazettát hordoznak szelekciós markerként.

Többszörös géndeléciókat tartalmazó törzseket P1 fág-transzdukciós eljárással (Green és Sambrook, 2012) hoztunk létre a KEIO kollekció törzseit felhasználva. Az általunk előállított törzsekből a kanamicin rezisztencia kazetta eltávolítását az FLP rekombinázt hordozó pFT-A hőérzékeny segédplazmidot alkalmazó módszerrel végeztük Pósfai és mtsai., 1997 leírása szerint, melynek eredményeként marker- és „hegmentes” deléciókat kaptunk. A $\Delta mutS$ törzset újonnan is előállítottuk RecA-függő, „öngyilkos” plazmidon alapuló módszerrel (Fehér és mtsai., 2008; Pósfai és mtsai., 1999). A géndeléciókat és a kanamicin rezisztencia kazetta kiejtését PCR-el, a megfelelő oligonukleotid primereket használva minden esetben ellenőriztük.

A Bfr, FtnA és MutS fehérjék túltermeltetéséhez a megfelelő kódoló régiókat a pZE31 magas kópiaszámú plazmidba klónoztuk. Ehhez az ASKA kollekció megfelelő plazmidjairól a nyílt leolvasási kereteket (ORF, Open Reading Frame) PCR-el felsokszorosítottuk és átklónoztuk őket a kloramfenikol rezisztencia markert hordozó pZE31 plazmidba (Lutz és Bujard, 1997). A klónozást megelőzően az ORF-ek N-terminális végéhez csatolt hisztidin jelölést eltávolítottuk és a natív ATG start kodont rekonstruáltuk. A klónozáshoz használt oligonukleotid primereket úgy terveztük meg, hogy az 5' végükön a HindIII restriktív enzim felismerőhelyét hordozzák, ami lehetővé tette a klónozást. A fehérje túltermelő plazmidokat

elektroporációval vittük be a Δfur törzsbe. Mivel egyik törzsben sem termelődik a TetR represszor fehérje, a klónozott gének expressziója konstitutívan, a plazmid kópiaszámának megfelelő mértékben történik. Ez ~ 40-szeres expressziót eredményez (Lutz és Bujard, 1997).

A GyrA fehérje 83. pozíciójában lévő szerin leucinra való cserélődését biztosító pontmutáció bevitele a *gyrA* génbe a vad típusú törzs esetén egyszálú oligonukleotid-közvetített rekombinációs módszerrel történt (Ellis és mtsai., 2001).

A plazmidok és PCR termékek izolálása kereskedelmi forgalomban kapható reagensekkel (Sigma-Aldrich, Analytic Jena) történt, a gyártó leírásait követve. A munka során a következő antibiotikumokat használtuk: ciprofloxacín (CPR), kanamicin (Kn), kloramfenikol (Cm), Sztreptomycin (Str). A vaskelátorok hatásának vizsgálatához fenantrolint (1,10-fenantrolin monohidrát) használtunk. A felhasznált antibiotikumok és vegyszerek a Sigma-Aldrich vagy BD (Becton, Dickinson and Company) gyártóktól származtak. A munka során felhasznált és a KEIO kollekciónak részét nem képező baktériumtörzsek és különböző plazmidok az **2. táblázat**ban vannak összefoglalva. A felhasznált oligonukleotid primerek listáját az **3. táblázat** tartalmazza.

Törzs	Genotípus vagy jellemző tulajdonságok	Forrás
BW25113	<i>rrnB3</i> $\Delta lacZ4787$ <i>hsdR514</i> $\Delta(araBAD)567$ $\Delta(rhaBAD)568$ <i>rph-1</i>	(Baba és mtsai., 2006)
CC101-106	F <i>lacI</i> <i>Z proB</i> ⁺ episzómát hordozó P90C [<i>ara</i> Δ (<i>lac proB</i>) _{XIII}] variánsok	(Cupples és Miller, 1989)
wt-S83L	BW25113, <i>gyrA</i> génben S83L pontmutáció	jelen munka
Δfur	BW25113, Δfur (eltávolított kanamicin kazetta)	(Baba és mtsai., 2006), jelen munka
$\Delta tonB$	BW25113, $\Delta tonB$, Kan ^R	(Baba és mtsai., 2006)
$\Delta fur\Delta tonB$	$\Delta fur \Delta tonB$	jelen munka
$\Delta fur\Delta dinB$	$\Delta fur, \Delta dinB$	jelen munka
$\Delta fur\Delta dinB\Delta umuDC$	$\Delta fur\Delta dinB, \Delta umuD, \Delta umuC$	jelen munka
$\Delta sodAB$	BW25113, $\Delta sodA, \Delta sodB$	(Baba és mtsai., 2006); jelen munka
$\Delta sodAB\Delta tonB$	$\Delta sodAB, \Delta tonB$	jelen munka
$\Delta mutS$	BW25113, $\Delta mutS$	jelen munka

Plazmid

pZE31	ColE1, P _{tetO-1} , Cm ^R	(Lutz és Bujard, 1997); jelen munka
pZE31_ <i>bfr</i>	<i>bfr</i> ORF-jét hordozó pZE31	jelen munka
pZE31_ <i>ftnA</i>	<i>ftnA</i> ORF-jét hordozó pZE31	jelen munka
pZE31_ <i>mutS</i>	<i>mutS</i> ORF-jét hordozó pZE31	jelen munka
pUA66	sc101 Ori, Kan ^R	(Zaslaver és mtsai., 2006)
pUA66_ <i>ahpC</i>	<i>ahpC</i> promóterét hordozó pUA66	(Zaslaver és mtsai., 2006)
pUA66_ <i>katG</i>	<i>katG</i> promóterét hordozó pUA66	(Zaslaver és mtsai., 2006)
pUA66_ <i>oxyR</i>	<i>oxyR</i> promóterét hordozó pUA66	(Zaslaver és mtsai., 2006)
pUA66_ <i>soxS</i>	<i>soxS</i> promóterét hordozó pUA66	(Zaslaver és mtsai., 2006)
pCA24N	P _{TS-lac} , Cm ^R	(Kitagawa és mtsai., 2006)
pCA24N_ <i>fur</i>	<i>fur</i> ORF-jét hordozó pCA24N	(Kitagawa és mtsai., 2006)
pCA24N_ <i>miaA</i>	<i>miaA</i> ORF-jét hordozó pCA24N	(Kitagawa és mtsai., 2006)
pCA24N_ <i>mutH</i>	<i>mutH</i> ORF-jét hordozó pCA24N	(Kitagawa és mtsai., 2006)
pCA24N_ <i>mutL</i>	<i>mutL</i> ORF-jét hordozó pCA24N	(Kitagawa és mtsai., 2006)
pCA24N_ <i>mutS</i>	<i>mutS</i> ORF-jét hordozó pCA24N	(Kitagawa és mtsai., 2006)
pCA24N_ <i>ybgJ</i>	<i>ybgJ</i> ORF-jét hordozó pCA24N	(Kitagawa és mtsai., 2006)

2. táblázat. A munka során felhasznált törzsek és plazmidok listája.

Primer neve	Szekvencia	Felhasználása
Ellenőrző primerek		
mutS_F	5' GCCTCCACCTCATTAAGA 3'	KEIO törzsek ellenőrzése
mutS_R	5' TCCGGTCCACGATCAATA 3'	KEIO törzsek ellenőrzése
mutL_F	5' GCCTGCGCAATTACTTCTT 3'	KEIO törzsek ellenőrzése
mutL_R	5' GAGTAACTCTTCAGCGTTCG 3'	KEIO törzsek ellenőrzése
mutH_F	5' GTCGACGTC AAGGCTGTAA 3'	KEIO törzsek ellenőrzése
mutH_R	5' TCTCCAGCAGCGTCAGCGTA 3'	KEIO törzsek ellenőrzése
miaA_F	5' GCGGACGTGGAACGGTTATG 3'	KEIO törzsek ellenőrzése
miaA_R	5' TGC GTTCAGGAACGGATCTT 3'	KEIO törzsek ellenőrzése
fur_Fw	5' TATCAGCAGTGTCTGCGTG 3'	KEIO törzsek ellenőrzése
fur_R	5' GGTGTTCAAGTGGCTTGC 3'	KEIO törzsek ellenőrzése
ybgJ_F	5' AGGTACCATGCCACTGAA 3'	KEIO törzsek ellenőrzése

ybgJ_R	5' TGACCGAGCGTGATCTCCA 3'	KEIO törzsek ellenőrzése
gyrA_QRDR_F	5' CGGTCAACATTGAGGAAGAG 3'	mutációk azonosítása
gyrA_QRDR_R	5' TGCGTCAACTTCCAATTCT 3'	mutációk azonosítása
parC_QRDR_F	5' ATGTACGTGATCATGGACCG 3'	mutációk azonosítása
parC_QRDR_R	5' CTGAGCCACTTCACGCAGG 3'	mutációk azonosítása
marR_F	5' TGAAAAGTACCAGCGATCTGT 3'	mutációk azonosítása
marR_R	5' TTACGGCAGGACTTTCTTAAG 3'	mutációk azonosítása
sodA_F	5' TTAACAATCGGCCGCCGAC 3'	deléció ellenőrzése
sodA_R	5' ACAGTGCGCCAAGGAATAGC 3'	deléció ellenőrzése
sodB_F	5' TAAGGCTATTGTACGTATGC 3'	deléció ellenőrzése
sodB_R	5' CAGGTCTGTCTTCATCAGTC 3'	deléció ellenőrzése
tonB_F	5' TCACTGATCCTGATCGTC 3'	deléció ellenőrzése
tonB_R	5' GTATGTCGCGTTGATCC 3'	deléció ellenőrzése
dinB_F	5' GTGTTGACTCGCTCGAT 3'	deléció ellenőrzése
dinB_R	5' GAGTCGTCGTAGAGTGCAT 3'	deléció ellenőrzése
umuDC_F	5' AATGCTCCATCTGCGGTT 3'	deléció ellenőrzése
umuDC_R	5' GCTCTATCCTTCGCCGTT 3'	deléció ellenőrzése
KEIO_Km_P1	5' ATCCGGGGATCCGTCGACC 3'	deléció ellenőrzése
KEIO_Km_P2	5' TGTAGGCTGGAGTGCTTCG 3'	deléció ellenőrzése

Szekvenáló primerek

ASKAs_1	5' CTTCCCAACAGTTGCCTAAG 3'	szekvenálás
ASKAs_2	5' ATTAAGCTTGCTGCAGGTC 3'	szekvenálás, klónozás
TetRSeq1	5' CGCCAGATATCGACGTCTAA 3'	szekvenálás
TetRSeq2	5' AGCTCGCTTGGACTCCTGTT 3'	szekvenálás
gyrA_QRDR_F	5' CGGTCAACATTGAGGAAGAG 3'	szekvenálás
parC_QRDR_F	5' ATGTACGTGATCATGGACCG 3'	szekvenálás
marR_F	5' TGAAAAGTACCAGCGATCTGT 3'	szekvenálás

Klónozó primerek

bfr_ATG_HindIII	5' GGAAGCTTATG-AAAGGTGATACTAAAGTTAT 3'	pZE31 plazmidba való klónozás
ftnA_ATG_HindIII	5' GGAAGCTTATG-CTGAAACCAGAAATGATTGA 3'	pZE31 plazmidba való klónozás
mutS_ATG_HindIII	5' GGAAGCTTATG-AGTGCAATAGAAAATTCGAC 3'	pZE31 plazmidba való klónozás

3. táblázat. A munka során felhasznált oligonukleotid primerek listája.

4.2. Elektrokompétens sejtek készítése és transzformáció

Az egy kolóniából indított, éjszakán át növesztett starter kultúrából 1 ml-t oltottunk át 100 ml LB tápoldatba, amely antibiotikum rezisztencia markert hordozó törzsek esetén ki volt egészítve a megfelelő koncentrációjú antibiotikummal. A kultúrát 0.4-0.6 OD-ig növesztettük, majd jégre helyezve lehűtöttük. Ezt követően a sejteket centrifugálással ülepitettük (10 perc, 4°C, 4250 rpm), majd felszuszpendáltuk őket 50 ml jéghideg, ultratiszta Milli-Q vízben. Újabb centrifugálást követően a sejteket 25 ml jéghideg, ultratiszta Milli-Q vízben vettük fel. A harmadik centrifugálást követően a sejteket 5 ml jéghideg 20%-os glicerinben vettük fel, majd centrifugálással ülepitettük őket. A glicerin óvatos eltávolítása után a sejteket felszuszpendáltuk 200 µl jéghideg 20%-os glicerinben és 40 µl-enként szétosztottuk őket Eppendorf csövekbe. Az így elkészített elektrokompétens sejteket azonnal vagy pedig -80 °C-on való tárolást követően használtuk fel elektroporálásra.

A különböző plazmidok kompetens sejtekbe való transzformálása elektropólással történt, BTX Electro Cell Manipulator 630 készülékkel. 40 µl elektrokompétens sejthez 1-1.5 µl kittel izolált plazmid preparátumot pipettáztunk, majd 1 mm-es küvettákban elektrosokkoltuk őket 1800 V maximális feszültség és 200 Ω maximális ellenállás mellett. Ezt követően 1 ml LB-ben szuszpendáltuk fel a sejteket és rázatás mellett, 1 órán keresztül inkubáltuk őket a megfelelő hőmérsékleten. Az inkubálást követően megfelelő higításban vagy higítás nélkül 50-100 µl-t szélesztettünk ki belőlük antibiotikummal kiegészített LB agar lemezekre.

4.3. Antibiotikumok minimális gátló koncentrációjának meghatározása

A különböző antibiotikumok minimális gátló koncentrációjának (MIC (Minimal Inhibitory Concentration) értékének) meghatározása a vad típusú törzs és különböző mutáns törzsek esetében kétféle módszerrel történt: hagyományos mikrohigításos módszerrel (Wiegand és mtsai., 2008b), 96-lyukú lemezekben, 1.4-szeres higítási lépésekkel és/vagy agar-diffúziós módszerrel, Epszilométer teszt (E-teszt) (Biomérieux) segítségével (Marley és mtsai., 1995). Az antibiotikum MIC értékének leolvasása mindkét esetben 24 óra inkubálást követően

történt. Adott törzs MIC értékének azt a legkisebb antibiotikum-koncentrációt határoztuk meg, amely mellett, 24 óra inkubálást követően a törzs növekedése teljesen gátolt volt.

4.4. Antibiotikumokkal szemben *de novo* módon kialakuló rezisztencia mérése

A ciprofloxacinnal vagy más antibiotikummal szemben újonnan (*de novo*) kialakuló rezisztencia mérésére kidolgoztunk egy rövid távú (5 napos) laboratóriumi evolúciós kísérleti eljárást. A kísérlet során a baktérium populációkat jóval az MIC érték fölötti, gátló koncentrációjú antibiotikum hatásának tesszük ki 5 napon keresztül. A toxikus antibiotikum koncentráció alkalmazása magas szelektív nyomást jelent a populációk számára, aminek kétféle következménye lehet: adaptáció vagy kihalás. A vizsgált törzseket 24 órán át előneveltük, majd a felnőtt kultúrákból $\sim 10^8$ sejtet vittünk át a megfelelő antibiotikumot tartalmazó, 350 μ l végtérfogató friss LB tápoldatba. Genotípusonként jellemzően 96 független, párhuzamos populációt evolválattunk 96-os mély-lyukú lemezekben, melyeket a megfelelő szellőzést biztosító tetőkkel (Enzyscreen) fedtünk le. A lemezeket 5 napig inkubáltuk rázó inkubátorban (280-320 rpm). Az 5 napos inkubálást követően a 350 μ l kultúrából 2 μ l-nyit oltottunk ki Duetz átoltót (replikátort) használva kétféle LB agar lemezre: antibiotikum nélküli (nem szelektív) illetve a kísérlet során alkalmazott koncentrációjú antibiotikummal kiegészített lemezre. Az antibiotikumot tartalmazó lemezeken felnőtt baktérium telepek megszámlálásával meghatároztuk az 5 napos időintervallum során megjelent rezisztens populációk számát, míg a nem szelektív lemezeken felnőtt baktérium telepek megszámlálásával a túlélő populációk számát.

Az anaerob körülmények között végzett evolúciós kísérleteket palládium katalizátorral ellátott Bactron X anaerob fülkében végeztük (95% N₂/5% H₂). Ebben az esetben a kultúrák rázatására nem volt lehetőség. Az anaerob körülményekből adódó lassúbb növekedési ráta miatt a starter populációk inkubálási idejét 3 napra, míg az 5 napos inkubálási időintervallumot 11 napra növeltük. A rezisztens, illetve túlélő populációk detektálása az aerob kísérletekhez hasonlóan történt. Az 5 napos kísérletek során jellemzően 96-192 párhuzamos kultúrát alkalmaztunk genotípusonként.

4.5. Genom szintű keresés a gén-inaktiváció szerepének vizsgálatára a ciprofloxacinall szembeni rezisztencia kialakulásában

A KEIO kollekció közel 4000 egyszeres gén-deléciós törzsének felhasználásával egy genom szintű keresést végeztünk, melynek célja olyan nem esszenciális gének azonosítása volt, amelyek hiánya elősegíti a letális koncentrációjú ciprofloxacinhoz való alkalmazkodást. A genom léptékű keresés alapvető módszertanát az öt napos laboratóriumi evolúciós kísérlet jelentette. A kísérlet során alkalmazott ciprofloxacin koncentráció 200 ng/ml volt, ami a vad típusú törzs MIC értékének 12.5-szörösét jelenti. A genom szintű keresés két szűrési lépésben valósult meg. Az első szűrési lépés a kollekció összes törzsével történt, két független kultúrával törzsenként. A második szűrési lépés az első szűrési lépés pozitív taláataival (legalább egy rezisztens populáció/törzs) történt, 96 replikátummal törzsenként.

A végső pozitív találatoknak számító törzsek esetében PCR segítségével ellenőriztük, hogy valóban a megfelelő géndeléciót hordozzák-e. Azt, hogy valóban az adott géndeléció okozza a rezisztens populációk gyakoriságának megemelkedését komplementációval ellenőriztük, az ASKA kollekció törzseit felhasználva. A megfelelő gének nyitott leolvasási kereteit (ORF, open reading frame) hordozó plazmidokat izoláltuk a kollekció törzseiből és elektroporációval vittük be a komplementálni kívánt egyszeres deléciós törzsekbe. A plazmidon bevitt gének expressziójának indukálása 0.1 mM IPTG hozzáadásával történt.

4.6. Túlélés-vizsgálatok antibiotikum jelenlétében

A túlélés-vizsgálatok keretében meghatároztuk az 5 napos evolúciós kísérletek során alkalmazott antibiotikum dózisokra jellemző túlélési görbéket különböző genotípusú törzsek esetében. A kísérlet során nyomon követtük a vizsgált törzsek antibiotikum jelenlétében történő populációméret-csökkenését. Az 5 napos evolúciós kísérlethez hasonlóan, 96-os mélylyukú lemezekben, 350 μ l végtérfogatban, $\sim 10^8$ sejtől kiindulva végeztük a kísérletet. Különböző időpontokban - t0 (közvetlenül az antibiotikum hozzáadása után), t1, t3 és t6 (1, 3 illetve 6 órával az antibiotikum kezelést követően) - 6-12 párhuzamos populációból törzsenként mintát vettünk és ebből 4 féle hígítást vittünk fel 24-lyukú LB-agar lemezekre. A különböző időpontokra jellemző populációméretet a 24 óra után megjelenő telepek száma és

az alkalmazott hígítás segítségével becsültük meg és cfu/ml-re (cfu = colony forming unit) számoltuk ki. A kísérlet során ellenőriztük, hogy megjelentek-e rezisztens kolóniák, azáltal, hogy mindegyik vizsgált időpontban kioltottunk a megfelelő dózisu antibiotikummal kiegészített LB agar lemezekre. A populációméret csökkenését a kiindulási (t_0) időpontra normalizálva ábrázoltuk.

4.7. Mutációs ráta vizsgálatok

4.7.1. Rifampicines mutációs ráta mérés

A különböző törzsekre jellemző mutációs ráta meghatározása a rifampicin rezisztens sejtek megjelenési gyakorisága alapján, Luria–Delbrück féle fluktuációs teszt segítségével történt. A rifampicinnel szembeni rezisztenciát leggyakrabban az RNS polimeráz béta alegységét kódoló rpoB génben bekövetkező pontmutációk okozzák (Jin és Gross, 1988). A mérések során, az éjszakán át növesztett kultúrákból $\sim 10^4$ sejtet oltottunk át 1 ml friss LB tápoldatba. Átlagosan törzsenként 8-10 párhuzamos populációt indítottunk és 24 órán keresztül inkubáltuk őket a megfelelő hőmérsékleten. Az összsejtszámot a sejt kultúrák megfelelő hígításainak nem szelektív, LB agar lemezekre való szélesztésével határoztuk meg. A rifampicin rezisztens telepszámok meghatározása 50-100 μ l sejt kultúra 100 μ g/ml rifampicin tartalmú LB agar lemezre való szélesztésével történt. A felnőtt rifampicin rezisztens telepeket 24 illetve 48 óra inkubálást követően számoltuk meg. A rifampicin rezisztens telepszámok és az összsejtszám ismeretében a különböző törzsekre jellemző mutációs rátát a Ma-Sandri-Sarkar Maximum Likelihood Estimator (MSS-MLE) módszerrel, a FALCOR (Fluctuation AnaLysis CalculatOR) internetes program segítségével határoztuk meg (Hall és mtsai., 2009).

4.7.2. Lac reverziós mutációs ráta mérés

A különböző törzsekre jellemző mutációs ráta meghatározása a Lac⁺ sejtek megjelenési gyakorisága alapján, Luria–Delbrück féle fluktuációs teszt segítségével történt. A mutációs rátaméréshez hat olyan *E. coli* Lac⁻ törzset (CC101-106) használtunk, amelyek a béta-

galaktozidázt kódoló *lacZ* génben különböző pontmutációt hordoznak, és ezáltal nem képesek a laktóz szénforrásként való hasznosítására. A pontmutációk a béta-galaktozidáz aktív centrumában lévő glutaminsavat kódoló kodonban találhatóak (Cupples és Miller, 1989). A Lac^- sejtek akkor revertálnak ha a glutaminsav kodonja valamelyik bázis-szubsztitúció hatására helyreállítódik. A hatféle indikátor törzs a hatféle bázis-szubsztitúció egyikével képes revertálni (Lac^+ -á válni). Ezáltal, a megjelenő Lac^+ sejtek detektálásával lehetővé válik egy adott törzsre specifikus tranzíciók és transzverziók előfordulási gyakoriságának meghatározása. A mutációs rátamérést 96-os mély-lyukú lemezekben, törzsenként 16 párhuzamos tenyésztéssel végeztük és 24 órán keresztül inkubáltuk a lemezeket. Az összsejtszámot a sejt kultúrák megfelelő hígításainak nem szelektív, LB agar lemezekre való szélesztésével, míg a Lac^+ telepek számát 300 μ l sejt kultúra MacConkey agar lemezre való szélesztésével határoztuk meg. A MacConkey agar laktózt és pH indikátorként neutrálvörös festéket tartalmaz. A laktóz fermentálására képes Lac^+ kolóniák esetében a fermentáció során egy savas végtermék képződik, aminek hatására a neutrálvörös rózsaszínűre színeződik. A Lac^+ kolóniák tehát rózsaszínűek lesznek, míg a Lac^- kolóniák színe nem változik meg, ami lehetővé teszi elkülönítésüket. A felnőtt telepeket 24 illetve 48 óra után számoltuk meg. A Lac^+ telepszámok és az összsejtszám ismeretében a különböző törzsekre jellemző mutációs rátát a Ma-Sandri-Sarkar Maximum Likelihood Estimator (MSS-MLE) módszerrel, a FALCOR (Fluctuation AnaLysis CalculatOR) internetes program segítségével határoztuk meg.

4.8. Fluoreszcencia alapú génexpressziós vizsgálatok

Az oxidatív stresszválaszban szerepet játszó gének (*soxS*, *oxyR*, *ahpC*, *katG*) ciprofloxacín kezelés hatására történő expressziós változásainak vizsgálatára fluoreszcencia alapú génexpressziós méréseket végeztünk áramlási citometria segítségével. Ehhez egy GFP alapú transzkripciós könyvtár (Zaslaver és mtsai., 2006) megfelelő törzseit használtuk fel, amelyek egy alacsony kópiaszámú plazmidon (pUA66 vagy pUA139) az *E. coli* MG1655 egy-egy promóterét hordozzák egy erős riboszóma kötőhellyel rendelkező *gfp* változathoz (*gfpmut2*) fuzionáltatva. Ezáltal a beklónozott promóter fogja szabályozni a *gfpmut2* transzkripcióját. Az aktív konformációját gyorsan felvevő GFP variáns a transzkripció inicializálódását követő <5 percen belül már fluoreszkál, ami lehetővé teszi a promóter aktivitás dinamikájának precíz

időbeli követését. A fent említetteken kívül mindegyik plazmid tartalmaz egy kanamicin-rezisztencia kazettát is. A megfelelő plazmidokat izolálást követően elektroporációval vittük be a különböző genetikai háttérű törzsekbe. Az áramlási citometria segítségével detektálható fluoreszcencia-intenzitás jelzi a vizsgált gén promóterének az aktivitását. Az áramlási citometriás mérést megelőzően a jelzőtörzseket 96-lyukú lemezekben, 100 µl térfogatú, 50 µg/ml kanamicinnel kiegészített szűrt LB-ben 24 órán keresztül előneveltük. A felnőtt kultúrákat kétszeresre hígítottuk 100 ng/ml ciprofloxacint tartalmazó, 100 µl végtérfogatú friss LB-ben és 24 órán keresztül inkubáltuk őket az áramlási citometriás mérést megelőzően. Genotípusonként négy párhuzamos tenyészetet használtunk. Az áramlási citometriás mérést Millipore Guava 8HT készülékkel végeztük. A GFP intenzitások átlagát számoltuk ki lemezlyukanként 15000 eseményből és ezt normalizáltuk a nem kezelt, vad típusú kontrol GFP intenzitására. A mérések során a promótert nem hordozó, „üres” plazmidot használtuk negatív kontrollként.

4.9. Antibiotikum hatására történő reaktív oxigéngyök-termelés mérése dihidrorodamin segítségével

A Δfur , $\Delta sodAB$ és vad típusú törzsek esetében a ciprofloxacin kezelés (100 ng/ml) hatására történő reaktív oxigéngyök-termelést dihidrorodamin123 (DHR) (Sigma) redox-érzékeny fluoreszcens festék segítségével mértük. A nem fluoreszcens dihidrorodamin123 oxidációt követően alakul át fluoreszcens rodamin123-á, ami számára a sejtmembrán már átjárhatatlan (Gomes és mtsai., 2005). A DHR különféle reaktív oxigéngyök (pl. hidroxil gyök, szuperoxid, hidrogén peroxid, nitrogén dioxid) kimutatására alkalmas, de egyikre sem specifikus (Cossarizza és mtsai., 2009). A vizsgált törzseket egyetlen kolóniából kiindulva Erlenmeyer lombikban 24 órán keresztül előneveltük, majd a kultúrák sejtsűrűségét OD600 =1.5-re állítottuk és szétosztottuk őket 96-lyukú mikrotiter lemezekben. A dihidrorodamin hozzáadását mind a ciprofloxacinnal kezelt, mind a kontroll populációk esetében egy 3 órás előnevelés előzte meg. A dihidrorodamin (10 µM) hozzáadását követően a lemezeket 24 órán keresztül rázás mellett (300 rpm) inkubáltuk, majd a fluoreszcens jelet BioTek Synergy2 fluoreszcens lemezolvasó készülékkel (excitáció: 485 nm, emisszió: 528 nm) olvastuk le. Kezelésenként/törzsenként 9 replikátumot alkalmaztunk. A végső fluoreszcencia intenzitásokat a sejtsűrűsége (OD 600) normalizáltuk.

4.10. Membrán-permeabilitás mérés Hoechst festék felhalmozódási teszttel

7 *mutS* deléciós- és 3 vad típusú genotípusból származó ciprofloxacín rezisztens kolónia esetén megvizsgáltuk a sejtmembrán átjárhatóságát (Coldham és mtsai., 2010) által 96-lyukú lemezre adaptált Hoechst fluoreszcens festék felhalmozódási teszt alkalmazásával. A módszer a Hoechst fluoreszcens festék (H33342 Biszbenzimid) felhalmozódásának mérésén alapul. A ciprofloxacín rezisztens kolóniákat 5 napos, 200 ng/ml ciprofloxacín jelenlétében végzett evolúciós kísérlet eredményéből izoláltuk. Az éjszakán át, LB-ben történő növesztést követően a 10 különböző kolóniából indított kultúra sejtsűrűségét friss LB-ben történő hígítással OD₆₀₀ = 0.3-ra állítottuk, majd ezekből 180 µl-eket mértünk át 96-lyukú mikrotiter lemezbe. A kultúrákhoz egy autoinjekciós adagoló készülék (BioTek) segítségével Hoechst (SIGMA) festéket adagoltunk 25 µM végkoncentrációban 200 µl végtérfogatban. Vonalanként 8 technikai replikátumot használtunk. Az optikai denzitás (OD) és fluoreszcencia értékeket egy Synergy2 (BioTek) fluoreszcens lemezolvasó készülékkel (excitáció: 355 nm, emisszió: 460 nm) olvastuk le 1 órán keresztül, 37°C-on történő inkubálás mellett. Először a kultúrákat tartalmazó lemezlyukak OD értékeit normalizáltuk a csak tápfolyadékot tartalmazó lyukak átlagos OD értékével, majd a mért fluoreszcencia intenzitásokat normalizáltuk az így kiszámolt OD értékekkel. Ezt követően minden vonalra meghatároztuk a fluoreszcencia/OD görbét és kiszámoltuk a görbe alatti területnek megfelelő értéket. A különböző vonalakra a Hoechst festék felhalmozódását a vad típusú kontroll törzshöz viszonyítva határoztuk meg.

4.11. Microarray alapú génexpressziós vizsgálatok

A *Δfur* törzs ciprofloxacín jelenlétében mutatott génexpressziós mintázatának (profiljának) meghatározása végett microarray alapú génexpressziós vizsgálatokat végeztünk. A microarray kísérletet Affymetrix *E. coli* Genome 2.0 Array platformmal végezték. A génexpressziós analízishez törzsenként (*Δfur* és vad típusú törzs) és időpontként két biológiai replikátumot használtunk. Az egy kolóniából indított kultúrákat éjszakán át növesztettük 25 ml LB-t tartalmazó Erlenmeyer lombikokban. A teljes RNS tisztításához a mintavételezést 2 időpontban végeztük: a ciprofloxacín kezelést megelőzően (t₀) és a ciprofloxacín kezelést követően 1 órával (t₁). A kezelés során ~10⁹ /ml sejtkoncentrációjú kultúrát kezeltünk 100

ng/ml ciprofloxaccinnal 20 ml friss LB-ben, Erlenmeyer lombikban, rázatás és 37°C-on történő inkubálás mellett. Időpontonként $\sim 10^9$ sejtet vettünk mintaként a teljes RNS izolálásához. Az RNS stabilizálása céljából a mintákhoz RNA Bacteria Protect Reagent (Qiagen) reagenst adtunk a gyártó leírásának megfelelően, majd éjszakán át -80°C-on tároltuk őket. A teljes RNS tisztítását RNeasy Mini Kit (Qiagen) nevű kittel végeztük a gyártó leírásait követve. A kitisztított RNS koncentrációját NanoDrop 1000 (Thermoscientific) spektrofotométer segítségével becsültük meg.

A microarray kísérletből származó nyers génexpressziós adatokat bioinformatikai analízisnek vetettük alá. Az adatokat az R 3.0.2 program affy package 1.38.1 csomagja (Gautier és mtsai., 2004; R Core Team, 2013) segítségével dolgoztuk fel és elemeztük ki. A mintaszettek annotálása az ecoli2.db 2.9.0 programcsomag (Gentleman és mtsai., 2004) segítségével történt. A microarray chip-ek közti variancia csökkentése céljából először RMA (Robust Multi-array Average) normalizálást végeztünk, vagyis a mintaszettek intenzitásértékeit meghatározott *E. coli* lókuszok azonosítóival normalizáltuk és ezt követően számoltuk ki a génexpressziós változások mértékét. Küszöbértéknek a kétszeres génexpressziós eltérést választottuk az indukálódott és represszálódott gének esetén egyaránt. A kiválasztott küszöbértéket más publikált adatokkal (McHugh és mtsai., 2003) összevetve validáltuk (hipergeometrikus teszt, $P = 3.5 \cdot 10^{-25}$ és $P = 5 \cdot 10^{-4}$ az indukálódott és represszálódott gének esetén). A ciprofloxacin kezelés és az adott genotípus kölcsönhatásának vizsgálatára kétutas ANOVA tesztet alkalmaztunk 10%-os hibás találati ráta (false discovery rate (FDR)) korrekcióval.

5. Eredmények

5.1. Genom szintű szűrés letális koncentrációjú ciprofloxacinhoz való alkalmazkodást elősegítő géninaktivációk azonosítására.

E. coli esetén több genom skálájú munka (Hansen és mtsai., 2008; Liu és mtsai., 2010; Nichols és mtsai., 2011) során vizsgálták azt, hogy a nem esszenciális gének kiütése hogyan befolyásolja az érzékenységet szubletális koncentrációjú antibiotikum alkalmazása esetén. Azt azonban nem vizsgálták genom szinten, hogy mely gének befolyásolják a rezisztencia *de novo* kialakulását letális koncentrációjú antibiotikum alkalmazása esetén. Ebből kiindulva szisztematikus módon megvizsgáltuk a gén-inaktiváció szerepét a klinikumban széles körben alkalmazott fluorokinolon antibiotikummal (ciprofloxacinnal) szembeni rezisztencia kialakulásában. Ehhez egy genom szintű keresést végeztünk a 3985 nem esszenciális, egyszeres gén-deléciók törzset tartalmazó KEIO *E. coli* kollekción (Baba és mtsai., 2006) felhasználva. Célunk olyan gének azonosítása volt, amelyek hiánya elősegíti a magas koncentrációjú ciprofloxacinnal szembeni rezisztencia kialakulását. Választásunk azért esett a ciprofloxacinra, mert széleskörben alkalmazzák a gyógyászatban és hatásmechanizmusa jól feltárt (De és mtsai., 1987; Drlica, 1999). Az általunk alkalmazott 200 ng/ml ciprofloxacinnal szembeni koncentráció a vad típusú törzs MIC értékének 12.5-szörösét jelenti. Ez a dózis az ún. mutánsok megjelenését megelőző koncentráció (angolul MPC (Mutant Prevention Concentration)) fölött van (Drlica, 2003; Marcusson és mtsai., 2005; Olofsson és mtsai., 2006), ami azt jelenti, hogy 10^{10} sejtméretű vad típusú populációban nem jelennek meg rezisztensek egyszeri antibiotikum kezelést követően.

5.1.1. Öt nem esszenciális gén azonosítása, amelyek deléciója megemelkedett evolvabilitást kölcsönöz letális koncentrációjú ciprofloxacinnal szemben.

A genom szintű keresés során alkalmazott ciprofloxacinnal szembeni dózis baktériumölő hatása magas, ami vad típus esetén a populációméret gyors csökkenéséhez vezet (Mason és mtsai., 1995). Kísérleteink során az 5 napos időintervallum végére csak azok a vad genotípusú populációk maradtak életben, amelyek rezisztenssé váltak ciprofloxacinnal szemben. A párhuzamosan

evolválódott vad genotípusú populációknak mindössze a 4%-a vált rezisztenssé átlagosan. A genom szintű keresés második szűrési lépésének eredményeként hat olyan deléciós törzset azonosítottunk ($\Delta mutS$, $\Delta mutH$, $\Delta mutL$, $\Delta miaA$, Δfur , $\Delta ybgJ$), amelyek esetén a vad típusú törzshöz viszonyítva jelentősen megemelkedett a ciprofloxacinnal szembeni rezisztens populációk gyakorisága. Ezen genotípusok esetén az 5 napos kísérlet végére a párhuzamosan evolválódott, független populációk 60-100 %-a rezisztenssé vált ciprofloxacinnal szemben (**4. táblázat**). A törzsek identitását (az adott gén kanamicin rezisztencia kazettával való helyettesítését) PCR segítségével ellenőriztük a megfelelő génre specifikus primerek használatával. Annak ellenőrzésére, hogy valóban a géndeléción felelős-e a megfigyelt hatásért, a hatféle genotípust komplementáltuk az ASKA túltermelő (overexpressziós) kollektió (Kitagawa és mtsai., 2006) megfelelő gént hordozó plazmidjával és megismételtük az 5 napos kísérletet az eredeti és a komplementált törzsekkel. A $\Delta ybgJ$ genotípus kivételével sikerült bizonyítani, hogy az adott gén kiütése volt felelős a ciprofloxacinnal szembeni rezisztens populációk megemelkedett gyakoriságáért, mivel a komplementált törzsek esetén a rezisztens populációk megjelenési gyakorisága nem tért el szignifikánsan a vad típusától. A genom szintű keresés végső találatainak számító 5 genotípus rövid jellemzését az **4. táblázat** tartalmazza.

Megvizsgáltuk, hogy az azonosított deléciós törzsek rezisztencia kialakulását elősegítő képessége ciprofloxacinnal szemben specifikus, vagy pedig érvényes más antibiotikumokkal való kezelés esetén is. Ennek érdekében megvizsgáltuk az azonosított 5 törzs evolvabilitási képességét két, a ciprofloxacinnal eltérő hatásmechanizmusú antibiotikum jelenlétében is. 5 napos evolúciós kísérleteket végeztünk a vizsgált törzsekkel egy-egy fehérjeszintézis-gátló antibiotikum – a bakteriosztatikus hatású kloramfenikol, illetve az aminoglikozidok családjába tartozó baktericid antibiotikum, a sztreptomycin - jelenlétében. Jelen munka során az evolvabilitás kifejezés egy törzs alkalmazkodási képességét jelzi az alkalmazott antibiotikumhoz. Mindkét antibiotikum esetén a vad típusú törzs MIC értékének többszörösét - a kloramfenikol esetén 5.6-szorosát, míg a sztreptomycin esetén 12-szeresét - alkalmaztuk. A Δfur törzs kivételével kloramfenikol esetében, mindegyik törzs a vad típusú törzshöz viszonyítva megemelkedett gyakorisággal hozott létre rezisztens populációkat kloramfenikol, illetve sztreptomycin jelenlétében egyaránt (**4. táblázat**). Ebből arra következtettünk, hogy a vizsgált törzsek megemelkedett alkalmazkodóképessége nem ciprofloxacinnal szemben specifikus, hanem általánosabb hatás.

KEIO törzs	ciprofloxacin MIC (ng/ml)	Gén-funkció	Rezisztens populációk gyakorisága		
			Ciprofloxacin (200 ng/ml)	Kloramfenikol (12.5 µg/ml)	Sztreptomycin (30 µg/ml)
wt	18.4	-	0.04	0.02	0.2
<i>Δfur</i>	13.9	vas-homeosztázis szabályozása	0.6	0.00	0.73
<i>ΔmiaA</i>	26.7	transzlációs hűség	0.99	0.92	1
<i>ΔmutH</i>	19.4	metilirányított DNS hibajavítás	1	0.92	1
<i>ΔmutL</i>	19.4	metilirányított DNS hibajavítás	0.95	1	0.99
<i>ΔmutS</i>	20.5	metilirányított DNS hibajavítás	1	0.96	1

4. táblázat. A genom szintű keresés eredményeképpen azonosított, megemelkedett evolvabilitási képességgel rendelkező egyszeres deléciós törzsek listája és jellemzése.

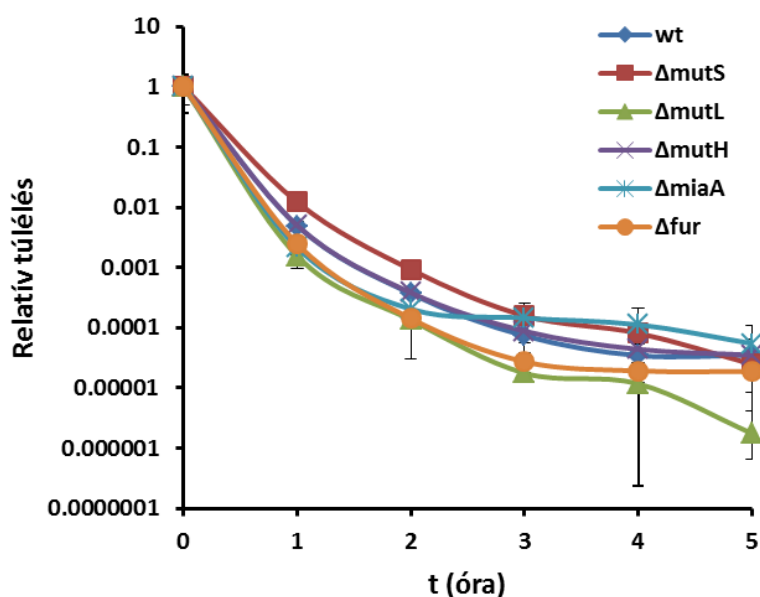
5.1.2. A genom szintű keresés során azonosított gének inaktiválása nem változtatja meg az érzékenységet vagy a túlélési képességet ciprofloxacin jelenlétében.

Annak érdekében, hogy feltárjuk az azonosított egyszeres deléciós törzsek megemelkedett evolvabilitási képességének háttérében álló mechanizmusokat, megvizsgáltuk, hogy megváltozott-e az érzékenységük vagy a túlélésük ciprofloxacin jelenlétében.

Első lépésként hagyományos mikrohigítási módszerrel meghatároztuk a ciprofloxacin minimális gátló koncentrációját (MIC értékét) ezekre a törzsekre. Eredményeink alapján egyik törzs MIC értéke sem tér el jelentősen a vad típusétól (**4. táblázat**), ami azt mutatja, hogy érzékenységük nem változott meg ciprofloxacinnal szemben.

Ezt követően meghatároztuk a törzsekre jellemző kihalási görbéket ciprofloxacin jelenlétében. Az alkalmazott ciprofloxacin koncentráció megegyezett a genom szintű szűrés során alkalmazott dózissal. Az antibiotikum hozzáadását követően 5 órán keresztül, óránkénti

mintavételezéssel követtük nyomon a populációméret csökkenését. Ez alatt az időintervallum alatt egyik vizsgált törzs esetén sem detektáltunk ciprofloxacinnal rezisztens sejteket (1-nél kevesebb rezisztens sejt 1.4×10^7 sejtől), amelyek megjelenése befolyásolhatta volna a túlélést. A vad típusú törzset az ölé hatású antibiotikumokra tipikusan jellemző kétfázisú kihalási görbe (Levin és Rozen, 2006) jellemezte, vagyis a gyors populációméret-csökkenés után az élő sejtek száma csak kismértékben változik. Ennek oka egy perzisztens vagy toleráns szubpopuláció, amelynek tagjai a genetikai állományukban történő módosulás nélkül, az átmenetileg nem osztódó állapotuknak köszönhetően válnak ellenállóvá az antibiotikum ölé hatásával szemben. Később ennek a szubpopulációinak a tagjai közül kerül ki a rezisztens egyedek nagy része, mivel a toleráns állapot „időt biztosít” a rezisztencia mutáció(k) megjelenése számára (Balaban et al., 2013; Cirz and Romesberg, 2007). Az öt egyszeres deléciós törzs közül egyik sem mutatott szignifikánsan eltérő túlélést a vad típushoz viszonyítva ($P > 0.05$, Wilcoxon teszt) (6. ábra).



6. ábra. A genom léptékű szűrés során azonosított egyszeres deléciós törzsek és a vad típus túlélése 200 ng/ml ciprofloxacinnal jelenlétében. Az öt féle egyszeres deléciós törzs közül egyik törzs túlélése sem tér el szignifikánsan a vad típusétól ($P > 0.05$, Wilcoxon teszt). A hibasávok 95%-os konfidencia intervallumot jelölnek.

A vizsgált deléciós törzsek csökkent érzékenysége vagy megemelkedett túlélése ciprofloxacinn jelenlétében részben magyarázhatta volna a rezisztens populációk megemelkedett gyakoriságát, de eredményeink nem támasztották alá ezt a feltételezést. Eredményeink egybevágóak egy korábbi szisztematikus kemo-genomikai vizsgálatnak (Girgis és mtsai., 2009) az eredményeivel. Ennek során egy *E. coli* transzpozon-inszerciók könyvtár törzseinek érzékenységét vizsgálták 17 különböző antibiotikum szubletális (MIC érték alatti) koncentrációival szemben. Az általunk azonosított öt gén közül csak a *miaA* gén deléciója okozott enyhén megemelkedett növekedési rátát a vad típushoz képest, egy másik kinolon antibiotikum, a nalidixinsav jelenlétében. Girgis és kollégái ugyanakkor számos olyan gént azonosítottak (pl. az *acrR*-t), amelyek inaktiválása megemelte a növekedési rátát a vad típusú törzshöz képest szubletális koncentrációjú kinolon antibiotikumok (nalidixinsav, lomefloxacinn) jelenlétében. Meglepő módon ezen gének közül egyik sem jelent meg pozitív találatként a mi vizsgálatainkban. Az általunk azonosított gének listája annak a szisztematikus genom szintű szűrésnek a pozitív találataival sem mutat átfedést, amely során az ofloxacinn nevű kinolon antibiotikummal szembeni perzisztencia kialakulásában szerepet játszó géneket azonosítottak (Hansen és mtsai., 2008).

Eredményeink arra utalnak, hogy letális koncentrációjú ciprofloxacinn jelenlétében az általunk alkalmazott kísérleti körülmények között a rezisztencia kialakulásáért felelős mechanizmusok csak kismértékű átfedést mutatnak a szubletális koncentrációhoz való alkalmazkodásért felelős mechanizmusokkal.

5.1.3. A genom szintű keresés során azonosított gének kiütése növeli a mutációs rátát.

Következő lépésként megvizsgáltuk, hogy az azonosított deléciós törzsek mutációs rátája eltér-e a vad típusétól. Ehhez Lac reverziós mutációs rátaméréseket végeztünk, melynek során hatféle nukleotid szubsztitúció (tranzíció és transzverzió) előfordulási gyakoriságát határoztuk meg a vizsgált deléciós genetikai háttereken. A géndeléciókat P1 fág-transzdukciós eljárással (Green és Sambrook, 2012) vittük be a hatféle indikátor törzshez.

A mutációs ráta mérések eredményei azt mutatták, hogy mindegyik vizsgált géndeléciós törzshez megnövekedett spontán mutációs rátával rendelkezik a vad típushoz képest, de mutációs spektrumukat illetően eltérések figyelhetők meg közöttük (**5. táblázat**) Ez arra utal, hogy eltérő típusú mutációk generálásán keresztül, eltérő mutációs folyamatokban

játszanak szerepet. A metilirányított DNS hibajavítás kulcsenzimeit (MutS, MutL, MutH) kódoló gének egyenkénti kiütése hasonló mutációs spektrumot kölcsönöz, amelyben jellemzően a GC → AT és AT → GC tranzíciók gyakorisága nőtt meg a vad típushoz képest. A *miaA* gén kiütése a GC → TA és AT → TA transzverziók gyakoriságát növeli meg. Mutációs spektrum eredményeink egybevágóak más, mutátor törzseket vizsgáló munkák (Cupples és Miller, 1989; Horst és mtsai., 1999) eredményeivel. Szembetűnő, hogy a *fur* gén deléciója a fent említett génekhez képest kisebb mutációs ráta emelkedést okoz. Elsősorban a GC → TA transzverzió gyakoriságát növeli meg a vad típushoz képest, amelynek létrejötte nagymértékben az oxidált guanin (2'-deoxy-7,8-dihidro-8-oxoguanozin, röviden 8-oxoG vagy „GO”) adeninnel szembeni hibás bázispárosodásának a következménye (Miller, 1996).

Géndeléció típusa	Indikátor törzs (szubsztitúció típusa)					
	CC101 (A:T → C:G)	CC102 (G:C → A:T)	CC103 (G:C → C:G)	CC104 (G:C → T:A)	CC105 (A:T → T:A)	CC106 (A:T → G:C)
wt	- ^a	1.6	- ^a	2.3	0.4	- ^a
Δ<i>fur</i>	- ^a	4	- ^a	7.3	- ^a	0.9
Δ<i>miaA</i>	- ^a	- ^a	4.5	95.3	68.2	- ^a
Δ<i>mutH</i>	- ^a	88.3	1.5	6.7	19.5	82.1
Δ<i>mutL</i>	- ^a	203.5	2.3	2.9	12	80.6
Δ<i>mutS</i>	- ^a	18.2	2.6	28.6	0.5	312.7

-^a: Detekciós szint alatti (0.4/generáció/10⁸ sejt)

5. táblázat. Lac⁺ revertánsok gyakorisága 10⁸ sejtre számolva, öt féle géndeléziós és vad típusú háttéren. A genom léptékű keresés során azonosított öt gén egyenkénti kiütése megemelkedett bázis szubsztitúciós gyakoriságot kölcsönöz a vad típushoz viszonyítva.

Eredményeink arra engednek következtetni, hogy a genom szintű keresés során azonosított mutáns törzsek emelkedett evolvabilitási (alkalmazkodási) képességének háttérében a törzsek megemelkedett mutációs rátája áll. Az azonosított gének három nagyobb funkcionális csoportba sorolhatók: metilirányított DNS hibajavítás (metyl directed mismatch repair (MMR)) (*mutS*, *mutH*, *mutL*), transzlációs hűség megőrzése (*miaA*) és vas-homeosztázis szabályozása (*fur*).

A *mutS*, *mutH* és *mutL* gének deléciójának mutációs ráta-növelő hatása nem meglepő, hiszen ezek a gének a metilirányított hibás-párosodás DNS-javításban kulcsfontosságú szerepet játszó fehérjéket kódolnak. A fent említett hibajavító rendszer a sejt mutációs rátáját alacsony szinten tartja azáltal, hogy felismeri és kijavítja azokat a DNS hibákat, amelyek a replikáció és a homológ rekombináció során, illetve különböző DNS károsító anyagok hatására keletkeznek (Horst és mtsai., 1999; Junop és mtsai., 2003; Wyrzykowski és Volkert, 2003). *Escherichia coli*-ban a MutS, MutL és MutH fehérjéket kódoló gének deléciója vagy csökkent expressziója a sejt össz-mutációs rátájának és a nem homológ rekombináció gyakoriságának megemelkedéséhez vezet, hiper-mutátor és hiper-rekombináns fenotípust eredményezve (Schofield és Hsieh, 2003).

A *miaA* gén egy dimetilallil-transzferázt kódol, amely bizonyos tRNS-ek (pl. tRNS^{Tyr}, tRNS^{Phe}) módosítását végzi azáltal, hogy a dimetilallil pirofoszfát dimetilallil csoportját áthelyezi a tRNS-ek antikodonja mellett elhelyezkedő, 37-es pozíciójú adozinra (Connolly és Winkler, 1991). A tRNS-ek bizonyos nukleozidjainak megfelelő módosítása fontos szerepet tölt be a transláció pontosságának és megfelelő hatékonyságának biztosításában. Módosítás hiányában a peptidil-tRNS megcsúszása nagyobb gyakorisággal következik be, ami a leolvasási keret eltúlódását, és annak eredményeként aminosavcseréket és misztranszlálódott fehérjéket eredményezhet (Urbonavicius és mtsai., 2001). Bár a pontos mutagenézis útvonal nem ismert, azt feltételezik, hogy a *miaA* mutáns esetében is a megnövekedett translációs hibaráta az ún. translációs stressz indukálta mutagenézis útvonal(ak)on keresztül vezet mutációk megjelenéséhez, egy másik misztranszlációs mutáns (*mutA*) esetében leírtakhoz hasonlóan (Ren et al., 1999; Zhao et al., 2001). Kimutatták, hogy pozitív összefüggés létezik a hibás szerkezetű fehérjék és ezek oxidációja között, mivel a misztranszlálódott fehérjék érzékenyebbek az oxidatív stresszel szemben (Dukan et al., 2000). Elképzelhető, hogy a légzési lánc fehérjéinek misztranszlációja esetén, ezen fehérjék hibás vagy csökkent működése mutációkat generáló abnormalis reaktív oxigéngyök-képződéshez vezethet. A mutációk ugyanakkor létrejöhetnek közvetett úton is, a DNS replikációban vagy a replikációs hűség biztosításában részt vevő fehérjék misztranszlációja következtében. A *miaA* gén deléciója az össz-mutációs ráta megemelkedéséhez elsősorban a GC →TA transzverzió gyakoriságának megnövelése révén járul hozzá (Connolly és Winkler, 1991; Zhao és mtsai., 2001).

A *fur* (ferric uptake regulator) gén egy Fe²⁺ kofaktorral működő, széles spektrumú transzkripciós szabályozó fehérjét kódol, amelynek elsődleges feladata az intracelluláris vas-

egyensúly fenntartása. Fur hiányában a vasfelvétel konstitutív válik, ami az intracelluláris szabad vastartalom (Fe^{2+}) megemelkedéséhez, és ennek következményeként a Fenton reakció felpörgetéséhez vezet (Escolar és mtsai., 1999; Hantke, 1981, 1982). A megemelkedett oxidatív stressz következtében a *fur* deléciós törzset az oxidatív károsodások és a mutagenézis emelkedett szintje jellemzi (Nunoshiba és mtsai., 1999; Touati és mtsai., 1995). Mutációs spektrumát tekintve az oxidatív károsodást jelző GC \rightarrow TA transzverzió gyakorisága nőtt meg, hasonlóan, mint az oxidált guanozin DNS-ből való eltávolításáért felelős MutM illetve MutY DNS glikozilázokban deficiens törzseknél (Miller, 1996).

5.1.4. Ciprofloxacín rezisztens Δ *mutS* és vad típusú populációk jellemzése a rezisztenciát okozó mutációk típusa alapján.

Annak megállapítása érdekében, hogy milyen típusú mutációk biztosítanak rezisztenciát a genom léptékű vizsgálat során alkalmazott ciprofloxacín dózis mellett, rezisztens populációkat izoláltunk 200 ng/ml ciprofloxacín jelenlétében a Δ *mutS*, illetve a vad típusú törzsekből. Szekvenálással megvizsgáltunk három olyan gént (*gyrA*, *parC* és *marR*), amelyek gyakran tartalmaznak mutációkat kinolon rezisztens vonalak esetén (Bagel és mtsai., 1999; Kern és mtsai., 2000). Hét Δ *mutS*, illetve három vad típusú rezisztens kolóniából kolónia PCR segítségével felszorzosítottuk a *gyrA* és *parC* gének kinolon rezisztenciát meghatározó régióját (QRDR), illetve a teljes *marR* gént. Szekvenálást követően a pontmutációk azonosítása a CLC Sequence Viewer (<http://www.clcbio.com/products/clc-sequence-viewer>) és a BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/page2.html>) programok segítségével történt a vizsgált szekvenciák EcoCyc (<http://ecocyc.org/>) adatbázisból letölthető génszekvenciákkal való összehasonlítása révén. A megszekvenált vonalak esetén Epszilométer teszt (E-teszt) segítségével meghatároztuk a ciprofloxacín MIC értékét, valamint Hoechst fluoreszcens festék segítségével megvizsgáltuk a sejtmembrán átjárhatóságát. A 10 rezisztens vonal közül mindegyik tartalmazta a Ser83Leu aminosavcserét okozó pontmutációt a DNS giráz egyik alegységét (GyrA) kódoló *gyrA* génben (**6. táblázat**). Ez a mutáció a ciprofloxacín rezisztens laboratóriumi és klinikai vonalak egyik jellemző mutációjának tekinthető (Conrad és mtsai., 1996; Nakamura és mtsai., 1989).

Annak ellenére, hogy a rezisztens vonalak közül a vizsgált génekben csak egy esetben azonosítottunk két pontmutációt, két tényező is arra enged következtetni, hogy a vizsgált

vonalak a genom általunk nem vizsgált részein más pontmutáció(ka)t is hordoznak. Egyrészt a rezisztens vonalak ciprofloxacinnal MIC értéke a legtöbb esetben jóval meghaladja a *gyrA*-ban lévő Ser83Leu aminosavcserét okozó pontmutáció által biztosított MIC értéket. Másrészt a vizsgált törzsek jelentős részében a Hoechst festék intracelluláris felhalmozódása enyhén, de szignifikánsan alacsonyabb a vad típuséhoz viszonyítva (**6. táblázat**), ami csökkent porin- vagy megemelkedett efflux pumpa aktivitásra utal (Coldham és mtsai., 2010; Kern és mtsai., 2000).

Összességében a genom léptékű keresés eredményeként azonosított öt gén közül a legérdekesebb találat a *fur* gén volt. A másik négy génnel ellentétben, deléciója a spontán mutációs ráta csak enyhe (egy nagyságrenden belüli) emelkedését váltja ki normál körülmények között (**5. táblázat**). Ez azt sugallta, hogy a ciprofloxacinnal jelenlétében tapasztalt emelkedett evolvíbilis képességéhez más tényezők is hozzájárulnak.

Rezisztens vonal	Ciprofloxacinnal MIC (µg/ml)	Mutációk típusa			Membrán-átjárhatóság ^a
		<i>gyrA</i>	<i>parC</i>	<i>marR</i>	
<i>ΔmutS-1</i>	1	S83L	-	-	1.08 ^b
<i>ΔmutS-2</i>	2	S83L	A140T	-	1.01
<i>ΔmutS-3</i>	0.75	S83L	-	-	0.90 ^b
<i>ΔmutS-4</i>	1	S83L	-	-	0.94 ^b
<i>ΔmutS-5</i>	2	S83L	-	-	0.74 ^b
<i>ΔmutS-6</i>	2	S83L	-	-	1.30 ^b
<i>ΔmutS-7</i>	2	S83L	-	-	0.91 ^b
wt-1	1.5	S83L	-	-	0.91 ^b
wt-2	1	S83L	-	-	0.91 ^b
wt-3	0.25	S83L	-	-	0.98
wt-S83L	0.25	S83L	-	-	1.01
wt	0.008	-	-	-	1.00

^a: Relatív Hoechst festék-felhalmozódás

^b: P < 0.05 (Mann-Whitney U teszt)

-: pontmutáció hiánya

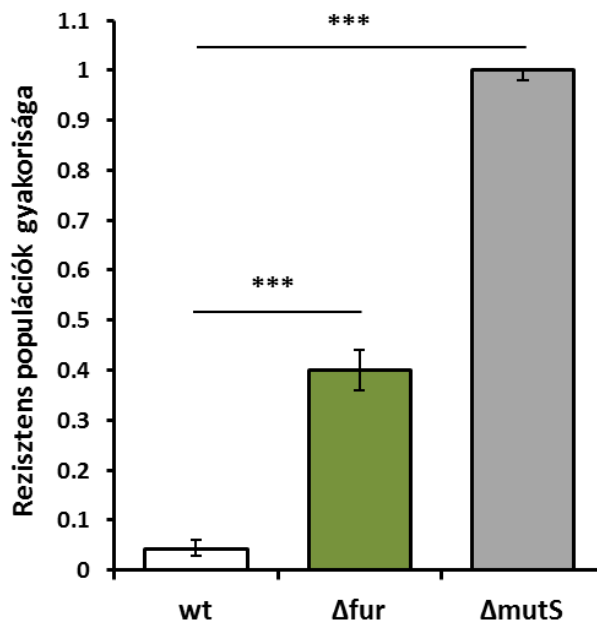
6. táblázat. A genom szintű keresés kísérleti körülményei között szelektált tíz ciprofloxacinnal rezisztens vonal jellemzése a felhalmozott pontmutációk típusa, a ciprofloxacinnal MIC értéke és a sejtmembrán átjárhatósága szempontjából.

5.2. A vas-közvetített oxidatív mutagenézis és az antibiotikum rezisztencia kapcsolata

A vas-homeosztázis szabályozásában központi szerepet játszó *fur* gén volt az előzetes genom léptékű vizsgálat talán legérdekesebb eredménye, és az intracelluláris vas-egyensúly és az antibiotikum rezisztencia kapcsolatára irányította a figyelmünket. Korábbi munkák alapján a baktericid antibiotikumok felpörgetik a légzési láncot és változásokat idéznek elő a vasháztartásban is, ami reaktív oxigéngyökök képződéséhez vezet (Kohanski és mtsai., 2007, 2010a). Ezen eredményekre és az általunk végzett szűrés eredményére alapozva, a vas közvetítette oxidatív stressz antibiotikum rezisztencia kialakulásában betöltött szerepének tanulmányozásába kezdtünk a Δfur törzs jellemzésén keresztül. Vizsgálataink során a genom szintű keresés során alkalmazott ciprofloxacinnal szemben kialakuló rezisztencia jelenségére összpontosítottunk.

5.2.1. A vas homeosztázis szabályozó fehérjéjének (Fur) inaktiválása elősegíti a rezisztencia kialakulását letális dózisu ciprofloxacinnal szemben.

A genom szintű keresés eredményének megerősítése céljából 5 napos laboratóriumi evolúciós kísérleteket végeztünk 100 ng/ml ciprofloxacinnal jelenlétében a Δfur törzsszel, és az eredményeket összehasonlítottuk a vad típusú és a $\Delta mutS$ törzsekkel. Az evolúciós kísérletek során alkalmazott ciprofloxacinnal dózis 100 ng/ml volt, ami a vad típusú törzs MIC értékének 6.25-szörösét jelenti. Ezen a letális dózisu ciprofloxacinnal koncentráción az 5 napos kísérlet végére a vad típusú, nem rezisztens populációk teljes kihalása volt jellemző, vagyis az antibiotikumot nem tartalmazó lemezekeken csak rezisztenssé vált populációkat detektáltunk 5 nap elteltével. Vad típus esetén a rezisztens populációk a párhuzamosan evolválódott populációk 4 %-át tették ki átlagosan (7. ábra).

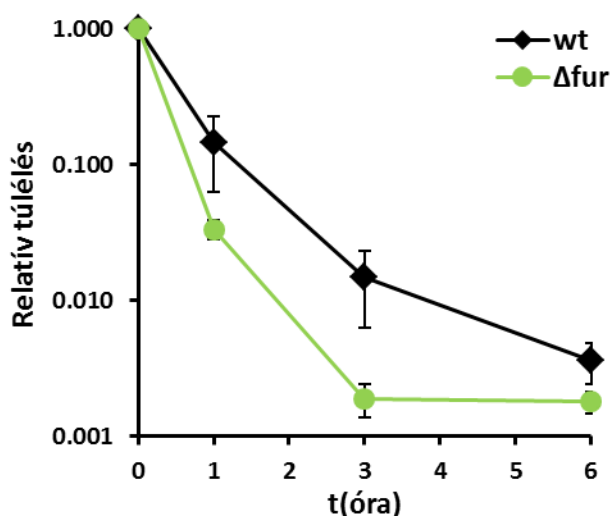


7. ábra. A Δfur törzs evolvabilitási képessége 100 ng/ml ciprofloxacin jelenlétében, összehasonlítva a vad típusú (wt) és a $\Delta mutS$ törzsekkel. A hibásávok arányból számolt 95%-os konfidencia intervallumot jelölnek. ***= $P \leq 0.0001$ (Khí-négyzet próba).

A Δfur törzs esetén a ciprofloxacin rezisztens populációk frekvenciája a párhuzamosan evolválódott populációk 40%-át tette ki átlagosan, ami tízszeres emelkedést jelent a vad típushoz képest ($P \leq 0.0001$, Khí-négyzet próba) (7. ábra). A $\Delta mutS$ törzs esetén ezen a koncentráción a ciprofloxacin rezisztens populációk gyakorisága 100%-os volt (7. ábra). Evolvabilitása alapján a Δfur törzs „középúton” helyezkedik el a vad típus és a $\Delta mutS$ erős mutátor törzs között. 24 óránkénti mintavételezéssel kimutattuk, hogy a Δfur törzs esetén a rezisztens vonalak az 5 napos időintervallum alatt (2-3 nap után) jelentek meg, tehát nem voltak eleve jelen a kiindulási populációkban. A rezisztens telepek *de novo* megjelenését az igazolta, hogy a ciprofloxacinnal kiegészített LB tápoldatba való újbóli kioltásukat követően gyors növekedést mutattak.

Ezt követően túlélési vizsgálatot végeztünk, melynek során meghatároztuk a vad típusú és a Δfur törzsekre jellemző kihalási görbéket 100 ng/ml ciprofloxacin jelenlétében. A Δfur törzs túlélése nem növekedett meg a vad típusú törzshöz képest 100 ng/ml ciprofloxacin jelenlétében sem (8. ábra), megerősítve előző eredményünket 200 ng/ml ciprofloxacin jelenlétében. Éppen ellenkezőleg, enyhén csökkent túlélést mutat a vad típushoz képest,

aminek háttérében a Δfur genotípusra jellemző megemelkedett intracelluláris Fe^{2+} -szintből adódó oxidatív károsodások állhatnak (Touati és mtsai., 1995).



8. ábra. A Δfur törzs kihalási görbéje 100 ng/ml ciprofloxacin jelenlétében, összehasonlítva a vad típusú (wt) törzssel. A hibasávok három független kísérlet eredményéből számolt 95%-os konfidencia intervallumot jelölnek.

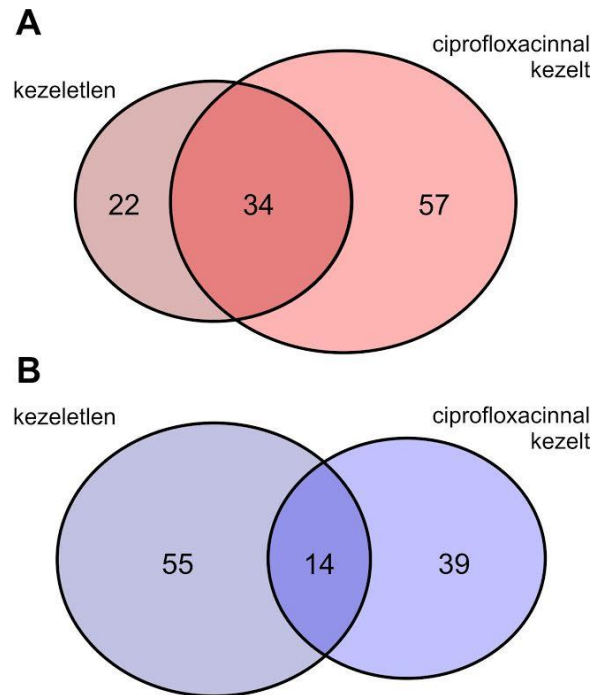
5.2.2. A Fur regulon plasztikus átrendeződést mutat ciprofloxacin kezelés hatására.

A Δfur törzs emelkedett evolvabilitásának háttérében álló mechanizmusok feltárása céljából transzkriptomikai vizsgálatokat végeztünk, összehasonlítva a vad típusú és a Δfur törzs génexpressziós választ ciprofloxacin kezelés hatására. Célunk olyan génexpressziós változások azonosítása volt, amelyek specifikusan a Δfur törzs esetén ciprofloxacin kezelés hatására jelentkeznek. Ennek érdekében összehasonlítottuk a vad típusú és a Δfur törzs génexpressziós mintázatát ciprofloxacin hiányában, illetve 1 órás 100 ng/ml ciprofloxacin kezelést követően. A transzkriptomikai analízishez a mintavételezés közvetlenül a ciprofloxacin kezelés előtt (t_0), illetve 1 órával a kezelést követően történt. A nyers microarray adatok közül a transzkriptomikai analízishez csak azokat a géneket használtuk fel, amelyek expressziója legalább kétszeres változást mutatott a kezeletlen kontrollhoz képest.

Először ciprofloxacin hiányában (t_0) hasonlítottuk össze a vad típusú és a Δfur törzsek génexpressziós mintázatát. Specifikusan a Δfur törzsben 125 gén expressziója változott meg,

melyek közül 56 indukálódott és 69 represszálódott. Validálás céljából a génexpressziós adatsorunkat összevetettük egy előző vizsgálat (McHugh és mtsai., 2003) adatsorával, és az eltérő kísérleti körülmények ellenére szignifikáns átfedést találtunk azon gének listájában amelyek expressziója a Δfur törzsrre specifikusan változott meg (**Függelék, 1. ábra**). Nem meglepő módon, a gén-ontológiai elemzések (Boyle és mtsai., 2004; Camon és mtsai., 2004) igazolták, hogy a Δfur törzsben elsősorban a vas homeosztázisban szerepet játszó gének expressziója változott meg. Ezek közül pedig a sziderofór-közvetített vasfelvételben és az enterobaktin sziderofór bioszintézisében szerepet játszó gének expressziója emelkedett meg jelentősen (**Függelék, 1. táblázat**). Érdekes módon az anaerob respirációban szerepet játszó és az elektron-transzportlánc néhány tagját kódoló gének expressziója is jelentősen megváltozott (**Függelék, 1. táblázat**).

Ciprofloxacin kezelés hatására jelentős génexpressziós átrendeződés volt megfigyelhető mindkét törzs esetén. A vad típusban összesen 748 génnek változott meg szignifikánsan az expressziója. Ezek közül a DNS hibajavításban és az SOS válaszban szerepet játszó gének expressziója jelentősen megemelkedett (**Függelék, 2. táblázat**), egyezést mutatva egy másik DNS-giráz-gátló antibiotikummal végzett transzkripciós vizsgálat (Dwyer és mtsai., 2007) eredményeivel. A Δfur törzsben ciprofloxacin hiányában illetve jelenlétében összesen 221 gén expressziója változott meg specifikusan a vad típushoz viszonyítva. Azon gének aránya, amelyek a Δfur törzsben mindkét körülmény között (ciprofloxacin hiányában és jelenlétében is) megváltozott expressziót mutattak, alacsony volt: az indukálódott gének esetén 15.4%, míg a represszálódott gének esetén 6.3%. (**9. ábra**). Ez arra utal, hogy antibiotikum kezelés hatására a Δfur törzs transzkripciós mintázata jelentősen átrendeződik. Ciprofloxacin kezelés hatására 96 gén expressziója változott meg specifikusan, ezek közül 57 indukálódott, míg 39 represszálódott. Ezek közül egy szigorú statisztikai eljárás alkalmazásával (lásd anyagok és módszerek részben) azonosítottuk azokat a géneket, amelyek genotípus-környezet (Δfur – ciprofloxacin kezelés) kölcsönhatásra specifikus expressziós változást mutattak (**7. táblázat**). Ilyen például a sziderofórhoz kötött Fe^{3+} -felvételben központi szerepet játszó TonB-ExbB-ExbD fehérjekomplex egyik alegységét kódoló *exbB* gén, amelynek expressziója a *fur* gén kiütése vagy a ciprofloxacin kezelés hatására külön-külön nem mutatott szignifikáns eltérést a kezeletlen vad típushoz képest. Ezzel ellentétben, ha a *fur* gén kiütése és a ciprofloxacin kezelés együtt fordult elő, akkor 6-szoros indukciót mutatott a kezeletlen vad típushoz képest (**7. táblázat**).



9. ábra. A *Δfur* törzsre specifikus, ciprofloxacin hiányában, illetve jelenlétében szignifikánsan megváltozott expressziót (indukciót (A) vagy repressziót (B)) mutató gének közti átfedést ábrázoló Venn diagrammok. Kevés gén mutatott megváltozott expressziót mindkét körülmény között. A diagrammon feltüntetett számok az egyik, vagy mindkét körülmény között megváltozott expressziót mutató gének számát jelzik.

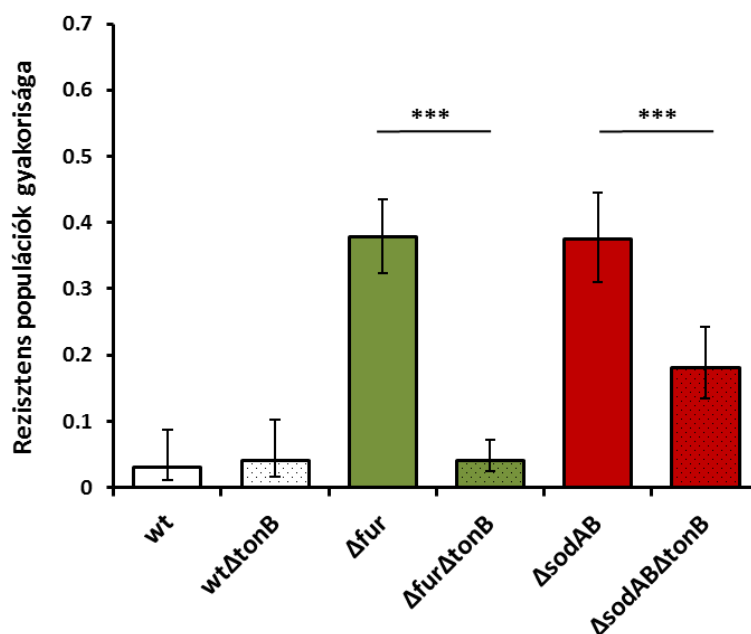
Egy másik példa a Fe-S kockák összeszerelődésében szerepet játszó SufA vázfehérjét kódoló gén, amelynek expressziója a *Δfur*-ban ciprofloxacin kezelés hatására 8-szoros emelkedést mutat a kezeletlen vad típushoz képest. Ugyancsak jelentős indukciót mutatnak az enterobaktin sziderofór bioszintézisében szerepet játszó EntA és EntC enzimeket kódoló gének is. A fent említett transzkriptomikai eredményekből arra következtettünk, hogy a *Δfur* emelkedett evolvabilitási képessége ciprofloxacin jelenlétében a vasszabályozással hozható összefüggésbe.

Gén	Kódolt fehérje funkciója	A kezeletlen vad típushoz viszonyított hRNS szint		
		Δfur	CPR	$\Delta fur + CPR$
<i>exbB</i>	TonB-ExbB-ExbD energiaátalakító fehérjekomplex része	1.43	1.10	6.64
<i>efeU</i>	Hipotetikus fehérje, Fe ²⁺ transzporter része	1.05	1.00	1.72
<i>mntH</i>	Mn ²⁺ /Fe ²⁺ : H ⁺ szimporter	1.05	0.81	1.56
<i>yajH</i>	Sziderofórral kölcsönható, NADPH-függő Fe ³⁺ reduktáz	1.62	0.58	2.76
<i>entC</i>	Enterobaktin bioszintézisében szerepet játszó izokorizmát-szintáz	3.39	0.69	9.59
<i>entA</i>	Enterobaktin bioszintézisében szerepet játszó 2,3-dihidro-2,3-dihidroxibenzoát dehidrogenáz	1.81	0.96	5.89
<i>sufA</i>	Fe-S kockák összeszerelődésében szerepet játszó vázfehérje	1.70	1.17	8.25
<i>ybbB</i>	tRNS-ek módosításáért felelős szelenouridin-szintáz	1.01	1.71	1.23
<i>ptrB</i>	B oligopeptidáz (proteáz II)	1.10	1.24	1.10
<i>lolB</i>	Külső membránban elhelyezkedő, lipoproteinek lokalizációjáért felelős lipoprotein	1.16	2.53	1.80
<i>lpxL</i>	Lauroil aciltranszferáz	1.21	1.47	1.22
<i>napF</i>	Prediktált 3Fe-4S tartalmú fehérje, fokozza a periplazmikus nitrát-reduktáz (Nap) aktivitását	0.91	3.85	1.73

7. táblázat. A Δfur törzsben ciprofloxacín (CPR) kezelés hatására szignifikáns expressziós változást mutató gének listája ahhoz viszonyítva, amit a *fur* gén kiütése, valamint a ciprofloxacín kezelés független hatása alapján várnánk. Csak azok a nyitott leolvasási keretek (ORF-ek) vannak feltüntetve, amelyek a kétutas ANOVA teszt során szignifikáns interakciós értéket kaptak, 10%-os hibás találati ráta mellett. Jelölés: hRNS – hírvivő RNS.

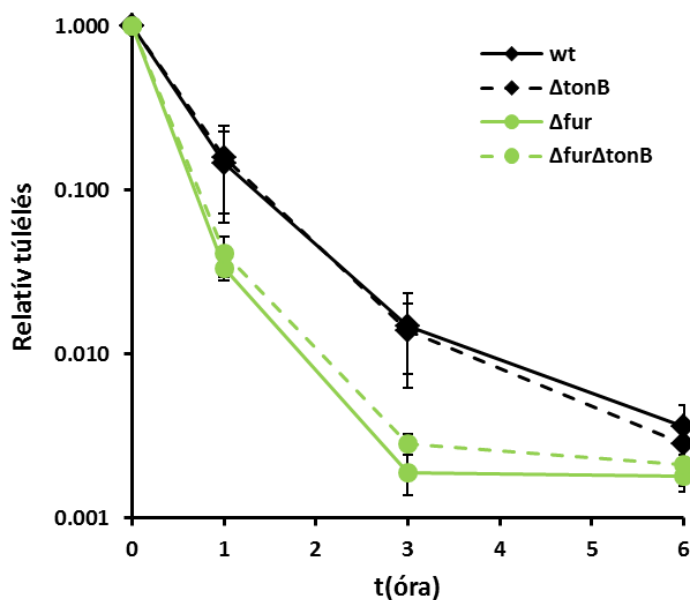
5.2.3. Az intracelluláris szabad vastartalom kulcsfontosságú szerepet tölt be a ciprofloxacinnal szembeni rezisztencia kialakulásában.

Mivel a Fur szabályozó fehérje a vasfelvételt negatívan, míg a vasraktározást pozitívan szabályozza, hiányában a vasfelvételben szerepet játszó gének folyamatosan expresszálódnak, ami az intracelluláris vasszint megemelkedéséhez vezet (Hantke, 1981; Touati és mtsai., 1995). Először a vasfelvétel szerepét vizsgáltuk meg a ciprofloxacinnal szembeni rezisztencia kialakulásában a sziderofór-közvetített vasfelvétel egyik kulcsfehérjéjét (TonB) kódoló gén kiütésén keresztül. A TonB-ExbB-ExbD fehérjekomplex egyik alegységét képező TonB fehérje központi szerepet tölt be a sejt vasfelvételében azáltal, hogy a citoplazmatikus membrán proton motoros erejét átalakítja a Fe^{3+} -sziderofór komplexek felvételéhez (külső membránon keresztüli aktív importjához) szükséges energiává (Letain és Postle, 1997). Hiányában a Fe^{3+} felvétele gátolt (Andrews és mtsai., 2003; Letain és Postle, 1997). 5 napos evolúciós kísérleteket végeztünk összehasonlítva a Δfur és $\Delta fur\Delta tonB$ törzsek evolvabilitási képességét. Eredményeink azt mutatták, hogy a vasfelvétel gátlása a *tonB* gén kiütésével jelentősen lecsökkentette a ciprofloxacinnal szembeni rezisztens populációk gyakoriságát *fur* deléciós háttéren a Δfur törzshöz viszonyítva (10. ábra).



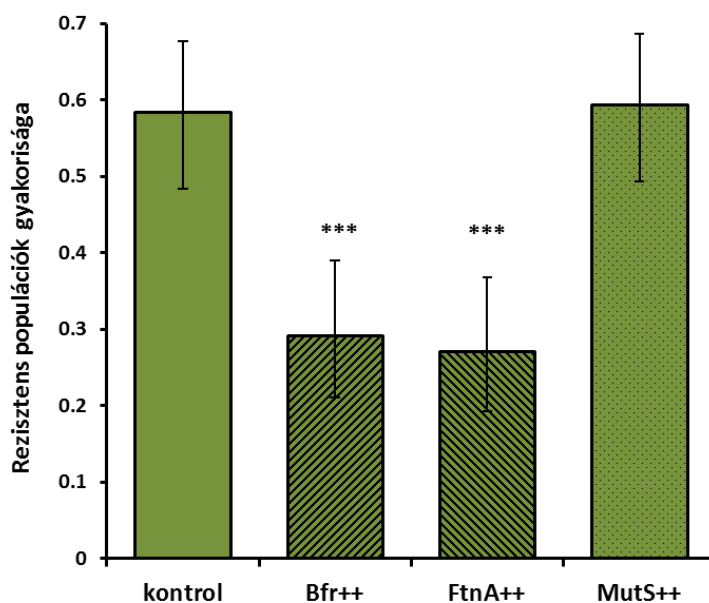
10. ábra. A sziderofór-közvetített vasfelvétel gátlásának hatása (a *tonB* gén kiütése által) a ciprofloxacinnal szembeni rezisztens populációk megjelenési gyakoriságára a vad típusú, Δfur és $\Delta sodAB$ törzsek esetén. A hibásávok arányból számolt 95%-os konfidencia intervallumot jelölnek. ***= $P \leq 0.0001$ (Khí-négyzet próba).

A *tonB* deléciós törzsekkel, 100 ng/ml ciprofloxacinnal jelenlétében végzett túlélési vizsgálatok eredményei kimutatták, hogy a *tonB* gén deléciója nem okoz csökkent túlélést ciprofloxacinnal jelenlétében (**11. ábra**). Ennek megfelelően a $\Delta fur\Delta tonB$ törzs esetén a ciprofloxacinnal rezisztens populációk csökkenett megjelenési gyakorisága nem egy megemelkedett ciprofloxacinnal érzékenységnek, hanem a részlegesen gátolt vasfelvételnek a következménye.



11. ábra. A sziderofór-közvetített vasfelvétel gátlásának hatása (a *tonB* gén kiütése által) a túlélésre 100 ng/ml ciprofloxacinnal jelenlétében a vad típus és a Δfur törzs esetén. A hibaszávok két független kísérlet eredményéből számolt 95%-os konfidencia intervallumot jelölnek.

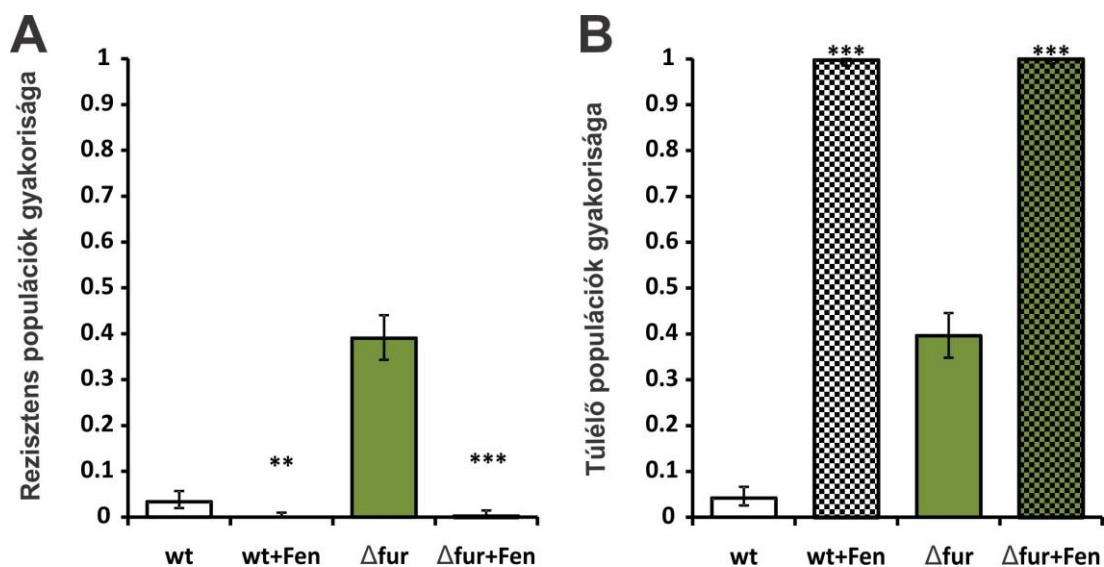
Következő lépésként az intracelluláris vasraktározás szerepét vizsgáltuk meg a ciprofloxacinnal szembeni rezisztencia kialakulásában, a két fő vasraktározó fehérje - ferritin (FtnA) és bakterioferritin (Bfr) - magas kópiaszámú plazmidról történő egyenkénti túltermeltetése révén. Ehhez 5 napos evolúciós kísérleteket végeztünk összehasonlítva a vasraktározó fehérjét túltermelő *fur* deléciós törzs és az üres plazmidot hordozó *fur* deléciós törzs evolúciós képességét. A Bfr és FtnA fehérjék magas kópiaszámú plazmidról történő túltermeltetése jelentősen lecsökkentette a ciprofloxacinnal rezisztens populációk frekvenciáját az üres plazmidot hordozó kontrollhoz képest (**12. ábra**). Eredményeink alapján a Δfur törzs rezisztencia kialakulását elősegítő „képessége” nagymértékben függ az intracelluláris szabad vas tartalomtól. A rezisztencia kialakulása csökkenthető az extracelluláris vasfelvétel részleges gátlásával vagy az intracelluláris vasraktározás serkentésével.



12. ábra. A vasraktározásban szerepet játszó fehérjék (Bfr, FtnA) és a MutS fehérje plazmidról történő túltermeltetésének hatása a ciprofloxacin rezisztens populációk megjelenési gyakoriságára *fur* deléziós háttéren. Jelölések: ++ - adott fehérje túltermeltetése a pZE31 magas kópiaszámú plazmidról; kontrol – üres pZE31 plazmidot hordozó Δfur törzs. A hibásávok arányból számolt 95%-os konfidencia intervallumot jelölnek. ***= $P \leq 0.0001$ (Khi-négyzet próba).

Mivel a vasfelvétel gátlásával, illetve a vasraktározás fokozásával jelentősen csökkenthető volt a ciprofloxacinnal szembeni rezisztencia kialakulása, megvizsgáltuk, hogy a szabad vas kelátor segítségével történő megkötésének hasonló hatása van-e a rezisztencia alakulására. Vaskelátorként o-fenantrolint alkalmaztunk, amely magas lipofilitásának köszönhetően képes áthaladni a sejtmembránon és bejutni a sejtbe. A Δfur és vad típusú törzsekkel végzett 5 napos evolúciós kísérleteket során a párhuzamosan evolválódó populációk feléhez a ciprofloxacinon kívül 50 $\mu\text{g/ml}$ végkoncentrációban o-fenantrolint adtunk. Az alkalmazott koncentráció az MIC méréssel meghatározott gátló koncentráció alatti tartományban van.

A fenantrolin jelenléte drasztikusan lecsökkentette a ciprofloxacin rezisztens populációk megjelenését (**13. ábra, A panel**). Ez az eredmény nem adódhat a fenantrolinnak a sejtek túlélésére gyakorolt esetleges gátló hatásából, mivel érdekes módon a túlélő, de nem rezisztens populációk számát a rezisztensekkel ellentétben jelentősen növelte (**13. ábra, B panel**).



13. ábra. Az o-fenantrolin vas kelátor hatása a ciprofloxacín rezisztens populációk megjelenési gyakoriságára (A) és a túlélő populációk gyakoriságára (B) a vad típusú és a Δfur törzsek esetén. Az o-fenantrolin 50 μM végső koncentrációban volt alkalmazva. A hibásávok arányból számolt 95%-os konfidencia intervallumot jelölnek. ** = $P \leq 0.01$, *** = $P \leq 0.0001$ (Khí-négyzet próba). Jelölés: Fen – o-fenantrolin.

5.2.4. A szuperoxid szerepe a rezisztencia kialakulásában

E. coli esetén a DNS-giráz gátlása (antibiotikumok vagy peptid toxinok által) a légzési lánc felpörgetésének következményeként a szuperoxid szintjének megemelkedéséhez vezet (Dwyer és mtsai., 2007). A szuperoxid közvetlenül nem károsítja a DNS-t, de a Fe-S tartalmú, oxidációra érzékeny citoszólikus dehidratázokból vasat képes felszabadítani és ez által megnöveli az intracelluláris szabad vas koncentrációját (Imlay, 2006; Keyer és Imlay, 1996). A Δfur törzs vasban gazdag körülmények között fenotipikusan úgy viselkedik, mint egy szuperoxid diszmutázokban részlegesen deficiens törzs. Ez két okból adódik. Egyrészt a Fe SOD (SodB) nem aktiválódik, másrészt pedig a mangán kofaktorral működő Mn SOD (SodA) csökkent aktivitású. Ez utóbbi annak tulajdonítható, hogy a mangán kisebb eséllyel kötődik az enzim aktív centrumához, mivel verseng a kötődésért a magas koncentrációban jelen lévő vassal (Schrum és Hassan, 1994; Troxell és Hassan, 2013).

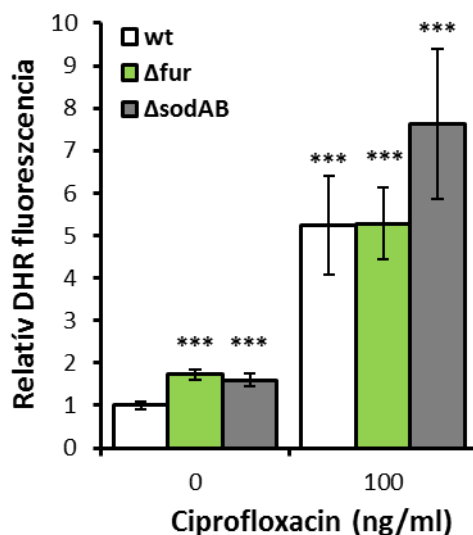
Ennek ismeretében előállítottunk egy olyan kettős géndeléciós törzset ($\Delta sodAB$), amelyikből mindkét szuperoxid hatástalanító enzim: SodA és SodB is hiányzik, és megvizsgáltuk ezen törzs evolvabilitási képességét ciprofloxacín jelenlétében. A Δfur

törzshöz hasonlóan a $\Delta sodAB$ törzs is gyakrabban képez ciprofloxacinnal rezisztens populációkat a vad típushoz viszonyítva. A $\Delta sodAB$ törzs esetén a ciprofloxacinnal rezisztens populációk a párhuzamosan evolválódott populációk közel 40%-át tették ki átlagosan, ami jelentős emelkedést jelent a vad típushoz képest ($P \leq 0.0001$, Khí-négyzet próba) (**10. ábra**). *E. coli* esetén mindkét szuperoxid diszmutáz hiánya aerob körülmények között 40x-es mutációs rátaemelkedést okoz a vad típushoz viszonyítva, a magas szuperoxid szintből adódó megemelkedett oxidatív stresszszintnek köszönhetően (Farr és mtsai., 1986; Nunoshiba és mtsai., 1999; Touati és mtsai., 1995).

A *tonB* gén kiütésének hasonló hatása volt a $\Delta sodAB$ törzs esetén, mint a Δfur törzsnél, vagyis jelentősen lecsökkentette a ciprofloxacinnal rezisztens populációk frekvenciáját (**10. ábra**). Ez az eredmény arra utal, hogy a Δfur törzshöz hasonlóan a $\Delta sodAB$ törzs esetén is a mutációk megjelenése nagymértékben függ az intracelluláris szabad vas koncentrációjától. Azt feltételezzük, hogy mindkét törzs esetén a Fenton reakció felpörgetésén keresztül emelkedik meg a reaktív oxigéngyökök mennyisége és a Fe^{2+} elérhetősége jelentheti a korlátozó tényezőjét a reakciónak.

5.2.5. A megemelkedett intracelluláris vasszint és a ciprofloxacinnal okozta oxidatív stressz egymást erősítve járulnak hozzá a rezisztencia kialakulásához.

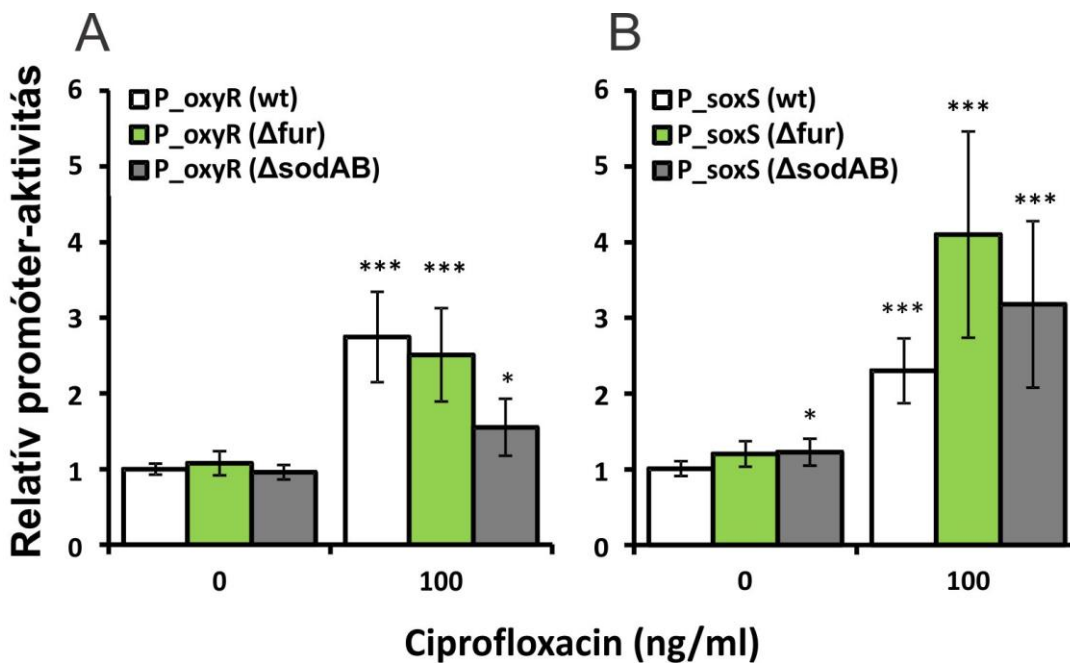
A Δfur és $\Delta sodAB$ törzsek további jellemzése céljából a dihidrorodamin123 (DHR) redox-érzékeny fluoreszcens festék segítségével megmértük a ciprofloxacinnal kezelés hatására (100 ng/ml) történő reaktív oxigéngyök-termelést. Ciprofloxacinnal kezelés hatására mindegyik törzs esetén szignifikánsan magasabb (~5x) fluoreszcenciajelet kaptunk a nem kezelt kontrollhoz képest (**14. ábra**), ami a ciprofloxacinnal reaktív oxigéngyök-termelést stimuláló hatását igazolja, egyezésben más munkákkal (Dwyer és mtsai., 2007; Kohanski és mtsai., 2007; Wang és mtsai., 2010).



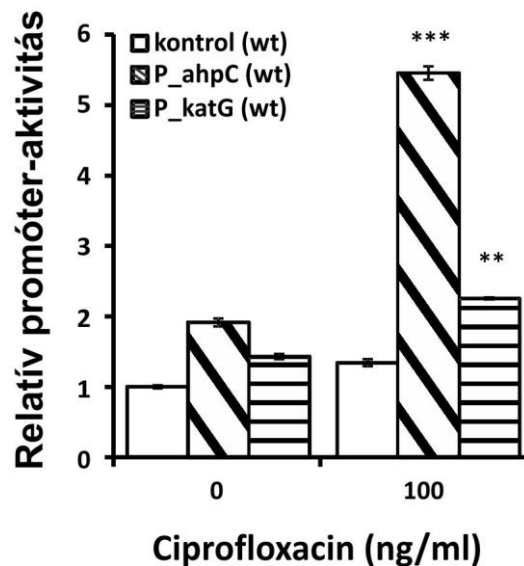
14. ábra. Reaktív oxigéngyökök felhalmozódása 100 ng/ml ciprofloxacin kezelés hatására vad típusú, Δfur és $\Delta sodAB$ törzsekben. Az oxidálódott dihidrorodamin123 (DHR) fluoreszcencia-intenzitásának mérése 24 órás ciprofloxacin kezelést követően történt. A kezeletlen vad típushoz viszonyított végső fluoreszcencia-intenzitásváltozások vannak ábrázolva a sejtek 600 nm-en mért optikai sűrűségével (OD600) való normalizálást követően. A hibaszávok három független kísérlet eredményéből számolt 95%-os konfidencia intervallumot jelölnek. *** = $P \leq 0.001$ (Két-mintás T-teszt).

Mivel a DHR nem alkalmas a különböző típusú reaktív oxigéngyökök elkülönítésére (Gomes és mtsai., 2005), második lépésben az oxidatív stresszválaszban szerepet játszó fontosabb fehérjék génjeinek promóter aktivitás változását vizsgáltuk meg 24 órás 100 ng/ml ciprofloxacin kezelés hatására, GFP-t expresszáló riporter plazmidok segítségével (Zaslaver és mtsai., 2006). A következő fehérjéket kódoló gének promóter aktivitását vizsgáltuk: a) a hidrogén peroxid által aktivált OxyR transzkripciós szabályozó fehérje, b) az OxyR által aktivált KatG és AhpC katalázok, c) valamint a szuperoxid által aktivált SoxS transzkripciós szabályozó fehérje (Farr és Kogoma, 1991; Park és mtsai., 2005).

Mindhárom törzs esetén ciprofloxacin kezelés hatására 2-5-szörös emelkedést tapasztaltunk az *oxyR* és *soxS* gének promóter-aktivitásában a kezeletlen kontrollokhoz viszonyítva (**15. ábra, A, B panelek**). A vad típusú törzsben ciprofloxacin kezelés hatására az *ahpC* gén promóter-aktivitása megemelkedett, míg a *katG*-é nem mutatott szignifikáns eltérést a kezeletlen kontrollhoz képest (**16. ábra**). Mivel a KatG kataláz a magas hidrogén peroxid-szint, míg az AhpC-t már igen kis koncentrációjú hidrogén peroxid is indukálja (Park és mtsai., 2005), arra következtettünk, hogy a 100 ng/ml ciprofloxacin kezelés alacsony mértékű peroxid-felhalmozódást okoz.



15. ábra. A ciprofloxacin által indukált oxidatív stressz mérése az *oxyR* és *soxS* gének promóteraktivitása alapján. Az *oxyR* (A), illetve *soxS* (B) gének promóter-aktivitásának változása 100 ng/ml ciprofloxacin kezelés hatására vad típusú, Δfur és $\Delta sodAB$ törzsekben. A promóter-aktivitást jelző GFP intenzitások mérése a ciprofloxacin kezelést megelőzően (0 időpontban) és 24 órával, 100 ng/ml ciprofloxacin kezelést követően történt. A kezeltlen vad típusú törzshöz viszonyított fluoreszcencia intenzitás-változások vannak ábrázolva. A hibaszívek három független kísérlet eredményéből számolt 95%-os konfidencia intervallumot jelölnek. * = $P \leq 0.05$, ** = $P \leq 0.01$, *** = $P \leq 0.001$ (Két-mintás T-teszt).

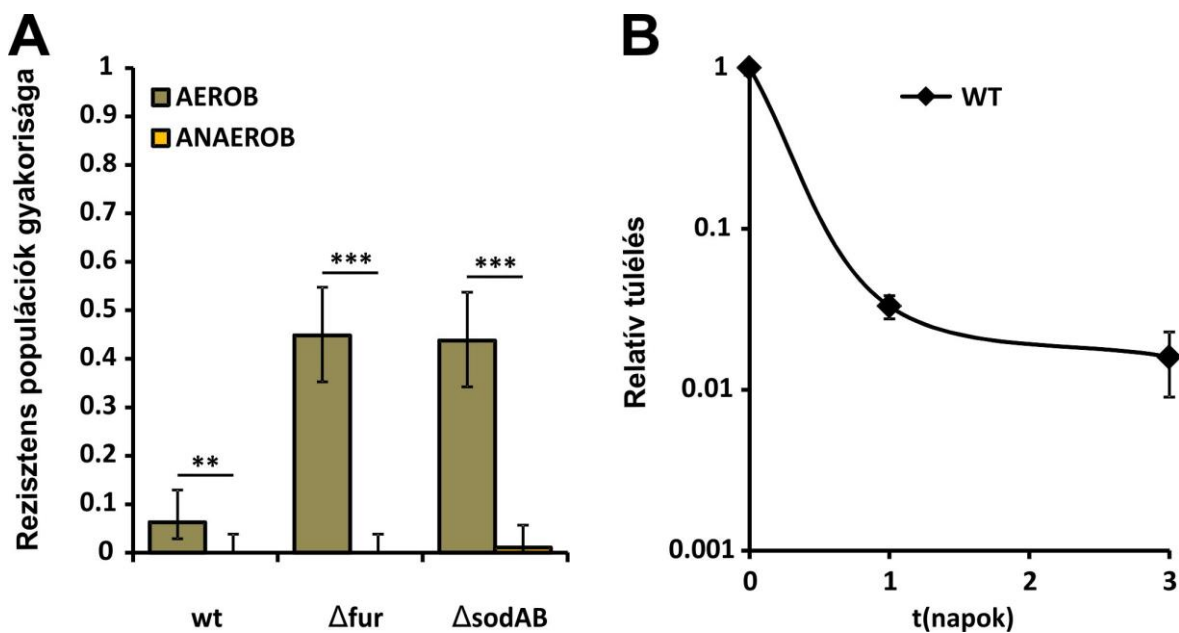


16. ábra. A ciprofloxacin által indukált oxidatív stressz mérése az OxyR által szabályozott *ahpC* és *katG* gének promóteraktivitása alapján. Az *ahpC* és *katG* gének promóter-aktivitásának változása 100 ng/ml ciprofloxacin kezelés hatására a vad típusú törzsekben. A promóter-aktivitást jelző GFP intenzitások mérése a ciprofloxacin kezelést megelőzően (0 időpontban) és 24 órával, 100 ng/ml ciprofloxacin kezelést követően történt. A promótermentes plazmidot tartalmazó, kezeltlen vad típusú törzshöz viszonyított fluoreszcencia intenzitás-változások vannak ábrázolva. A hibaszívek két független kísérlet eredményéből számolt 95%-os konfidencia intervallumot jelölnek. * = $P \leq 0.05$, ** = $P \leq 0.01$, *** = $P \leq 0.001$ (Két-mintás T-teszt).

Reaktív oxigéngyök-mérési eredményeink összességében azt mutatják, hogy az általunk alkalmazott ciprofloxacinnal történő kezelés az intracelluláris reaktív oxigéngyök-szintet enyhíti, de szignifikáns emelkedését váltja ki.

5.2.6. Az anaerob körülmények gátolják a rezisztencia kialakulását.

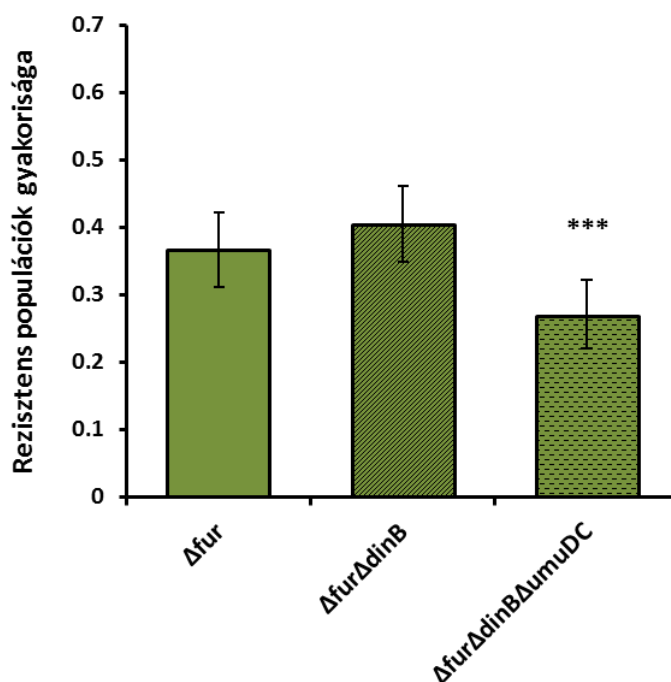
Anaerob körülmények között végzett evolúciós kísérletek keretében azt vizsgáltuk meg, hogy a Δfur és $\Delta sodAB$ törzsekre jellemző megemelkedett mutagenézis és evolvabilitás mennyire függ az oxigén jelenlététől. O_2 hiányában mindkét törzs esetén drasztikusan lecsökkent a ciprofloxacinnal szembeni rezisztens populációk megjelenési gyakorisága az aerob körülményekhez képest (17. ábra, A panel). A ciprofloxacinnal szembeni rezisztencia anaerob körülmények között is kifejezett öltető hatását (Malik és mtsai., 2007), mivel a 100 ng/ml koncentrációjú ciprofloxacinnal a vad típus esetén két nagyságrendnyi populációméret-csökkenést okozott 3 nap alatt anaerob körülmények között (17. ábra, B panel). A Δfur és $\Delta sodAB$ törzsek evolvabilitási képességének drasztikus csökkenése anaerob körülmények között arra utal, hogy a fokozott oxidatív mutagenézis aerob körülmények között nagymértékben hozzájárul a rezisztencia kialakulásához ezen törzsek esetében.



17. ábra. Az anaerob körülmény hatása a ciprofloxacinnal szembeni rezisztencia kialakulására. (A) Az anaerob körülmény hatása a ciprofloxacinnal szembeni rezisztens populációk megjelenési gyakoriságára a vad típusú, Δfur és $\Delta sodAB$ törzsek esetén összehasonlítva az aerob körülménnyel. A hibásávok arányból számolt 95%-os konfidencia intervallumot jelölnék. ** = $P \leq 0.01$, *** = $P \leq 0.001$ (Kví-négyzet próba). (B) A vad típusú törzs túlélése 100 ng/ml ciprofloxacinnal szemben anaerob körülmények között. A hibásávok 95%-os konfidencia intervallumot jelölnék.

5.2.7. A Δfur evolvabilitási képessége túlnyomórészt független a hibázásra hajlamos DNS polimerázok és a MutS fehérje aktivitásától.

A Pol IV (*dinB*) és Pol V (*umuDC*) hibázásra hajlamos DNS polimerázok központi szerepet töltenek be az SOS-függő stressz indukált mutagenézis folyamatában (Friedberg és mtsai., 2002), elősegítve az antibiotikumokkal szemben rezisztenciát biztosító mutációk megjelenését (Cirz és mtsai., 2005). A Pol IV polimeráznak kiemelt szerepe van az oxidált guanin (8-oxo-dGTP) DNS-be való beépítésében (Foti és mtsai., 2012). Mindezek fényében megvizsgáltuk, hogy ezen polimerázok aktivitása hozzájárul-e a Δfur törzsben tapasztalt megemelkedett mutagenézishez. Olyan Δfur alapú törzseket hoztunk létre, amelyekből a PolIV ($\Delta fur\Delta dinB$) vagy a PolIV és PolV is hiányzik ($\Delta fur\Delta dinB\Delta umuDC$). A ciprofloxacin rezisztens populációk megjelenési gyakorisága csak mindkét polimeráz hiánya esetén mutatott csökkenést a Δfur törzshöz viszonyítva (**18. ábra**). Pol IV hiányában a Δfur törzs megőrizte emelkedett evolvabilitási képességét ciprofloxacin jelenlétében (**18. ábra**). Ebből arra következtettünk, hogy a Δfur törzs esetén tapasztalt vasfüggő mutagenézis folyamatához a Pol IV és Pol V polimerázok aktivitása csak csekély mértékben járul hozzá.



18. ábra. A hibázásra hajlamos DNS polimerázok (Pol IV és Pol V) inaktíválásának hatása a ciprofloxacin rezisztens populációk megjelenési gyakoriságára Δfur háttéren. A hibasávok arányból számolt 95%-os konfidencia intervallumot jelölnék. *** = $P \leq 0.0001$ (Kí-négyzet próba).

Egyes irodalmi adatok szerint (Wyrzykowski és Volkert, 2003; Zhao és Winkler, 2000) a metilirányított DNS hibajavítás kis mértékben részt vesz a DNS oxidatív károsodásainak kijavításában is, csökkentve az oxidatív mutagenezist. Ugyanakkor kimutatták azt is, hogy stationer fázisban, illetve β -laktám antibiotikumok hatására a fent említett hibajavítás hatékonysága csökken a DNS hibák felismeréséért felelős MutS fehérje szintjének csökkenése következtében (Foster, 2007; Gutierrez és mtsai., 2013). Mindezek fényében megvizsgáltuk, hogy a MutS fehérjének van-e szerepe a vas közvetítette mutagenezis folyamatában a Δfur törzs esetén. Ehhez a MutS fehérjét egy magas kópiaszámú plazmidról túltermeltettük Δfur háttéren. A MutS-t túltermelő törzs esetén a ciprofloxacin rezisztens populációk frekvenciája nem tért el szignifikánsan a Δfur törzsétől (**12. ábra**). Ez arra utal, hogy a metilirányított DNS-hibajavítás átmenetileg csökkent hatékonysága nem játszik szerepet az oxidatív mutagenezis folyamatában a Δfur törzs esetén.

Eredményeink alapján a Δfur törzs emelkedett evolvabilitási képessége ciprofloxacin jelenlétében túlnyomórészt független a hibázásra hajlamos Pol IV és Pol V polimerázok aktivitásától. Emellett nem függ a metilirányított DNS hibajavító rendszer átmenetileg csökkent hatékonyságától sem. Azt feltételezzük, hogy a Δfur törzs esetén az oxidatív stressz eleve magas szintje a nukleotid raktárakban lévő nukleotidok oxidációjához (elsősorban 8-oxo-dGTP és 8-oxo-dATP keletkezéséhez) vezet (Nunoshiba és mtsai., 2002), és az oxidált nukleotidok nagy részét maga a Pol III replikatív DNS polimeráz építi be a DNS szálba (Yamada és mtsai., 2012). Mivel a metilirányított DNS hibajavítási rendszer oxidatív károsodásokat javító hatékonysága alacsony, a beépített hibás nukleotidok nem távolítódnak el, ami mutációk megjelenését eredményezi.

6. Az eredmények megvitatása

Az antibiotikum rezisztencia jelensége napjaink nagyon is aktuális és sürgető orvostudományi problémáját képviseli. A rezisztencia kialakulásának hátterében álló összetett mechanizmusok feltárása és megértése elengedhetetlen a rezisztens baktériumtörzsek megjelenését csökkentő stratégiák kidolgozása érdekében.

Munkánk során az alábbi két fő kérdésre kerestük a választ:

- 1) Vannak-e olyan nem esszenciális gének *E. coli* esetén, amelyek hiánya felgyorsítja a rezisztencia kialakulását letális dózisu antibiotikum alkalmazása esetén? Ha igen, ez milyen mechanizmus(ok) révén valósul meg?
- 2) Milyen szerepe van a vas-közvetített oxidatív stressznek, pontosabban az intracelluláris vasháztartásnak az antibiotikumokkal szembeni rezisztencia kialakulásában?

6.1. A baktériumsejt spontán mutációs rátáját növelő mechanizmusok elősegítik az antibiotikum rezisztencia kialakulását.

E. coli esetén több genom léptékű vizsgálat (Hansen és mtsai., 2008; Liu és mtsai., 2010; Nichols és mtsai., 2011) is született azoknak a nem esszenciális géneknek az azonosítása érdekében, amelyek inaktiválása megváltoztatja a baktérium antibiotikumokkal szembeni érzékenységét szubletális (MIC érték alatti) koncentráció alkalmazása esetén. Ezen vizsgálatok során azonosított gének alapvetően két fő kategóriába sorolhatóak, aszerint, hogy antibiotikum típusra specifikusan vagy több antibiotikummal szemben (pl. az efflux pumpákat (AcrAB, TolC) kódoló gének) változtatták meg a baktérium érzékenységét (Girgis és mtsai., 2009; Liu és mtsai., 2010). Azt azonban nem vizsgálták genom szinten, hogy mely gének befolyásolják a rezisztencia *de novo* kialakulását. Ezért elvégeztünk egy genom szintű szűrést azon nem esszenciális gének azonosítására, amelyek hiánya elősegíti az alkalmazkodást letális dózisu ciprofloxacinhoz.

A genom léptékű vizsgálat eredményeként öt olyan gént azonosítottunk, amelyek delécioja jelentősen megnövelte a ciprofloxacinnal szembeni rezisztens populációk megjelenési gyakoriságát a vad típushoz képest. A kódolt fehérje funkciója szempontjából az azonosított gének három különböző kategóriába sorolhatóak: 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. Meglepő módon a $\Delta mutS$, $\Delta mutL$ és $\Delta mutH$ mutátor törzsekhez hasonló más erős mutátor törzseket (pl. $\Delta mutT$, $\Delta mutD$, $\Delta uvrD$) (Chopra és mtsai., 2003) nem azonosítottunk a vizsgálat során. Spekulációink szerint ennek hátterében a különböző mutátor törzsek eltérő mutációs spektruma, illetve megnövekedett ciprofloxacinnal szembeni rezisztencia kialakulásához meghatározott típusú bázisszubsztitúciók szükségesek, amelyeket csak meghatározott mutációs spektrummal rendelkező mutátor törzsek képesek generálni.

Ugyancsak meglepő módon nem azonosítottunk olyan géneket (pl. *acrR*, *ompF*, *marR*), amelyek hiánya szubletális antibiotikum-dózis alkalmazása esetén megnövekedett túlélést biztosítana (Girgis és mtsai., 2009). Ez arra enged következtetni, hogy eltérő, vagy csak részben átfedő mechanizmusok biztosítják a szubletális, illetve letális koncentrációjú antibiotikumokhoz való evolúciós alkalmazkodást. Letális dózis alkalmazása esetén azok a genotípusok fognak túlélni és elterjedni a populációban, amelyek leggyorsabban képesek előnyös, rezisztenciát biztosító mutációkat generálni. Ennek pedig a legegyszerűbb módja az összmutációs ráta megemelése (Chopra és mtsai., 2003; Miller és mtsai., 2004b).

Az általunk végzett genom szintű szűrés eredményei összességében rávilágítanak a megemelkedett mutációs rátával rendelkező genotípusok jelentős szerepére a letális dózissal szembeni rezisztencia kialakulásában. Eredményeink közvetlenül egybevágóak azoknak a munkáknak az eredményeivel, amelyek más baktériumfajok esetén is kimutatták a metilirányított DNS hibajavításban deficiens mutátor genotípusok szerepét az antibiotikumokkal szembeni rezisztencia kialakulásában (Chopra és mtsai., 2003; Gould és mtsai., 2007; Wiegand és mtsai., 2008a). A megemelkedett mutáció generáló tulajdonságuknak köszönhetően a mutátorok lehetővé teszik a különböző stresszkörülményekhez való gyors alkalmazkodást a természetben illetve laboratóriumi és klinikai körülmények között egyaránt (Denamur és mtsai., 2002; LeClerc és mtsai., 1996; Matic és mtsai., 1997; Oliver és mtsai., 2000). Ezáltal kiemelkedő szerepet töltenek be a mikrobiális evolúcióban (Sniegowski és mtsai., 1997; Taddei és mtsai., 1997).

6.2. A vas-közvetített oxidatív stressz szerepe az antibiotikum rezisztencia kialakulásában.

6.2.1. A vas-egyensúly felbomlása elősegíti a rezisztencia kialakulását letális koncentrációjú ciprofloxacinnal szemben.

Az általunk végzett genom szintű keresés során azonosított gének között jelen volt a vas-egyensúly központi szabályozó fehérjéjét kódoló *fur* gén is, ami az intracelluláris vas-homeosztázis és az antibiotikum rezisztencia közti kapcsolatra irányította figyelmünket. Kimutattuk, hogy a vas-egyensúly felbomlása a Fur szabályozó fehérje hiányából adódóan jelentős adaptációs előnyt biztosít toxikus koncentrációjú ciprofloxacinnal szemben. A laboratóriumi evolúciós kísérletek során a Δfur törzs esetén a rezisztens populációk megjelenési gyakorisága átlagosan tízszer magasabb volt, mint a vad típus esetén. A túlélési vizsgálatok eredményei igazolták, hogy a Δfur törzs nem rendelkezik megemelkedett túléléssel ciprofloxacinnal szemben, tehát emelkedett evolvabilitási képessége nem a megváltozott túlélésből adódik.

6.2.2. Ciprofloxacinnal szembeni hatására átrendeződik a Fur regulon.

Stressz hiányában a Δfur törzs vad típushoz viszonyított mutációs rátabeli eltérése egy nagyságrenden belül van, ami nem magyarázhatja teljes mértékben a ciprofloxacinnal szemben mutatott magas evolvabilitási képességét. A transzkriptomikai elemzés eredményei alapján a Δfur törzsben ciprofloxacinnal szembeni hiányában és jelenlétében együttesen nagyszámú gén (221) expressziója változott meg specifikusan a vad típushoz viszonyítva. Alacsony volt azonban azon gének aránya, amelyek expressziója ciprofloxacinnal szembeni hiányában és jelenlétében is megváltozott. Ez arra enged következtetni, hogy ciprofloxacinnal szembeni hatására a Δfur törzsben egy jelentős génexpressziós átrendeződés történik. A genotípus-környezet (Δfur – ciprofloxacinnal szembeni kezelés) kölcsönhatásra specifikus expressziós változást mutató gének közül az indukálódottak három funkcionális kategóriába sorolhatóak: 1) vasfelvétel, 2) siderofór bioszintézis és 3) Fe-S kockák összeszerelése. Ezek közül a vasfelvételen szerepet játszó gének képviselték a döntő többséget. Ennek alapján azt feltételeztük, hogy a Δfur

törzs emelkedett evolvabilitási képessége ciprofloxacin jelenlétében a vasfelvételt szabályozó szerepével hozható összefüggésbe.

6.2.3. Az intracelluláris szabad vastartalom kulcsfontosságú szerepet tölt be a ciprofloxaccinnal szembeni rezisztencia kialakulásában.

A Δfur mutánst a konstitutív vasfelvételnek köszönhetően megemelkedett intracelluláris szabad vastartalom jellemzi (Hantke, 1982; Touati és mtsai., 1995). Ez utóbbi a hidroxil-gyök generáló Fenton reakció "táplálásán" keresztül megemelkedett oxidatív stressz-szintet eredményez, ami mutagén vagy/és letális hatású lehet a sejt számára. Ennek tulajdonítható az, hogy a Δfur törzset O_2 jelenlétében emelkedett spontán mutációs ráta és működőképes rekombinációs mechanizmusok hiányában, életképtelenség jellemzi (Touati és mtsai., 1995). Kimutattuk, hogy a sziderofórhoz kötött Fe^{3+} -felvétel gátlásával a *tonB* gén kiütésén keresztül jelentősen csökkenthető a ciprofloxacin rezisztens populációk megjelenési gyakorisága *fur* deléciós háttéren. Az ExbB-ExbD-TonB fehérjekomplex részét képező TonB fehérje, energiaátalakító szerepének köszönhetően esszenciális a sziderofórhoz kötött vas felvételéhez. Ciprofloxacin jelenlétében végzett túlélési vizsgálatokkal igazoltuk, hogy a $\Delta fur\Delta tonB$ törzs nem mutat csökkent túlélést ciprofloxacin jelenlétében a Δfur törzshöz képest, ellentétben a *Pseudomonas aeruginosa*-n végzett vizsgálatokkal, ahol a *tonB* gén kiütése megnövekedett érzékenységet okozott több antibiotikummal szemben (Zhao és mtsai., 1998). Az *E. coli* $\Delta fur\Delta tonB$ törzs esetén tehát a rezisztens populációk megjelenési gyakorisága azért volt alacsonyabb, mert TonB hiányában gátolt volt a vasfelvétel és az intracelluláris szabad vastartalom nem emelkedett meg.

Ellentétben a szabad vas emelkedett koncentrációjával, a raktározott vas mennyisége alacsonyabb a Δfur mutánsban, mint a vad típusban (Abdul-Tehrani és mtsai., 1999). Kimutattuk, hogy nemcsak a vasfelvétel gátlásával, hanem a vasraktározás fokozásával is csökkenthető a rezisztencia kialakulása Δfur háttéren. Az *E. coli* két fő vasraktározó fehérjéjének (FtnA és Bfr) a túltermeltetése jelentősen lecsökkentette a ciprofloxacin rezisztens populációk megjelenési gyakoriságát.

Az intracelluláris szabad vas koncentrációja „mesterséges” úton is csökkenthető a szabad vasat megkötő vaskelátorok segítségével. Kimutattuk, hogy a membrán-permeábilis o-

fenantrolin vaskelátor alkalmazásával nagymértékben gátolható a rezisztencia kialakulása. A vaskelátor alkalmazása a ciprofloxacín kezelés során, drasztikusan lecsökkentette a rezisztens populációk megjelenési gyakoriságát. Ez az eredmény potenciálisan utat nyithat kiegészítő antimikrobiális terápiák kifejlesztése felé, amelyek az intracelluláris szabad vastartalom minimalizálásán keresztül csökkentik a rezisztencia kialakulásának esélyét.

Az intracelluláris, Fenton reakció számára elérhető szabad vas mennyiségét befolyásolhatja az a vas is, amely különböző stressztényezők (pl. oxidatív stressz) hatására a vastartalmú fehérjékből szabadul fel. Az aerob légzés melléktermékeként keletkező szuperoxid (Imlay és Fridovich, 2009) oxidálhatja az oxidációra érzékeny Fe-S tartalmú dehidratázokat, ami az instabillá vált Fe-S kockákból felszabaduló vasnak (Fe^{2+}) köszönhetően az intracelluláris szabad vaskoncentráció megemelkedését eredményezi (Flint és mtsai., 1993; Keyer és Imlay, 1996). A szuperoxid hatástalanításában deficiens ΔsodAB törzs a Fur deficiens törzshöz hasonlóan O_2 jelenlétében megemelkedett spontán mutációs rátával rendelkezik (Farr és mtsai., 1986). Kimutattuk, hogy a Δfur törzshöz hasonlóan, a ΔsodAB törzset is megemelkedett evolvabilitási képesség jellemzi ciprofloxacín jelenlétében, mivel a vad típushoz képest jelentősen magasabb (átlagosan 40%-os) gyakorisággal képez rezisztens populációkat. A vasszabályozás gátlásával a *tonB* gén kiütésén keresztül a ΔsodAB törzs esetében is jelentősen csökkenthető volt a rezisztens populációk megjelenési gyakorisága. Ez arra utal, hogy a megemelkedett szuperoxid koncentráció mutagén és rezisztencia kialakulását felgyorsító hatása függ a vasszabályozás által meghatározott intracelluláris szabad vas koncentrációjától.

Eredményeink összességében azt mutatják, hogy a vas homeosztázis zavara megnöveli a ciprofloxacinnal szembeni rezisztencia kialakulásának a gyakoriságát. Az intracelluláris szabad vastartalom szabályozásán keresztül befolyásolható volt a rezisztencia alakulása. Gátolva az extracelluláris vasszabályozást, serkentve az intracelluláris vasszabályozást vagy vaskelátor alkalmazásával minimalizálva a szabad vas koncentrációját, csökkenthető volt a ciprofloxacín rezisztens populációk megjelenése a Δfur törzs esetében. Ez arra utal, hogy az elérhető vas mennyisége jelenti a legfontosabb limitáló tényezőt a Fenton reakcióban, és ebből kifolyólag az oxidatív mutagenézis folyamatában is. Ugyanakkor, a megemelkedett szuperoxid- és vaskoncentráció egymás hatását erősítve járulnak hozzá az oxidatív stressz közvetítette mutagenézishoz (Nunoshiba és mtsai., 1999, 2002) és a rezisztencia kialakulásához.

6.2.4. A megemelkedett intracelluláris vastartalom és a ciprofloxacinnal indukált oxidatív stressz egymást erősítve járulnak hozzá a rezisztencia kialakulásához.

Néhány éve bevezetett modell értelmében a baktericid antibiotikumok oxidatív stresszt indukálnak, ami jelentősen hozzájárul az ölü hatásukhoz. (Dwyer és mtsai., 2007; Foti és mtsai., 2012; Kohanski és mtsai., 2007, 2010a). Ennek alapján ciprofloxacinnal jelenlétében a Δfur törzs esetében a magas intracelluláris vaskoncentráció okozta oxidatív stressz mértékét tovább emelik a ciprofloxacinnal indukált reaktív oxigén gyökök. A közelmúltban megjelent néhány publikáció (Keren és mtsai., 2013; Liu és Imlay, 2013; Paulander és mtsai., 2014) azonban megkérdőjelezte a reaktív oxigén gyökök szerepét a baktericid antibiotikumok ölü hatásában. Mindezek ismeretében felvetődik a kérdés, hogy az antibiotikumok által indukált oxidatív stressz milyen erősségű, és, hogy valóban hozzájárul-e az ölü hatáshoz vagy inkább a mutagenezist segíti elő.

Reaktív oxigén gyök-mérési eredményeink megerősítették azt a modellt, mely szerint a baktericid antibiotikumok oxidatív stresszt generálnak. Az általunk alkalmazott koncentrációjú ciprofloxacinnal az intracelluláris reaktív oxigén gyök szint enyhe, de szignifikáns emelkedést váltotta ki. A ciprofloxacinnal tehát valóban hozzájárul az oxidatív stressz szintjének megemeléséhez.

Ciprofloxacinnal kezelés hatására a három vizsgált genotípus (Δfur , $\Delta sodAB$ és vad típus) esetén megközelítőleg azonos reaktív oxigén gyök szintet mértünk. A várttal ellentétben csak enyhe emelkedés volt tapasztalható a Δfur és $\Delta sodAB$ törzsekben a vad típushoz viszonyítva. Mivel egy adott időpontban mért reaktív oxigén gyökök szintjét a képződésük és a biomolekulák általi redukálódásuk közti egyensúly határozza meg, azt feltételezzük, hogy a Δfur és $\Delta sodAB$ törzsek esetén egyaránt a megemelkedett szabad vasszint eltolja a Fenton reakció kinetikáját a vad típushoz képest. Úgy gondoljuk, hogy ezekben a törzsekben a rendelkezésre álló több szabad vas hosszabb ideig képes táplálni a Fenton reakciót, szinte folyamatos reaktív oxigén gyök-képződést eredményezve. A képződő oxigén gyökök ugyanakkor folyamatosan oxidálják a hozzáférhető biomolekulákat, köztük a DNS-t, ami miatt szintjük adott időpontban nem tér el jelentősen a vad típusban mért szinttől.

6.2.5. A Δfur törzs emelkedett evolvabilitási képessége O_2 -függő.

Mivel eredményeink azt mutatták, hogy a Δfur és $\Delta sodAB$ törzsek emelkedett evolvabilitási képességének háttérében a megemelkedett vasfüggő oxidatív mutagenézis áll, megvizsgáltuk, hogy az O_2 hiánya megváltoztatja-e ezen törzsek evolvabilitási képességét ciprofloxacinn jelenlétében. Az aerob környezetben végzett evolúciós kísérletek eredményeivel szöges ellentétben, anaerob körülmények között mind a Δfur , mind a $\Delta sodAB$ törzs evolvabilitási képessége drasztikusan lecsökkent. A Δfur törzs esetén a rezisztensek száma a vad típuséhoz hasonló módon nullára csökkent. A rezisztensek számában tapasztalt nagymértékű eltérés aerob és anaerob körülmények között nem adódhat a ciprofloxacinn csökkent öléképességéből anaerob körülmények között, mivel egyike azon fluorokinolon antibiotikumoknak, amelyek anaerob körülmények között is megőrzik ölé hatásukat (Malik és mtsai., 2007; Wang és mtsai., 2010).

Az anaerob kísérleti eredmények megerősítették azt, hogy a Δfur és $\Delta sodAB$ törzsek esetében a vasfüggő oxidatív mutagenézis emelkedett szintje nagymértékben hozzájárul a rezisztencia kialakulásához. Transzkriptomikai vizsgálatokkal lehetne részletesebb képet kapni arról, hogy anaerob körülmények között az oxigénfüggő mutagenézis hiányán kívül milyen más tényezők járulnak hozzá a rezisztencia kialakulásának drasztikus csökkenéséhez.

6.2.6. A Δfur evolvabilitási képessége túlnyomórészt független a hibázásra hajlamos DNS-polimerázok és a MutS fehérje aktivitásától.

Az SOS stresszválaszban központi szerepet játszó Pol IV és Pol V magas hibaszázalékú polimerázoknak mutáció generáló aktivitásuknak köszönhetően kulcsfontosságú szerepet tulajdonítottak az antibiotikumokkal szembeni rezisztencia kialakulásában (Cirz és Romesberg, 2006, 2007). Ugyanakkor a Pol IV polimeráz kiemelt szereppel bír a baktericid antibiotikumok által indukált oxidatív stressz ölé hatásának megnyilvánulásában, azáltal, hogy hatékonyan képes beépíteni a DNS-be az oxidált guanint (8-oxo-dGTP-t) (Foti és mtsai., 2012). Mindezek ismeretében megvizsgáltuk, hogy ezen polimerázok aktivitása hozzájárul-e a Δfur törzs emelkedett evolvabilitási képességéhez. Meglepő módon, eredményeink azt mutatták, hogy a Pol IV polimeráz hiánya nem befolyásolja szignifikáns módon a rezisztens

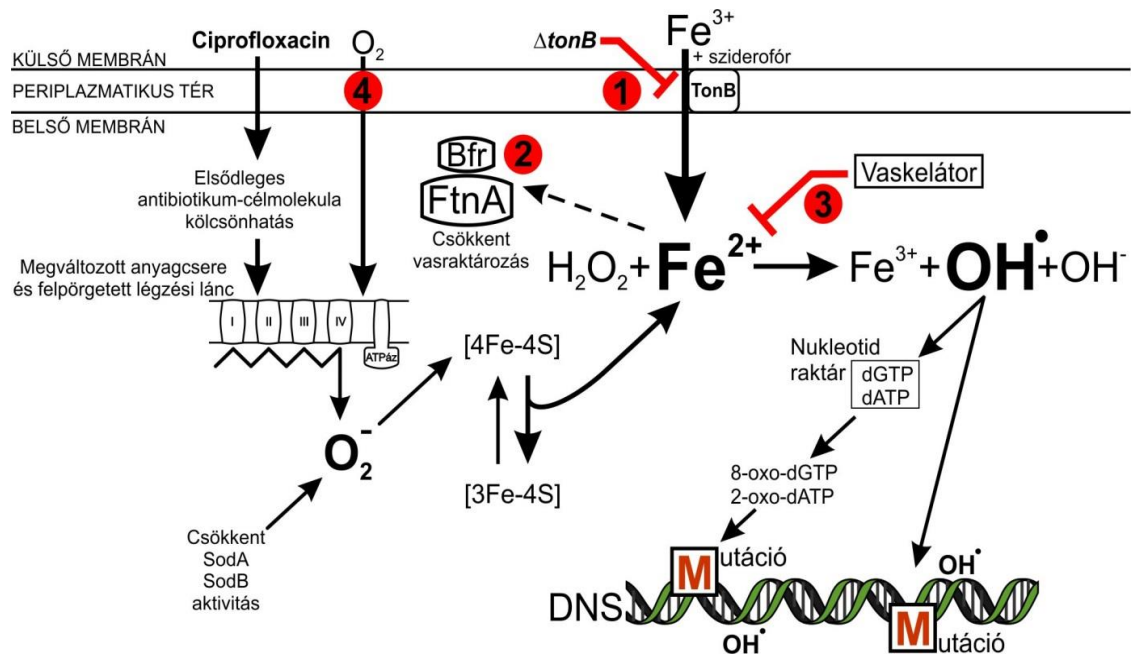
populációk megjelenési gyakoriságát Δfur háttéren. Mindkét polimeráz hiánya enyhe csökkenést eredményezett a megjelenő rezisztens populációk számában.

Ez arra enged következtetni, hogy a Δfur mutánsban a Pol IV és Pol V polimerázok mutáció generáló aktivitása csak kis mértékben járul hozzá a vasfüggő oxidatív mutagenézis folyamatához, vagy szerepüket átveheti más polimeráz is. Utóbbi feltevést támasztja alá az, hogy a Pol III replikatív polimeráz is magas gyakorisággal képes 8-oxo-dGTP-t beépíteni adeninnel szemben (Yamada és mtsai., 2012). Ezáltal a hibázásra hajlamos DNS-polimerázok hiányában is megvalósulhat az oxidált nukleotidok hibás beépítése, és ennek következményeként a pontmutációk megjelenése. Eredményeink egybevágóan azzal, hogy a 8-oxo-dGTP-t hidrolízisében deficiens $\Delta mutT$ mutátor törzs esetén csak a Pol I, Pol II, Pol IV és Pol V polimerázok együttes kiütésének volt jelentős mutációs ráta-csökkentő hatása, a páronkénti kiütések nem befolyásolták jelentős módon a spontán mutációs rátát (Yamada és mtsai., 2012).

A metilirányított DNS hibajavító rendszer kis mértékben részt vesz a DNS oxidatív károsodásainak kijavításában is (Wyrzykowski és Volkert, 2003; Zhao és Winkler, 2000), viszont a hibajavítás hatékonysága stacioner fázisban valamint β -laktám antibiotikumokkal való kezelés hatására jelentősen lecsökken a MutS fehérje szintjének csökkenése miatt (Foster, 2007; Gutierrez és mtsai., 2013). Azt feltételeztük, hogy ha a MutS fehérje szintjének csökkenése szerepet játszik a vas közvetítette mutagenézis folyamatában, akkor a fehérje túltermeltetése csökkenteni fogja a rezisztens populációk kialakulási gyakoriságát Δfur háttéren. A MutS fehérje szerepe a vasfüggő mutagenézis folyamatában nem igazolódott, mivel magas kópiaszámú plazmidról való túltermeltetésének nem volt szignifikáns hatása a rezisztens populációk megjelenésére ciprofloxacinnal történő kezelés esetén.

Eredményeink alapján úgy véljük, hogy a Δfur törzs esetén a nukleotid raktárakban lévő nukleotidok folyamatosan károsodnak, és a DNS replikáció során a Pol III polimeráz ezeket az oxidált nukleotidokat is beépíti a DNS szálba. Mivel a metilirányított DNS-hibajavítási rendszer alacsony hatékonysággal képes javítani az oxidatív károsodásokat, a hibásan beépített nukleotidok nem távolítódnak el, és mutációkat eredményeznek.

A vas közvetítette oxidatív mutagenézis antibiotikum rezisztencia kialakulásában betöltött szerepére vonatkozó eredményeinket **19. ábrán** foglaltuk össze.



19. ábra. A Δfur törzsre jellemző vas-közvetített oxidatív mutagenézis sematikus modellje letális dózisu ciprofloxacinnal való kezelés esetén. Az elsődleges antibiotikum-célmolekula (ciprofloxacin-DNS giráz) kölcsönhatás eredményeként változások következnek be a baktériumsejt anyagcseréjében és a légzési láncban egyaránt. Az elektrontranszportlánc felpörgése serkenti a szuperoxid (O_2^-) képződését. A szuperoxid diszmutázok (SodA és SodB) csökkent aktivitása tovább növeli az intracelluláris szuperoxid szintjét. A szuperoxid károsítja a Fe-S tartalmú fehérjék Fe-S kockáit, ami a Fenton-reaktív Fe^{2+} felszabadulását eredményezi. A siderofór-közvetített konstitutív Fe^{3+} -felvétel és a csökkent vasraktározó aktivitás, az antibiotikum által közvetített vasszabaddal együtt az intracelluláris vasszint megemelkedéséhez vezet. A Fe^{2+} oxidációja a Fenton reakció során a rendkívül reaktív hidroxilgyök (OH^\bullet) képződését eredményezi, ami károsíthatja a nukleotidokat és a DNS-t, mutációk keletkezéséhez vezetve. Az ábrán feltüntetett számok olyan „beavatkozási” pontokat jelölnek, amelyeken keresztül a ciprofloxacin rezisztencia kialakulásának esélye jelentősen csökkenthető volt: 1) a siderofór-közvetített vasszabaddal való felvétel gátlása a *tonB* kiütése által, 2) a vasraktározás fokozása az FtnA és Bfr vasraktározó fehérjék túlermelletése révén, 3) az intracelluláris szabad vas megkötése a fenantrolin vaskelátor által, 4) anaerob körülmények.

7. Gyakorlati következtetések

Eredményeink alapján az intracelluláris vas-homeosztázis szabályozása jelentős mértékben befolyásolja a ciprofloxacinnal szembeni rezisztencia evolúcióját. A vas-homeosztázis felbomlásából adódó intracelluláris vastöbblet és a ciprofloxacinnal indukált oxidatív stressz együttesen járul hozzá a rezisztencia kialakulásához, az oxidatív mutagenézisen keresztül. Eredményeink azt mutatják, hogy az intracelluláris szabad vas koncentrációjának minimalizálásával jelentős mértékben csökkenthető a rezisztencia kialakulásának esélye. A fenantrolin vaskelátor alkalmazásának gátló hatása a rezisztencia kialakulására biztató eredmény és kiegészítő antimikrobiális terápia kifejlesztésének irányába nyithat utat.

Eredményeink arra utalnak, hogy az antibiotikumok által indukált oxidatív stressz fokozása, amit más munkák javasolnak, nem megfelelő stratégia az antibiotikumok hatékonyságának növelésére, mivel a reaktív oxigénradikálok mutagenézisben betöltött szerepe hangsúlyosabb az ölő hatásnál. Mivel kísérleteinket csupán a minimális gátló koncentráció hatszorosának megfelelő ciprofloxacinnal végeztük, fontos lenne megvizsgálni, hogy a mutagén hatás magasabb koncentráció esetében is erősebb-e a sejtölő hatásnál.

Munkánk folytatását jelenthetné az, ha betegekből izolált ciprofloxacinnal rezisztens *E. coli* vonalakat szekvenálással megvizsgálánk, hogy tartalmazzak-e mutációkat a *fur* génben vagy a vasháztartásban szerepet játszó más génekben. Erre vonatkozó irodalmi adatokat nem találtunk, de ez abból is adódhat, hogy a rezisztens vonalak genotipizálása során jellemző módon az antibiotikum célmolekulájában megjelenő mutációkra összpontosítanak. Cisztás fibrózisban szenvedő betegek tüdejéből azonban izoláltak olyan antibiotikum rezisztens *Pseudomonas aeruginosa* vonalakat, amelyek funkcióvesztéses mutációkat hordoztak az oxidatív károsodásokat javító rendszer MutT és MutY enzimeinek génjeiben (Mandsberg et al., 2009). Ez utóbbi eredmény rávilágít az oxidatív mutagenézis rezisztencia kialakulását elősegítő hatására klinikai szinten is.

Köszönetnyilvánítás

Először is szeretném megköszönni témavezetőmnek *Dr. Pál Csabának* a lehetőséget, hogy a csoportjában dolgozhattam és, hogy stabil munkakörnyezetet teremtett. Hálásan köszönöm, hogy témavezetőként irányította utamat, tanított és támogatott. Számtalan hasznos tanáccsal és ötlettel látott el munkám során, nagyon sokat tanulhattam tőle. Köszönöm a dolgozat megírásához nyújtott segítségét is.

Külön köszönet illeti *Dr. Bogos Balázst*, akitől nagyon sokat tanulhattam az évek során. Hálásan köszönöm, hogy bármikor fordulhattam hozzá kérdésekkel és, hogy mindig türelmesen megválaszolta azokat. Köszönöm számos hasznos tanácsát és ötleteit, hozzájárulását és segítségét a munkámhoz, és a dolgozat megírásához.

Köszönöm *Dr. Csörgő Bálintnak*, *Pál Ferencnek* és *Nyerges Ákosnak* a munkámhoz nyújtott segítségét.

Köszönöm a Kísérleti Evolúcióbiológiai Csoport és a Számítógépes Rendszerbiológiai Csoport minden tagjának a segítségét. Külön köszönöm *Tóth Andreának* a munkámhoz nyújtott segítségét és azt, hogy kellemes és vidám munkakörnyezetet teremtett a laborban. Köszönöm az MTA SzBK, Biokémiai Intézetének a doktori tanulmányaimhoz nyújtott anyagi támogatást.

Köszönöm *Dr. Kiss Antalnak* és *Dr. Olasz Ferencnek*, hogy elvállalták a dolgozatom bírálatát és hasznos kritikáikkal és megjegyzéseikkel hozzájárultak a dolgozat értékének növeléséhez.

Végtelenül hálás vagyok édesanyámnak, hogy mindig mellettem állt, támogatott és biztatott. Köszönöm *Vass Istvánnak* az ábrák elkészítéséhez nyújtott segítségét, de legfőképp azt, hogy mellettem állt és bátorított. Végül, de nem utolsósorban köszönöm barátaimnak, elsősorban *Stier Ildikónak*, *Burcin Güngörnek* és *Begüm Pekselnek* az együttérzést és támogatást.

Szakirodalmi hivatkozások

- Abdul-Tehrani, H., Hudson, A.J., Chang, Y.-S., Timms, A.R., Hawkins, C., Williams, J.M., Harrison, P.M., Guest, J.R., and Andrews, S.C. (1999). Ferritin Mutants of *Escherichia coli* Are Iron Deficient and Growth Impaired, and *fur* Mutants are Iron Deficient. *J. Bacteriol.* *181*, 1415–1428.
- Adriaenssens, N., Coenen, S., Versporten, A., Muller, A., Minalu, G., Faes, C., Vankerckhoven, V., Aerts, M., Hens, N., Molenberghs, G., et al. (2011). European Surveillance of Antimicrobial Consumption (ESAC): outpatient quinolone use in Europe (1997–2009). *J. Antimicrob. Chemother.* *66*, vi47–vi56.
- Alekshun, M.N., and Levy, S.B. (2007). Molecular Mechanisms of Antibacterial Multidrug Resistance. *Cell* *128*, 1037–1050.
- Allen, H.K., Donato, J., Wang, H.H., Cloud-Hansen, K.A., Davies, J., and Handelsman, J. (2010). Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nat Rev Micro* *8*, 251–259.
- Andersson, D.I., and Levin, B.R. (1999). The biological cost of antibiotic resistance. *Curr. Opin. Microbiol.* *2*, 489–493.
- Andersson, D.I., Koskiniemi, S., and Hughes, D. (2010). Biological roles of translesion synthesis DNA polymerases in eubacteria. *Mol. Microbiol.* *77*, 540–548.
- Andrews, S.C. (1998). Iron Storage in Bacteria. In *Advances in Microbial Physiology*, R.K. Poole, ed. (Academic Press), pp. 281–351.
- Andrews, S.C., Robinson, A.K., and Rodríguez-Quñones, F. (2003). Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol. Rev.* *27*, 215–237.
- Anjem, A., and Imlay, J.A. (2012). Mononuclear Iron Enzymes Are Primary Targets of Hydrogen Peroxide Stress. *J. Biol. Chem.* *287*, 15544–15556.
- Åslund, F., Zheng, M., Beckwith, J., and Storz, G. (1999). Regulation of the OxyR transcription factor by hydrogen peroxide and the cellular thiol—disulfide status. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *96*, 6161–6165.
- Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K.A., Tomita, M., Wanner, B.L., and Mori, H. (2006). Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol. Syst. Biol.* *2*.
- Bagel, S., Hullen, V., Wiedemann, B., and Heisig, P. (1999). Impact of *gyrA* and *parC* Mutations on Quinolone Resistance, Doubling Time, and Supercoiling Degree of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* *43*, 868–875.
- Balaban, N.Q., Gerdes, K., Lewis, K., and McKinney, J.D. (2013). A problem of persistence: still more questions than answers? *Nat. Rev. Microbiol.* *11*, 587–591.
- Barry, A.L., Jones, R.N., Thornsberry, C., Ayers, L.W., Gerlach, E.H., and Sommers, H.M. (1984). Antibacterial activities of ciprofloxacin, norfloxacin, oxolinic acid, cinoxacin, and nalidixic acid. *Antimicrob. Agents Chemother.* *25*, 633–637.
- Belenky, P., Camacho, D., and Collins, J.J. (2013). Fungicidal Drugs Induce a Common Oxidative-Damage Cellular Death Pathway. *Cell Rep.* *3*, 350–358.
- Bell, G. (1997). *Selection: The Mechanism of Evolution* (Springer).

- Bjedov, I., Tenailon, O., Gerard, B., Souza, V., Denamur, E., Radman, M., Taddei, F., and Matic, I. (2003). Stress-Induced Mutagenesis in Bacteria. *Science* *300*, 1404–1409.
- Boyle, E.I., Weng, S., Gollub, J., Jin, H., Botstein, D., Cherry, J.M., and Sherlock, G. (2004). GO::TermFinder--open source software for accessing Gene Ontology information and finding significantly enriched Gene Ontology terms associated with a list of genes. *Bioinforma. Oxf. Engl.* *20*, 3710–3715.
- Braun, V. (1995). Energy-coupled transport and signal transduction through the Gram-negative outer membrane via TonB-ExbB-ExbD-dependent receptor proteins. *FEMS Microbiol. Rev.* *16*, 295–307.
- Brown, S.A. (1996). Fluoroquinolones in animal health. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* *19*, 1–14.
- Cadet, J., Delatour, T., Douki, T., Gasparutto, D., Pouget, J.-P., Ravanat, J.-L., and Sauvaigo, S. (1999). Hydroxyl radicals and DNA base damage. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* *424*, 9–21.
- Calabrese, E.J., and Baldwin, L.A. (2002). Defining hormesis. *Hum. Exp. Toxicol.* *21*, 91–97.
- Camon, E., Magrane, M., Barrell, D., Lee, V., Dimmer, E., Maslen, J., Binns, D., Harte, N., Lopez, R., and Apweiler, R. (2004). The Gene Ontology Annotation (GOA) Database: sharing knowledge in Uniprot with Gene Ontology. *Nucleic Acids Res.* *32*, D262–D266.
- Chen, C.-R., Malik, M., Snyder, M., and Drlica, K. (1996). DNA Gyrase and Topoisomerase IV on the Bacterial Chromosome: Quinolone-induced DNA Cleavage. *J. Mol. Biol.* *258*, 627–637.
- Chiancone, E., and Ceci, P. (2010). The multifaceted capacity of Dps proteins to combat bacterial stress conditions: Detoxification of iron and hydrogen peroxide and DNA binding. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* *1800*, 798–805.
- Chopra, I., O'Neill, A.J., and Miller, K. (2003). The role of mutators in the emergence of antibiotic-resistant bacteria. *Drug Resist. Updat.* *6*, 137–145.
- Cirz, R.T., and Romesberg, F.E. (2006). Induction and Inhibition of Ciprofloxacin Resistance-Confering Mutations in Hypermutator Bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* *50*, 220–225.
- Cirz, R.T., and Romesberg, F.E. (2007). Controlling mutation: intervening in evolution as a therapeutic strategy. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* *42*, 341–354.
- Cirz, R.T., Chin, J.K., Andes, D.R., de Crécy-Lagard, V., Craig, W.A., and Romesberg, F.E. (2005). Inhibition of Mutation and Combating the Evolution of Antibiotic Resistance. *PLoS Biol* *3*, e176.
- Clatworthy, A.E., Pierson, E., and Hung, D.T. (2007). Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy. *Nat. Chem. Biol.* *3*, 541–548.
- Cohen, S.P., McMurry, L.M., Hooper, D.C., Wolfson, J.S., and Levy, S.B. (1989). Cross-resistance to fluoroquinolones in multiple-antibiotic-resistant (Mar) *Escherichia coli* selected by tetracycline or chloramphenicol: decreased drug accumulation associated with membrane changes in addition to OmpF reduction. *Antimicrob. Agents Chemother.* *33*, 1318–1325.
- Coldham, N.G., Webber, M., Woodward, M.J., and Piddock, L.J.V. (2010). A 96-well plate fluorescence assay for assessment of cellular permeability and active efflux in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Escherichia coli*. *J. Antimicrob. Chemother.* *65*, 1655–1663.
- Collignon, P. (2005). Fluoroquinolone Use in Food Animals. *Emerg. Infect. Dis.* *11*, 1789–1792.

- Connolly, D.M., and Winkler, M.E. (1991). Structure of *Escherichia coli* K-12 *miaA* and characterization of the mutator phenotype caused by *miaA* insertion mutations. *J Bacteriol* *173*, 1711–1721.
- Conrad, S., Saunders, J.R., Oethinger, M., Kaifel, K., Klotz, G., Marre, R., and Kern, W.V. (1996). *gyrA* Mutations in high-level fluoroquinolone-resistant clinical isolates of *Escherichia coli*. *J. Antimicrob. Chemother.* *38*, 443–456.
- Cossarizza, A., Ferraresi, R., Troiano, L., Roat, E., Gibellini, L., Bertoncelli, L., Nasi, M., and Pinti, M. (2009). Simultaneous analysis of reactive oxygen species and reduced glutathione content in living cells by polychromatic flow cytometry. *Nat. Protoc.* *4*, 1790–1797.
- Courcelle, J., and Hanawalt, P.C. (2003). RecA-Dependent Recovery of Arrested Dna Replication Forks. *Annu. Rev. Genet.* *37*, 611–646.
- Courvalin, P. (1994). Transfer of antibiotic resistance genes between gram-positive and gram-negative bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* *38*, 1447–1451.
- Crum-Cianflone, N.F., Burgi, A.A., and Hale, B.R. (2007). Increasing rates of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections among HIV-infected persons. *Int. J. STD AIDS* *18*, 521–526.
- Cupples, C.G., and Miller, J.H. (1989). A set of *lacZ* mutations in *Escherichia coli* that allow rapid detection of each of the six base substitutions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *86*, 5345.
- Davies, J. (1994). Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science* *264*, 375–382.
- Davies, J. (2006). Are antibiotics naturally antibiotics? *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* *33*, 496–499.
- Davies, J., Spiegelman, G.B., and Yim, G. (2006). The world of subinhibitory antibiotic concentrations. *Curr. Opin. Microbiol.* *9*, 445–453.
- Dc, H., Js, W., Ey, N., and Mn, S. (1987). Mechanisms of action of and resistance to ciprofloxacin. *Am. J. Med.* *82*, 12–20.
- D'Costa, V.M., McGrann, K.M., Hughes, D.W., and Wright, G.D. (2006). Sampling the Antibiotic Resistome. *Science* *311*, 374–377.
- D'Costa, V.M., King, C.E., Kalan, L., Morar, M., Sung, W.W.L., Schwarz, C., Froese, D., Zazula, G., Calmels, F., Debruyne, R., et al. (2011). Antibiotic resistance is ancient. *Nature advance online publication*.
- Denamur, E., and Matic, I. (2006). Evolution of mutation rates in bacteria. *Mol. Microbiol.* *60*, 820–827.
- Denamur, E., Bonacorsi, S., Giraud, A., Duriez, P., Hilali, F., Amorin, C., Bingen, E., Andremont, A., Picard, B., Taddei, F., et al. (2002). High Frequency of Mutator Strains among Human Uropathogenic *Escherichia coli* Isolates. *J. Bacteriol.* *184*, 605–609.
- Drake, J.W. (1991a). Spontaneous Mutation. *Annu. Rev. Genet.* *25*, 125–146.
- Drake, J.W. (1991b). A constant rate of spontaneous mutation in DNA-based microbes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *88*, 7160–7164.
- Drlica, K. (1999). Mechanism of fluoroquinolone action. *Curr. Opin. Microbiol.* *2*, 504–508.

- Drlica, K. (2003). The mutant selection window and antimicrobial resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* *52*, 11–17.
- Drlica, K., and Malik, M. (2003). Fluoroquinolones: Action and Resistance. *Curr. Top. Med. Chem.* *3*, 249–282.
- Drlica, K., and Zhao, X. (1997). DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiol Mol Biol Rev* *61*, 377–392.
- Drlica, K., Malik, M., Kerns, R.J., and Zhao, X. (2008). Quinolone-Mediated Bacterial Death. *Antimicrob. Agents Chemother.* *52*, 385–392.
- Dukan, S., Farewell, A., Ballesteros, M., Taddei, F., Radman, M., and Nyström, T. (2000). Protein oxidation in response to increased transcriptional or translational errors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 5746–5749.
- Dwyer, D.J., Kohanski, M.A., Hayete, B., and Collins, J.J. (2007). Gyrase inhibitors induce an oxidative damage cellular death pathway in *Escherichia coli*. *Mol Syst Biol* *3*.
- Dwyer, D.J., Kohanski, M.A., and Collins, J.J. (2009). Role of reactive oxygen species in antibiotic action and resistance. *Curr. Opin. Microbiol.* *12*, 482–489.
- Dwyer, D.J., Belenky, P.A., Yang, J.H., MacDonald, I.C., Martell, J.D., Takahashi, N., Chan, C.T.Y., Lobritz, M.A., Braff, D., Schwarz, E.G., et al. (2014). Antibiotics induce redox-related physiological alterations as part of their lethality. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 201401876.
- Elena, S.F., and Lenski, R.E. (2003). Evolution experiments with microorganisms: the dynamics and genetic bases of adaptation. *Nat. Rev. Genet.* *4*, 457–469.
- Ellis, H.M., Yu, D., DiTizio, T., and Court, D.L. (2001). High efficiency mutagenesis, repair, and engineering of chromosomal DNA using single-stranded oligonucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *98*, 6742–6746.
- Escolar, L., Pérez-Martín, J., and Lorenzo, V. de (1999). Opening the Iron Box: Transcriptional Metalloregulation by the Fur Protein. *J. Bacteriol.* *181*, 6223–6229.
- Fajardo, A., and Martínez, J.L. (2008). Antibiotics as signals that trigger specific bacterial responses. *Curr. Opin. Microbiol.* *11*, 161–167.
- Farr, S.B., and Kogoma, T. (1991). Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Microbiol. Rev.* *55*, 561–585.
- Farr, S.B., D'Ari, R., and Touati, D. (1986). Oxygen-dependent mutagenesis in *Escherichia coli* lacking superoxide dismutase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *83*, 8268–8272.
- Fehér, T., Karcagi, I., Gyorfy, Z., Umenhoffer, K., Csörgo, B., and Pósfai, G. (2008). Scarless engineering of the *Escherichia coli* genome. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* *416*, 251–259.
- Fernández, L., and Hancock, R.E.W. (2012). Adaptive and Mutational Resistance: Role of Porins and Efflux Pumps in Drug Resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* *25*, 661–681.
- Flint, D.H., Tuminello, J.F., and Emptage, M.H. (1993). The inactivation of Fe-S cluster containing hydro-lyases by superoxide. *J. Biol. Chem.* *268*, 22369–22376.
- Foster, P.L. (2005). Stress responses and genetic variation in bacteria. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* *569*, 3–11.

- Foster, P.L. (2007). Stress-Induced Mutagenesis in Bacteria. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 42, 373–397.
- Foti, J.J., Devadoss, B., Winkler, J.A., Collins, J.J., and Walker, G.C. (2012). Oxidation of the Guanine Nucleotide Pool Underlies Cell Death by Bactericidal Antibiotics. *Science* 336, 315–319.
- Friedberg, E.C., Wagner, R., and Radman, M. (2002). Specialized DNA Polymerases, Cellular Survival, and the Genesis of Mutations. *Science* 296, 1627–1630.
- Gautier, L., Cope, L., Bolstad, B.M., and Irizarry, R.A. (2004). affy—analysis of Affymetrix GeneChip data at the probe level. *Bioinformatics* 20, 307–315.
- Gentleman, R.C., Carey, V.J., Bates, D.M., Bolstad, B., Dettling, M., Dudoit, S., Ellis, B., Gautier, L., Ge, Y., Gentry, J., et al. (2004). Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol.* 5, R80.
- Giraud, A., Matic, I., Tenailon, O., Clara, A., Radman, M., Fons, M., and Taddei, F. (2001). Costs and Benefits of High Mutation Rates: Adaptive Evolution of Bacteria in the Mouse Gut. *Science* 291, 2606–2608.
- Girgis, H.S., Hottes, A.K., and Tavazoie, S. (2009). Genetic Architecture of Intrinsic Antibiotic Susceptibility. *PLoS ONE* 4, e5629.
- Gomes, A., Fernandes, E., and Lima, J.L.F.C. (2005). Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *J. Biochem. Biophys. Methods* 65, 45–80.
- Goodman, M.F. (2002). Error-Prone Repair Dna Polymerases in Prokaryotes and Eukaryotes. *Annu. Rev. Biochem.* 71, 17–50.
- Gould, C.V., Sniegowski, P.D., Shchepetov, M., Metlay, J.P., and Weiser, J.N. (2007). Identifying Mutator Phenotypes among Fluoroquinolone-Resistant Strains of *Streptococcus pneumoniae* Using Fluctuation Analysis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 3225–3229.
- Green, M.R., and Sambrook, J. (2012). *Molecular cloning: a laboratory manual* (Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Greenberg, J.T., Monach, P., Chou, J.H., Josephy, P.D., and Demple, B. (1990). Positive control of a global antioxidant defense regulon activated by superoxide-generating agents in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 6181–6185.
- Gruenheid, S., and Le Moual, H. (2012). Resistance to antimicrobial peptides in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 330, 81–89.
- Gutierrez, A., Laureti, L., Crussard, S., Abida, H., Rodríguez-Rojas, A., Blázquez, J., Baharoglu, Z., Mazel, D., Darfeuille, F., Vogel, J., et al. (2013). β -lactam antibiotics promote bacterial mutagenesis via an RpoS-mediated reduction in replication fidelity. *Nat. Commun.* 4, 1610.
- Hall, B.M., Ma, C.-X., Liang, P., and Singh, K.K. (2009). Fluctuation AnaLysis CalculatOR: a web tool for the determination of mutation rate using Luria–Delbrück fluctuation analysis. *Bioinformatics* 25, 1564–1565.
- Hancock, R.E. (2001). Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *Lancet Infect. Dis.* 1, 156–164.
- Hansen, S., Lewis, K., and Vulic, M. (2008). Role of Global Regulators and Nucleotide Metabolism in Antibiotic Tolerance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 52, 2718–2726.

- Hantke, K. (1981). Regulation of ferric iron transport in *Escherichia coli* K12: isolation of a constitutive mutant. *Mol. Gen. Genet. MGG* 182, 288–292.
- Hantke, K. (1982). Negative control of iron uptake systems in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 15, 83–86.
- Hantke, K. (1987). Selection procedure for deregulated iron transport mutants (*fur*) in *Escherichia coli* K 12: *fur* not only affects iron metabolism. *Mol. Gen. Genet. MGG* 210, 135–139.
- Hassett, D.J., and Imlay, J.A. (2007). Bactericidal Antibiotics and Oxidative Stress: A Radical Proposal. *ACS Chem. Biol.* 2, 708–710.
- Heisig, P. (1996). Genetic evidence for a role of *parC* mutations in development of high-level fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40, 879–885.
- Hooper, D.C. (2001). Emerging mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Emerg. Infect. Dis.* 7, 337–341.
- Hopkin, K.A., Papazian, M.A., and Steinman, H.M. (1992). Functional differences between manganese and iron superoxide dismutases in *Escherichia coli* K-12. *J. Biol. Chem.* 267, 24253–24258.
- Horsburgh, M.J., Ingham, E., and Foster, S.J. (2001). In *Staphylococcus aureus*, *Fur* Is an Interactive Regulator with *PerR*, Contributes to Virulence, and Is Necessary for Oxidative Stress Resistance through Positive Regulation of Catalase and Iron Homeostasis. *J. Bacteriol.* 183, 468–475.
- Horst, J.-P., Wu, T., and Marinus, M.G. (1999). *Escherichia coli* mutator genes. *Trends Microbiol.* 7, 29–36.
- Hubbard, B.K., and Walsh, C.T. (2003). Vancomycin Assembly: Nature's Way. *Angew. Chem. Int. Ed.* 42, 730–765.
- Imlay, J.A. (2003). PATHWAYS OF OXIDATIVE DAMAGE. *Annu. Rev. Microbiol.* 57, 395–418.
- Imlay, J.A. (2006). Iron-sulphur clusters and the problem with oxygen. *Mol. Microbiol.* 59, 1073–1082.
- Imlay, J.A. (2013). The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 443–454.
- Imlay, J.A., and Fridovich, I. (2009). Superoxide Production by Respiring Membranes of *Escherichia Coli*.
- Imlay, J., and Linn, S. (1988). DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science* 240, 1302–1309.
- Iyer, R.R., Pluciennik, A., Burdett, V., and Modrich, P.L. (2006). DNA Mismatch Repair: Functions and Mechanisms. *Chem. Rev.* 106, 302–323.
- Jang, S., and Imlay, J.A. (2007). Micromolar Intracellular Hydrogen Peroxide Disrupts Metabolism by Damaging Iron-Sulfur Enzymes. *J. Biol. Chem.* 282, 929–937.
- Jang, S., and Imlay, J.A. (2010). Hydrogen peroxide inactivates the *Escherichia coli* *Isc* iron-sulphur assembly system, and *OxyR* induces the *Suf* system to compensate. *Mol. Microbiol.* 78, 1448–1467.
- Jayaraman, R. (2009). Antibiotic resistance: an overview of mechanisms and a paradigm shift. *Curr. Sci.* 96, 1475–1484.

- Jin, D.J., and Gross, C.A. (1988). Mapping and sequencing of mutations in the Escherichia coli rpoB gene that lead to rifampicin resistance. *J. Mol. Biol.* 202, 45–58.
- Junop, M.S., Yang, W., Funchain, P., Clendenin, W., and Miller, J.H. (2003). In vitro and in vivo studies of MutS, MutL and MutH mutants: correlation of mismatch repair and DNA recombination. *DNA Repair* 2, 387–405.
- Kaper, J.B., Nataro, J.P., and Mobley, H.L.T. (2004). Pathogenic Escherichia coli. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 123–140.
- Kelley, W.L. (2006). Lex marks the spot: the virulent side of SOS and a closer look at the LexA regulon. *Mol. Microbiol.* 62, 1228–1238.
- Keren, I., Wu, Y., Inocencio, J., Mulcahy, L.R., and Lewis, K. (2013). Killing by Bactericidal Antibiotics Does Not Depend on Reactive Oxygen Species. *Science* 339, 1213–1216.
- Kern, W.V., Oethinger, M., Jellen-Ritter, A.S., and Levy, S.B. (2000). Non-Target Gene Mutations in the Development of Fluoroquinolone Resistance in Escherichia coli. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 814–820.
- Keyer, K., and Imlay, J.A. (1996). Superoxide accelerates DNA damage by elevating free-iron levels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 13635–13640.
- Keyer, K., Gort, A., and Imlay, J. (1995). Superoxide and the production of oxidative DNA damage. *J. Bacteriol* 177, 6782–6790.
- Kitagawa, M., Ara, T., Arifuzzaman, M., Ioka-Nakamichi, T., Inamoto, E., Toyonaga, H., and Mori, H. (2006). Complete set of ORF clones of Escherichia coli ASKA library (A Complete Set of E. coli K-12 ORF Archive): Unique Resources for Biological Research. *DNA Res.* 12, 291–299.
- Kobayashi, S., Valentine, M.R., Pham, P., O'Donnell, M., and Goodman, M.F. (2002). Fidelity of Escherichia coli DNA Polymerase IV PREFERENTIAL GENERATION OF SMALL DELETION MUTATIONS BY dNTP-STABILIZED MISALIGNMENT. *J. Biol. Chem.* 277, 34198–34207.
- Kohanski, M.A., Dwyer, D.J., Hayete, B., Lawrence, C.A., and Collins, J.J. (2007). A Common Mechanism of Cellular Death Induced by Bactericidal Antibiotics. *Cell* 130, 797–810.
- Kohanski, M.A., Dwyer, D.J., and Collins, J.J. (2010a). How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat Rev Micro* 8, 423–435.
- Kohanski, M.A., DePristo, M.A., and Collins, J.J. (2010b). Sublethal Antibiotic Treatment Leads to Multidrug Resistance via Radical-Induced Mutagenesis. *Mol. Cell* 37, 311–320.
- Krašovec, R., Belavkin, R.V., Aston, J.A.D., Channon, A., Aston, E., Rash, B.M., Kadirvel, M., Forbes, S., and Knight, C.G. (2014). Mutation rate plasticity in rifampicin resistance depends on Escherichia coli cell–cell interactions. *Nat. Commun.* 5.
- Kuban, W., Banach-Orlowska, M., Bialoskorska, M., Lipowska, A., Schaaper, R.M., Jonczyk, P., and Fijalkowska, I.J. (2005). Mutator Phenotype Resulting from DNA Polymerase IV Overproduction in Escherichia coli: Preferential Mutagenesis on the Lagging Strand. *J. Bacteriol.* 187, 6862–6866.
- Layton, J.C., and Foster, P.L. (2003). Error-prone DNA polymerase IV is controlled by the stress-response sigma factor, RpoS, in Escherichia coli. *Mol. Microbiol.* 50, 549–561.
- LeClerc, J.E., Li, B., Payne, W.L., and Cebula, T.A. (1996). High Mutation Frequencies Among Escherichia coli and Salmonella Pathogens. *Science* 274, 1208–1211.

- Letain, T.E., and Postle, K. (1997). TonB protein appears to transduce energy by shuttling between the cytoplasmic membrane and the outer membrane in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* *24*, 271–283.
- Levin, B.R., and Rozen, D.E. (2006). Non-inherited antibiotic resistance. *Nat Rev Micro* *4*, 556–562.
- Levine, C., Hiasa, H., and Marians, K.J. (1998). DNA gyrase and topoisomerase IV: biochemical activities, physiological roles during chromosome replication, and drug sensitivities. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Struct. Expr.* *1400*, 29–43.
- Levy, S.B., and Marshall, B. (2004). Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat. Med.* *10*, S122–S129.
- Lewin, C.S., Howard, B.M.A., and Smith, J.T. (1991). Protein- and RNA-synthesis independent bactericidal activity of ciprofloxacin that involves the A subunit of DNA gyrase. *J. Med. Microbiol.* *34*, 19–22.
- Linder, J.A., Huang, E.S., Steinman, M.A., Gonzales, R., and Stafford, R.S. (2005). Fluoroquinolone prescribing in the United States: 1995 to 2002. *Am. J. Med.* *118*, 259–268.
- Liu, Y., and Imlay, J.A. (2013). Cell Death from Antibiotics Without the Involvement of Reactive Oxygen Species. *Science* *339*, 1210–1213.
- Liu, A., Tran, L., Becket, E., Lee, K., Chinn, L., Park, E., Tran, K., and Miller, J.H. (2010). Antibiotic Sensitivity Profiles Determined with an *Escherichia coli* Gene Knockout collection: Generating an Antibiotic Barcode. *Antimicrob Agents Chemother* AAC.00906–00909.
- Lutz, R., and Bujard, H. (1997). Independent and tight regulation of transcriptional units in *Escherichia coli* via the LacR/O, the TetR/O and AraC/I1-I2 regulatory elements. *Nucl Acids Res* *25*, 1203–1210.
- Lynch, M. (2010). Evolution of the mutation rate. *Trends Genet.* *TIG* *26*, 345–352.
- Malik, M., Zhao, X., and Drlica, K. (2006). Lethal fragmentation of bacterial chromosomes mediated by DNA gyrase and quinolones. *Mol. Microbiol.* *61*, 810–825.
- Malik, M., Hussain, S., and Drlica, K. (2007). Effect of Anaerobic Growth on Quinolone Lethality with *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *51*, 28–34.
- Mandsberg, L.F., Ciofu, O., Kirkby, N., Christiansen, L.E., Poulsen, H.E., and Hoiby, N. (2009). Antibiotic Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Strains with Increased Mutation Frequency Due to Inactivation of the DNA Oxidative Repair System. *Antimicrob Agents Chemother* *53*, 2483–2491.
- Maneewannakul, K., and Levy, S.B. (1996). Identification for *mar* mutants among quinolone-resistant clinical isolates of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *40*, 1695–1698.
- Marcusson, L.L., Olofsson, S.K., Lindgren, P.K., Cars, O., and Hughes, D. (2005). Mutant prevention concentrations of ciprofloxacin for urinary tract infection isolates of *Escherichia coli*. *J. Antimicrob. Chemother.* *55*, 938–943.
- Marcusson, L.L., Frimodt-Møller, N., and Hughes, D. (2009). Interplay in the Selection of Fluoroquinolone Resistance and Bacterial Fitness. *PLoS Pathog* *5*.
- Marley, E.F., Mohla, C., and Campos, J.M. (1995). Evaluation of E-Test for determination of antimicrobial MICs for *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *J. Clin. Microbiol.* *33*, 3191–3193.

- Martinez, J.L. (2014). General principles of antibiotic resistance in bacteria. *Drug Discov. Today Technol.* *11*, 33–39.
- Martinez, J.L., and Baquero, F. (2000). Mutation Frequencies and Antibiotic Resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* *44*, 1771–1777.
- Martinez, J.L., Fajardo, A., Garmendia, L., Hernandez, A., Linares, J.F., Martínez-Solano, L., and Sánchez, M.B. (2009). A global view of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* *33*, 44–65.
- Mason, D.J., Power, E.G., Talsania, H., Phillips, I., and Gant, V.A. (1995). Antibacterial action of ciprofloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* *39*, 2752–2758.
- Massé, E., and Gottesman, S. (2002). A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *99*, 4620–4625.
- Matic, I., Radman, M., Taddei, F., Picard, B., Doit, C., Bingen, E., Denamur, E., Elion, J., LeClerc, J.E., and Cebula, T.A. (1997). Highly Variable Mutation Rates in Commensal and Pathogenic *Escherichia coli*. *Science* *277*, 1833–1834.
- Mazel, D. (2006). Integrons: agents of bacterial evolution. *Nat. Rev. Microbiol.* *4*, 608–620.
- McHugh, J.P., Rodríguez-Quñones, F., Abdul-Tehrani, H., Svistunenko, D.A., Poole, R.K., Cooper, C.E., and Andrews, S.C. (2003). Global Iron-dependent Gene Regulation in *Escherichia coli* A NEW MECHANISM FOR IRON HOMEOSTASIS. *J. Biol. Chem.* *278*, 29478–29486.
- Mey, A.R., Wyckoff, E.E., Kanukurthy, V., Fisher, C.R., and Payne, S.M. (2005). Iron and Fur Regulation in *Vibrio cholerae* and the Role of Fur in Virulence. *Infect. Immun.* *73*, 8167–8178.
- Miller, J.H. (1996). SPONTANEOUS MUTATORS IN BACTERIA: Insights into Pathways of Mutagenesis and Repair. *Annu. Rev. Microbiol.* *50*, 625–643.
- Miller, C., Thomsen, L.E., Gaggero, C., Mosseri, R., Ingmer, H., and Cohen, S.N. (2004a). SOS Response Induction by β -Lactams and Bacterial Defense Against Antibiotic Lethality. *Science* *305*, 1629–1631.
- Miller, K., O'Neill, A.J., and Chopra, I. (2004b). *Escherichia coli* mutators present an enhanced risk for emergence of antibiotic resistance during urinary tract infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* *48*, 23.
- Molina-Santiago, C., and Ramos, J.L. (2014). Bactericidal and bacteriostatic antibiotics and the Fenton reaction. *Microb. Biotechnol.* *7*, 194–195.
- Morgan-Linnell, S.K., Becnel Boyd, L., Steffen, D., and Zechiedrich, L. (2009). Mechanisms Accounting for Fluoroquinolone Resistance in *Escherichia coli* Clinical Isolates. *Antimicrob Agents Chemother* *53*, 235–241.
- Nakamura, S., Nakamura, M., Kojima, T., and Yoshida, H. (1989). *gyrA* and *gyrB* mutations in quinolone-resistant strains of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *33*, 254–255.
- Nandal, A., Huggins, C.C.O., Woodhall, M.R., McHugh, J., Rodríguez-Quñones, F., Quail, M.A., Guest, J.R., and Andrews, S.C. (2010). Induction of the ferritin gene (*ftnA*) of *Escherichia coli* by Fe²⁺—Fur is mediated by reversal of H-NS silencing and is RyhB independent. *Mol. Microbiol.* *75*, 637–657.
- Napolitano, R., Janel-Bintz, R., Wagner, J., and Fuchs, R.P.P. (2000). All three SOS-inducible DNA polymerases (Pol II, Pol IV and Pol V) are involved in induced mutagenesis. *EMBO J.* *19*, 6259–6265.

- Neeley, W.L., and Essigmann, J.M. (2006). Mechanisms of Formation, Genotoxicity, and Mutation of Guanine Oxidation Products. *Chem. Res. Toxicol.* *19*, 491–505.
- Neilands, J.B. (1995). Siderophores: Structure and Function of Microbial Iron Transport Compounds. *J. Biol. Chem.* *270*, 26723–26726.
- Nesme, J., Cécillon, S., Delmont, T.O., Monier, J.-M., Vogel, T.M., and Simonet, P. (2014). Large-Scale Metagenomic-Based Study of Antibiotic Resistance in the Environment. *Curr. Biol.*
- Neu, H.C. (1992). The Crisis in Antibiotic Resistance. *Science* *257*, 1064–1073.
- Nichols, R.J., Sen, S., Choo, Y.J., Beltrao, P., Zietek, M., Chaba, R., Lee, S., Kazmierczak, K.M., Lee, K.J., Wong, A., et al. (2011). Phenotypic Landscape of a Bacterial Cell. *Cell* *144*, 143–156.
- Niederhoffer, E.C., Naranjo, C.M., Bradley, K.L., and Fee, J.A. (1990). Control of *Escherichia coli* superoxide dismutase (*sodA* and *sodB*) genes by the ferric uptake regulation (*fur*) locus. *J. Bacteriol.* *172*, 1930–1938.
- Nunoshiba, T., Hidalgo, E., Cuevas, C.F.A., and Demple, B. (1992). Two-stage control of an oxidative stress regulon: the *Escherichia coli* SoxR protein triggers redox-inducible expression of the *soxS* regulatory gene. *J. Bacteriol.* *174*, 6054–6060.
- Nunoshiba, T., Obata, F., Boss, A.C., Oikawa, S., Mori, T., Kawanishi, S., and Yamamoto, K. (1999). Role of Iron and Superoxide for Generation of Hydroxyl Radical, Oxidative DNA Lesions, and Mutagenesis in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* *274*, 34832–34837.
- Nunoshiba, T., Watanabe, T., Nakabeppu, Y., and Yamamoto, K. (2002). Mutagenic target for hydroxyl radicals generated in *Escherichia coli* mutant deficient in Mn- and Fe-superoxide dismutases and Fur, a repressor for iron-uptake systems. *DNA Repair* *1*, 411–418.
- Oliver, A., and Mena, A. (2010). Bacterial hypermutation in cystic fibrosis, not only for antibiotic resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* *16*, 798–808.
- Oliver, A., Cantón, R., Campo, P., Baquero, F., and Blázquez, J. (2000). High Frequency of Hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in Cystic Fibrosis Lung Infection. *Science* *288*, 1251–1253.
- Olofsson, S.K., Marcusson, L.L., Komp Lindgren, P., Hughes, D., and Cars, O. (2006). Selection of ciprofloxacin resistance in *Escherichia coli* in an in vitro kinetic model: relation between drug exposure and mutant prevention concentration. *J Antimicrob Chemother* *57*, 1116–1121.
- Palumbi, S.R. (2001). Humans as the World's Greatest Evolutionary Force. *Science* *293*, 1786–1790.
- Park, S., and Imlay, J.A. (2003). High Levels of Intracellular Cysteine Promote Oxidative DNA Damage by Driving the Fenton Reaction. *J. Bacteriol.* *185*, 1942–1950.
- Park, S., You, X., and Imlay, J.A. (2005). Substantial DNA damage from submicromolar intracellular hydrogen peroxide detected in Hpx- mutants of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 9317–9322.
- Paulander, W., Wang, Y., Folkesson, A., Charbon, G., Løbner-Olesen, A., and Ingmer, H. (2014). Bactericidal Antibiotics Increase Hydroxyphenyl Fluorescein Signal by Altering Cell Morphology. *PLoS ONE* *9*, e92231.
- Peng, H., and Mariani, K.J. (1993). *Escherichia coli* topoisomerase IV. Purification, characterization, subunit structure, and subunit interactions. *J. Biol. Chem.* *268*, 24481–24490.

- Pérez-Capilla, T., Baquero, M.-R., Gómez-Gómez, J.-M., Ionel, A., Martín, S., and Blázquez, J. (2005). SOS-Independent Induction of *dinB* Transcription by β -Lactam-Mediated Inhibition of Cell Wall Synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* *187*, 1515–1518.
- Pomposiello, P.J., Bennik, M.H.J., and Dempfle, B. (2001). Genome-Wide Transcriptional Profiling of the *Escherichia coli* Responses to Superoxide Stress and Sodium Salicylate. *J. Bacteriol.* *183*, 3890–3902.
- Pósfai, G., Koob, M.D., Kirkpatrick, H.A., and Blattner, F.R. (1997). Versatile insertion plasmids for targeted genome manipulations in bacteria: isolation, deletion, and rescue of the pathogenicity island LEE of the *Escherichia coli* O157:H7 genome. *J. Bacteriol.* *179*, 4426–4428.
- Pósfai, G., Kolisnychenko, V., Bereczki, Z., and Blattner, F.R. (1999). Markerless gene replacement in *Escherichia coli* stimulated by a double-strand break in the chromosome. *Nucleic Acids Res.* *27*, 4409–4415.
- Ratledge, C., and Dover, L.G. (2000). Iron Metabolism in Pathogenic Bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* *54*, 881–941.
- R Core Team (2013). R: A language and environment for statistical computing. (Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing).
- Redgrave, L.S., Sutton, S.B., Webber, M.A., and Piddock, L.J.V. (2014). Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. *Trends Microbiol.* *22*, 438–445.
- Reece, R.J., Maxwell, A., and Wang, J.C. (1991). DNA Gyrase: Structure and Function. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* *26*, 335–375.
- Ren, L., Al Mamun, A.A.M., and Humayun, M.Z. (1999). The *mutA* mistranslator tRNA-induced mutator phenotype requires *recA* and *recB* genes, but not the derepression of *lexA*-regulated functions. *Mol. Microbiol.* *32*, 607–615.
- Robicsek, A., Strahilevitz, J., Jacoby, G.A., Macielag, M., Abbanat, D., Park, C.H., Bush, K., and Hooper, D.C. (2006). Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat. Med.* *12*, 83–88.
- Saito, T., Wormald, M.R., and Williams, R.J.P. (1991). Some structural features of the iron-uptake regulation protein. *Eur. J. Biochem.* *197*, 29–38.
- Schaaper, R.M., and Radman, M. (1989). The extreme mutator effect of *Escherichia coli* *mutD5* results from saturation of mismatch repair by excessive DNA replication errors. *EMBO J.* *8*, 3511–3516.
- Schlacher, K., and Goodman, M.F. (2007). Lessons from 50 years of SOS DNA-damage-induced mutagenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *8*, 587–594.
- Schofield, M.J., and Hsieh, P. (2003). DNA MISMATCH REPAIR: Molecular Mechanisms and Biological Function*. *Annu. Rev. Microbiol.* *57*, 579–608.
- Schrum, L.W., and Hassan, H.M. (1994). The effects of *fur* on the transcriptional and post-transcriptional regulation of *MnSOD* gene (*sodA*) in *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.* *309*, 288–292.
- Seaver, L.C., and Imlay, J.A. (2001). Alkyl Hydroperoxide Reductase Is the Primary Scavenger of Endogenous Hydrogen Peroxide in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* *183*, 7173–7181.

- Sessions, A.L., Doughty, D.M., Welander, P.V., Summons, R.E., and Newman, D.K. (2009). The Continuing Puzzle of the Great Oxidation Event. *Curr. Biol.* *19*, R567–R574.
- Shee, C., Gibson, J.L., Darrow, M.C., Gonzalez, C., and Rosenberg, S.M. (2011). Impact of a stress-inducible switch to mutagenic repair of DNA breaks on mutation in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *108*, 13659–13664.
- Sniegowski, P.D., Gerrish, P.J., and Lenski, R.E. (1997). Evolution of high mutation rates in experimental populations of *E. coli*. *Nature* *387*, 703–705.
- Stambuk, S., and Radman, M. (1998). Mechanism and control of interspecies recombination in *Escherichia coli*. I. Mismatch repair, methylation, recombination and replication functions. *Genetics* *150*, 533–542.
- Strahilevitz, J., Jacoby, G.A., Hooper, D.C., and Robicsek, A. (2009). Plasmid-Mediated Quinolone Resistance: a Multifaceted Threat. *Clin Microbiol Rev* *22*, 664–689.
- Sung, W., Ackerman, M.S., Miller, S.F., Doak, T.G., and Lynch, M. (2012). Drift-barrier hypothesis and mutation-rate evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *109*, 18488–18492.
- Taddei, F., Radman, M., Maynard-Smith, J., Toupance, B., Gouyon, P.H., and Godelle, B. (1997). Role of mutator alleles in adaptive evolution. *Nature* *387*, 700–702.
- Tajiri, T., Maki, H., and Sekiguchi, M. (1995). Functional cooperation of MutT, MutM and MutY proteins in preventing mutations caused by spontaneous oxidation of guanine nucleotide in *Escherichia coli*. *Mutat. Res. Repair* *336*, 257–267.
- Tamma, P.D., Cosgrove, S.E., and Maragakis, L.L. (2012). Combination Therapy for Treatment of Infections with Gram-Negative Bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* *25*, 450–470.
- Tao, K., Makino, K., Yonei, S., Nakata, A., and Shinagawa, H. (1991). Purification and Characterization of the *Escherichia coli* OxyR Protein, the Positive Regulator for a Hydrogen Peroxide-Inducible Regulon. *J. Biochem. (Tokyo)* *109*, 262–266.
- Teixidó, L., Carrasco, B., Alonso, J.C., Barbé, J., and Campoy, S. (2011). Fur Activates the Expression of *Salmonella enterica* Pathogenicity Island 1 by Directly Interacting with the hilD Operator In Vivo and In Vitro. *PLoS ONE* *6*, e19711.
- Teuber, M. (2001). Veterinary use and antibiotic resistance. *Curr. Opin. Microbiol.* *4*, 493–499.
- Tippin, B., Pham, P., and Goodman, M.F. (2004). Error-prone replication for better or worse. *Trends Microbiol.* *12*, 288–295.
- Torres, V.J., Attia, A.S., Mason, W.J., Hood, M.I., Corbin, B.D., Beasley, F.C., Anderson, K.L., Stauff, D.L., McDonald, W.H., Zimmerman, L.J., et al. (2010). *Staphylococcus aureus* Fur Regulates the Expression of Virulence Factors That Contribute to the Pathogenesis of Pneumonia. *Infect. Immun.* *78*, 1618–1628.
- Touati, D. (2000). Iron and Oxidative Stress in Bacteria. *Arch. Biochem. Biophys.* *373*, 1–6.
- Touati, D., Jacques, M., Tardat, B., Bouchard, L., and Despiéd, S. (1995). Lethal oxidative damage and mutagenesis are generated by iron in delta fur mutants of *Escherichia coli*: protective role of superoxide dismutase. *J Bacteriol* *177*, 2305–2314.
- Tran, J.H., and Jacoby, G.A. (2002). Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 5638–5642.

- Troxell, B., and Hassan, H.M. (2013). Transcriptional regulation by Ferric Uptake Regulator (Fur) in pathogenic bacteria. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 3.
- Turrientes, M.-C., Baquero, F., Levin, B.R., Martínez, J.-L., Ripoll, A., González-Alba, J.-M., Tobes, R., Manrique, M., Baquero, M.-R., Rodríguez-Domínguez, M.-J., et al. (2013). Normal Mutation Rate Variants Arise in a Mutator (Mut S) *Escherichia coli* Population. *PLoS ONE* 8, e72963.
- Urbonavicius, J., Qian, Q., Durand, J.M.B., Hagervall, T.G., and Bjork, G.R. (2001). Improvement of reading frame maintenance is a common function for several tRNA modifications. *EMBO J.* 20, 4863–4873.
- Varghese, S., Wu, A., Park, S., Imlay, K.R.C., and Imlay, J.A. (2007). Submicromolar hydrogen peroxide disrupts the ability of Fur protein to control free-iron levels in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 64, 822–830.
- Wagner, J., and Nohmi, T. (2000). *Escherichia coli* DNA Polymerase IV Mutator Activity: Genetic Requirements and Mutational Specificity. *J. Bacteriol.* 182, 4587–4595.
- Walsh, C. (2003a). Where will new antibiotics come from? *Nat. Rev. Microbiol.* 1, 65–70.
- Walsh, C. (2003b). *Antibiotics: Actions, Origins, Resistance* (ASM Press).
- Wang, X., Zhao, X., Malik, M., and Drlica, K. (2010). Contribution of reactive oxygen species to pathways of quinolone-mediated bacterial cell death. *J. Antimicrob. Chemother.* 65, 520–524.
- Wang, Z.-Y., Xiong, M., Fu, L.-Y., and Zhang, H.-Y. (2012). Oxidative DNA damage is important to the evolution of antibiotic resistance: evidence of mutation bias and its medicinal implications. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 1–5.
- Wiegand, I., Marr, A.K., Breidenstein, E.B.M., Schurek, K.N., Taylor, P., and Hancock, R.E.W. (2008a). Mutator Genes Giving Rise to Decreased Antibiotic Susceptibility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 3810–3813.
- Wiegand, I., Hilpert, K., and Hancock, R.E.W. (2008b). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat. Protoc.* 3, 163–175.
- Woodmansee, A.N., and Imlay, J.A. (2002). Reduced Flavins Promote Oxidative DNA Damage in Non-respiring *Escherichia coli* by Delivering Electrons to Intracellular Free Iron. *J. Biol. Chem.* 277, 34055–34066.
- Worthington, R.J., and Melander, C. (2013). Combination approaches to combat multidrug-resistant bacteria. *Trends Biotechnol.* 31, 177–184.
- Wu, J., and Weiss, B. (1991). Two divergently transcribed genes, *soxR* and *soxS*, control a superoxide response regulon of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 173, 2864–2871.
- Wyrzykowski, J., and Volkert, M.R. (2003). The *Escherichia coli* Methyl-Directed Mismatch Repair System Repairs Base Pairs Containing Oxidative Lesions. *J. Bacteriol.* 185, 1701–1704.
- Yamada, M., Nunoshiba, T., Shimizu, M., Gruz, P., Kamiya, H., Harashima, H., and Nohmi, T. (2006). Involvement of Y-Family DNA Polymerases in Mutagenesis Caused by Oxidized Nucleotides in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 188, 4992–4995.
- Yamada, M., Shimizu, M., Katafuchi, A., Grúz, P., Fujii, S., Usui, Y., Fuchs, R.P., and Nohmi, T. (2012). *Escherichia coli* DNA polymerase III is responsible for the high level of spontaneous mutations in *mutT* strains. *Mol. Microbiol.* 86, 1364–1375.

- Yim, G., Huimi Wang, H., and Davies, J. (2006). The truth about antibiotics. *Int. J. Med. Microbiol.* 296, 163–170.
- Yoshida, H., Bogaki, M., Nakamura, M., Yamanaka, L.M., and Nakamura, S. (1991). Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrB* gene of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 35, 1647–1650.
- Zaslaver, A., Bren, A., Ronen, M., Itzkovitz, S., Kikoin, I., Shavit, S., Liebermeister, W., Surette, M.G., and Alon, U. (2006). A comprehensive library of fluorescent transcriptional reporters for *Escherichia coli*. *Nat Meth* 3, 623–628.
- Zhao, J., and Winkler, M.E. (2000). Reduction of GC → TA Transversion Mutation by Overexpression of MutS in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 182, 5025–5028.
- Zhao, G., Ceci, P., Ilari, A., Giangiacomo, L., Laue, T.M., Chiancone, E., and Chasteen, N.D. (2002). Iron and Hydrogen Peroxide Detoxification Properties of DNA-binding Protein from Starved Cells A FERRITIN-LIKE DNA-BINDING PROTEIN OF *ESCHERICHIA COLI*. *J. Biol. Chem.* 277, 27689–27696.
- Zhao, J., Leung, H.-C.E., and Winkler, M.E. (2001). The *miaA* Mutator Phenotype of *Escherichia coli* K-12 Requires Recombination Functions. *J. Bacteriol.* 183, 1796–1800.
- Zhao, Q., Li, X.-Z., Mistry, A., Srikumar, R., Zhang, L., Lomovskaya, O., and Poole, K. (1998). Influence of the TonB Energy-Coupling Protein on Efflux-Mediated Multidrug Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 2225–2231.
- Zheng, M., Doan, B., Schneider, T.D., and Storz, G. (1999). OxyR and SoxRS Regulation of *fur*. *J Bacteriol* 181, 4639–4643.
- Zheng, M., Wang, X., Templeton, L.J., Smulski, D.R., LaRossa, R.A., and Storz, G. (2001). DNA Microarray-Mediated Transcriptional Profiling of the *Escherichia coli* Response to Hydrogen Peroxide. *J. Bacteriol.* 183, 4562–4570.

Saját publikációk jegyzéke

1. 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

2. 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

3. 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

4. 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

5. 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

Összefoglalás

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 evolúciobiológiai 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 baktériumtörzsfüggő 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 ciprofloxacinnal alkalmazása esetén. A fluorokinolonok családjába tartozó ciprofloxacinnal a klinikumban széles körben alkalmazott öltő hatású (baktericid) antibiotikum. Vizsgálatainkhoz az alapvető módszertant a rövid távú laboratóriumi evolúciós kísérletek jelentették, amelyeket az *Escherichia coli* Gram-negatív baktériummal végeztünk. 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 vasháztartásnak a ciprofloxacinnal szembeni rezisztencia kialakulásában?

A géninaktiváció szerepének vizsgálatához egy genom léptékű keresést végeztünk a közel 4000 egyszeres gendelációs törzset tartalmazó *Escherichia coli* kollekción (KEIO) felhasználva. A vizsgálat eredményeként öt olyan gént azonosítottunk, amelyek deléciója jelentősen megnövelte a ciprofloxacinnal szembeni rezisztencia kialakulásának gyakoriságát a vad típushoz képest. A kódolt fehérje funkciója szempontjából az azonosított gének három különböző kategóriába sorolhatóak: 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 mikroorganizmusok számára, mivel megnöveli a túlélést biztosító rezisztencia mutációk megjelenési esélyét.

A genom léptékű vizsgálat talán legérdekesebb eredménye a vas-homeosztázis szabályozásában központi szerepet játszó *fur* gén volt, és az intracelluláris vas-egyensúly és az antibiotikum rezisztencia kapcsolatára irányította a figyelmünket. 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. Ezen eredményekre és az általunk végzett szűrés eredményére alapozva, a vas közvetítette oxidatív stressz antibiotikum rezisztencia kialakulásában betöltött szerepének tanulmányozásába kezdtünk a Δfur törzs jellemzésén keresztül.

A genom léptékű szűrés eredményét megerősítve igazoltuk, hogy a vas-egyensúly felbomlása, a *fur* gén inaktiválása révén elősegíti a rezisztencia kialakulását letális dózissal (a vad típusú *E. coli* törzs minimális gátló koncentrációjának hatszorosa) ciprofloxacinnal szemben. A transzkriptomikai vizsgálat eredményei alapján ciprofloxacinnal való kezelés hatására a Δfur törzsben génextressz átrendeződés történik. A megváltozott expressziót mutató gének jelentős részét tették ki a vasfelvételben szerepet játszóknak.

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.

A 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 pedig 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 a Δfur és $\Delta sodAB$ törzsek esetén egyaránt a rezisztencia kialakulását elősegítő „képeségük” oxigénfüggőnek bizonyult, ami alátámasztja az oxidatív mutagenézis kulcsszerepét ebben a folyamatban.

Kimutattuk, hogy a ciprofloxacín kezelés az intracelluláris reaktív oxigéngyökszint enyhe, de szignifikáns emelkedését váltja ki, hozzájárulva az intracelluláris oxidatív stressz szintjének megemelkedéséhez. Azt feltételezzük, hogy a megemelkedett intracelluláris vasszint 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 túltermelésével kimutattuk, hogy a Δfur törzs esetében a rezisztenciát okozó mutációk megjelenése nem függ a metilirányított DNS hibajavító rendszer oxidatív károsodásokat javító aktivitásától.

Eredményeink alapján az intracelluláris vas-homeosztázis szabályozása jelentős mértékben befolyásolja a ciprofloxacinnal szembeni rezisztencia kialakulását. A vas-homeosztázis felbomlásából adódó intracelluláris vastöbblet és a ciprofloxacín által indukált oxidatív stressz együttesen járul hozzá a rezisztencia kialakulásához, az oxidatív mutagenézisen keresztül. Az intracelluláris szabad vas koncentrációjának minimalizálásával jelentős mértékben csökkenthető a rezisztencia kialakulásának esélye. A vaskelátorok alkalmazása a rezisztencia csökkentésére új antimikrobiális stratégiák kifejlesztése irányába nyithat utat.

Az általunk alkalmazott koncentráció esetén úgy tűnik, hogy a ciprofloxacín által kiváltott oxidatív stressz egy magas intracelluláris szabad vaskoncentrációval társulva az

oxidatív mutagenezisen keresztül a rezisztencia kialakulását segíti elő és nem az ölü hatást. Ennek alapján az antibiotikumok által indukált oxidatív stressz fokozása nem megfelelő stratégia az antibiotikumok hatékonyságának növelésére, mivel a reaktív oxigéngyökök mutagenezisben betöltött szerepe hangsúlyosabb az ölü hatásnál.

Summary

Antibiotic resistance is an increasingly urgent, present-day medical issue. The emergence of resistant strains threatens not only the treatability of contagious diseases, but other medical treatments as well for which the use of antibiotics is indispensable. Besides its medical implications studying the mechanisms governing antibiotic resistance evolution represents an important evolutionary biology issue as well. It is one of the few evolutionary processes which can be studied in real time.

In the case of microorganisms the two main mechanisms contributing to the evolution of antibiotic resistance are the horizontal gene transfer and the accumulation of chromosomal resistance mutations. Dominance of either mechanism is antibiotic- and bacterial species-dependent, but in many cases both contribute to the development of a very high level of resistance.

Resistance to a number of antibiotics (e.g. fluoroquinolones, rifampicines) develops predominantly by acquisition of *de novo* mutations during antimicrobial therapy. *De novo* mutation based resistance mechanisms can be classified into three main categories: 1) modification of the antibiotic target, 2) alterations in antibiotic transport (decreased uptake or increased efflux) or 3) increased expression of enzymes degrading or neutralizing the antibiotic.

Our work focused on *de novo* evolution of antibiotic resistance during a lethal ciprofloxacin exposure. The fluoroquinolone antibiotic ciprofloxacin is a widely used bactericid antibiotic, and its molecular mechanism has been well studied. Laboratory evolutionary experiments performed on the *Escherichia coli* Gram-negative bacterium represented the main methodology of our investigations. We investigated the mechanisms underlying the evolution of ciprofloxacin resistance from two aspects, while searching for the answers for the following questions:

- 1) Are there non-essential genes in *E. coli* whose inactivation boosts the evolution of resistance against a lethal dose of ciprofloxacin? If yes, which are the underlying mechanisms?
- 2) What role does iron metabolism play in the evolution of ciprofloxacin resistance?

In order to investigate the impact of gene inactivation on *de novo* evolution of antibiotic resistance, we performed a genome wide screen by using the *E. coli* KEIO collection,

containing ~ 4000 single-gene knockout strains. We identified five genotypes with a massive increase in the frequency of resistant populations in comparison with the wild type strain. Based on the function of the encoded protein the identified genes could be classified into three main categories: 1) methyl-directed mismatch repair (*mutS*, *mutH*, *mutL*), 2) translation fidelity (*miaA*) and 3) iron homeostasis regulation (*fur*). As a common characteristic of these genes, their inactivation elevates the spontaneous mutation rate of the cell providing a mutator phenotype, which significantly increases the chance of resistance development. Our results emphasize the significant role of mutator phenotypes in promoting the evolution of antibiotic resistance. In case of extreme antibiotic stress, bacteria benefit from an enhanced mutation rate, as this can provide mutations that protect the population from death.

The *fur* gene, playing a central role in iron-homeostasis regulation, was perhaps the most interesting result of our screen. It drew our attention to the connection between intracellular iron-homeostasis and antibiotic resistance. Prior studies have shown that bactericidal antibiotics induce perturbations in cell metabolism, including iron homeostasis, that stimulate intracellular accumulation of reactive oxygen species (ROS). Based on these literature data and our screen result we started to investigate the role of iron-mediated oxidative stress in the evolution of ciprofloxacin resistance through the characterization of Δfur mutant.

Reinforcing our screen results, we proved that inactivation of the iron homeostasis regulator Fur promotes the evolution of resistance against a lethal dose (6.25 times the minimal inhibitory concentration of wild-type *E. coli*) of ciprofloxacin. Transcriptomics data have shown that ciprofloxacin caused a major reprogramming of gene expression across the genome of Δfur strain. Genes involved in iron uptake comprised a significant part of those with changed expression.

We proved that regulation of intracellular free iron concentration plays a crucial role in the evolution of resistance against ciprofloxacin. Increased level of intracellular free iron leads to oxidative stress via the hydroxyl radical-generating Fenton reaction. Oxidative stress may lead to the appearance of mutations and hence to the development of antibiotic resistance. Minimizing the intracellular free iron concentration either by inhibition of siderophore mediated iron uptake, enhancement of iron storage or chelation of intracellular free iron using a cell permeable iron chelator caused a significant decrease in the frequency of ciprofloxacin resistant populations in the case of Δfur strain.

Next to the intracellular free iron concentration the level of superoxide also represents a key factor in the evolution of resistance. In case of $\Delta sodAB$ strain, deficient in superoxide

detoxification, the frequency of resistant populations, similarly to Δfur strain, is elevated. The mutagenic effect of enhanced superoxide formation was contingent upon iron uptake and probably relies on Fenton chemistry, similar to what was observed in Δfur . It seems that increased iron and superoxide levels enhance each other's effect, contributing to oxidative mutagenesis and consequent resistance development. Moreover, anaerobic conditions drastically diminished both strains' (Δfur and $\Delta sodAB$) resistance promoting "capacity", which supports the key role of oxidative mutagenesis in antibiotic resistance development.

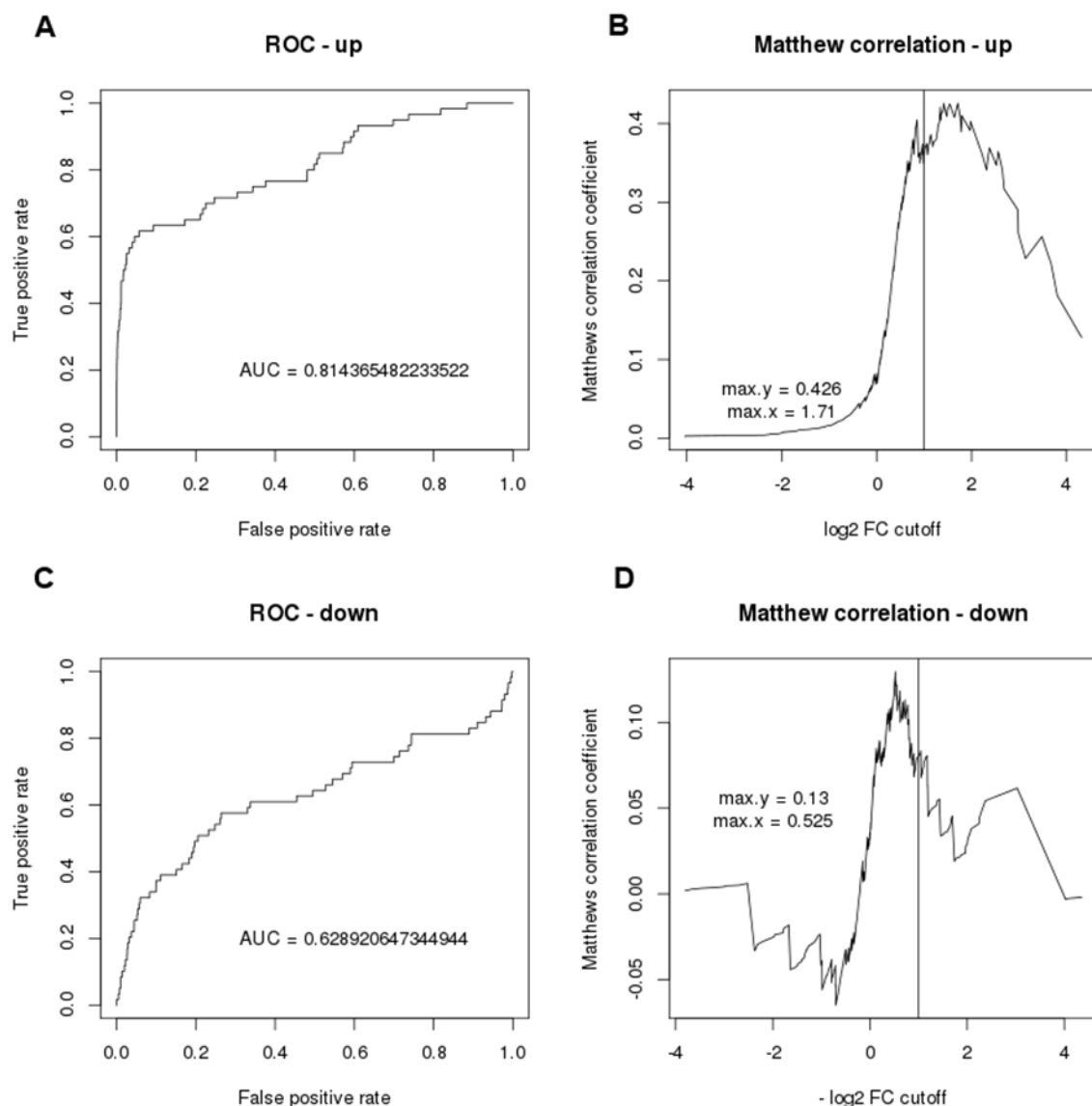
We demonstrated that ciprofloxacin treatment induces a slight, but significant increase in the level of ROS. We hypothesize that increased intracellular iron level and ciprofloxacin induced oxidative stress contribute to the increased evolvability of Δfur strain by strengthening each other's effect.

Based on our results the mutation generating activity of Pol IV and Pol V error-prone DNA polymerases has only a minor contribution to the appearance of resistance mutations in Δfur . We hypothesize that a significant part of the oxidized nucleotides is incorporated into the DNA strand by the Pol III replicative polymerase. By overexpressing the MutS protein, we have shown that appearance of the resistance mutations in Δfur is independent of the activity of the methyl-directed mismatch repair system.

We demonstrated that regulation of intracellular iron homeostasis plays a pivotal role in the evolution of resistance against ciprofloxacin. By minimalizing the intracellular free iron level antibiotic resistance development could be significantly reduced. Employing iron chelators to reduce resistance evolution may open ways towards the development of new antimicrobial therapies.

In our experimental setup ciprofloxacin-induced oxidative stress together with an intracellular iron overload promotes oxidative mutagenesis, thus resistance development, rather than lethality. Based on this, the enhancement of antibiotics induced oxidative stress does not seem to be a proper strategy to improve the efficiency of antibiotics, because the presence of ROS promotes mutagenesis instead of eradication.

Függelék



1. ábra. A transzkriptomikai adatok validálása.

A microarray analízis validálása és a génexpressziós eltérés küszöbértékének meghatározása végett, összevetettük a Δfur törzsre vonatkozó microarray adatokat egy előző vizsgálat (McHugh és mtsai., 2003) adataival. A ROC (receiving operator characteristics) görbe analízisek (A és C panel) alapján az általunk végzett transzkriptomikai analízis 81%-ban, illetve 63%-ban képes volt azonosítani a McHugh és mtsi. által azonosított indukálódott, illetve represszálódott géneket. Az ROC görbe alatti terület egy küszöbértéktől független mértékét adja meg a klasszifikációs teljesítménynek, amely figyelembe veszi a valós és a

hamisan pozitív találati ráta közti költség-kompromisszumot (trade-off-ot). Egy random klasszifikáció 50%-os teljesítményt adna ezen mérték alapján. Emellett felhasználtuk a McHugh és mtsai. által által azonosított indukciót, illetve repressziót mutató génsorozatok egy olyan génexpressziós küszöbérték-változás meghatározására a mi adatsorunk esetén, ami maximalizálja az átfedést a két adatsor között (B, illetve D panel az indukálódott, illetve represszálódott génekre). A két génsorozat közti átfedést a Matthew korreláció koefficienssel mértük, ami -1 és +1 között vehet fel értéket. Ez a mérték figyelembe veszi a valós és hamisan pozitív, illetve negatív találatokat, és akkor is használható, ha az összehasonlított osztályok eltérő méretűek. Microarray adataink esetén a Matthew korreláció koefficiens alapján egy kétszeres génexpressziós változás megfelelőnek bizonyult küszöbértékként mind az indukálódott, mind a represszálódott gének esetén. Ennek megfelelően ezt a küszöbértéket használtuk a további analízis során.

GO term identifier	GO term name	p-value	FDR adjusted p-value	Odds ratio	Enriched among up or downregulated genes
GO:0055072	iron ion homeostasis	8.77E-12	4.71E-09	51.53	upregulated
GO:0044718	siderophore transmembrane transport	7.81E-09	2.10E-06	196.15	upregulated
GO:0009239	enterobactin biosynthetic process	2.03E-06	0.000363	77.64	upregulated
GO:0009061	anaerobic respiration	5.62E-06	0.000755	16.71	upregulated
GO:0051454	intracellular pH elevation	2.31E-05	0.002478	114.08	upregulated
GO:0042128	nitrate assimilation	0.000124	0.011129	19.47	upregulated
GO:0006811	ion transport	0.000397	0.026637	7.18	upregulated
GO:0045333	cellular respiration	0.000359	0.026637	28.67	upregulated
GO:0022900	electron transport chain	0.000957	0.051836	5.99	upregulated
GO:0019752	carboxylic acid metabolic process	0.001062	0.051836	74.83	upregulated
GO:0033212	iron assimilation	0.001062	0.051836	74.83	upregulated
GO:0017004	cytochrome complex assembly	0.001398	0.062551	16.39	upregulated
GO:0006096	glycolysis	0.002277	0.094052	13.5	upregulated
GO:0019645	anaerobic electron transport chain	1.73E-11	9.29E-09	Inf	downregulated
GO:0009061	anaerobic respiration	2.94E-09	7.88E-07	23.22	downregulated
GO:0006099	tricarboxylic acid cycle	1.00E-07	1.79E-05	25.28	downregulated
GO:0055114	oxidation-reduction process	2.01E-07	2.70E-05	4.93	downregulated
GO:0006113	fermentation	1.04E-06	0.000112	123.42	downregulated
GO:0022900	electron transport chain	9.74E-06	0.000872	7.76	downregulated
GO:0045333	cellular respiration	2.14E-05	0.001645	35.51	downregulated

1. táblázat. Szignifikáns feldúsulást mutató gén-ontológiai folyamatok az indukálódott, illetve represszálódott gének között a *Afur* és vad típus összehasonlításban, ciprofloxacín hiányában.

Csak azok a gén-ontológiai (GO) folyamatok vannak bemutatva, amelyek szignifikáns feldúsulást mutattak 10%-os hibás találati ráta (false discovery rate (FDR)) mellett végzett többszörös tesztelési korrekciót követően. A feldúsulásokra számolt P-értékek Fisher-féle egzakt teszttel lettek meghatározva. A valószínűségi arány (odds ratio) azt mutatja meg, hogy egy adott gén-ontológiai csoportba annotált gének mennyivel nagyobb eséllyel indukálódnak vagy represszálódnak, összehasonlítva az adott csoportba nem tartozó génekkel. Az *E.coli*-ra vonatkozó GO annotációkat a <http://www.geneontology.org/GO.downloads.annotations.shtml> weboldaltól töltöttük le.

GO term identifier	GO term name	p-value	FDR adjusted p-value	Odds ratio	Enriched among up or downregulated genes
GO:0006412	translation	1.70E-19	9.11E-17	7.885766	upregulated
GO:0009408	response to heat	3.04E-11	8.16E-09	13.25067	upregulated
GO:0009432	SOS response	9.42E-08	1.69E-05	8.774096	upregulated
GO:0006418	tRNA aminoacylation for protein translation	2.83E-05	0.003805	12.01241	upregulated
GO:0065002	intracellular protein transmembrane transport	4.00E-04	0.04292	18.66871	upregulated
GO:0006633	fatty acid biosynthetic process	8.66E-04	0.053513	5.455242	upregulated
GO:0006281	DNA repair	6.06E-04	0.053513	3.304349	upregulated
GO:0000028	ribosomal small subunit assembly	8.97E-04	0.053513	29.79848	upregulated
GO:0019305	dTDP-rhamnose biosynthetic process	8.97E-04	0.053513	29.79848	upregulated
GO:0051205	protein insertion into membrane	2.44E-03	0.08726	14.90734	upregulated
GO:0006461	protein complex assembly	2.44E-03	0.08726	14.90734	upregulated
GO:0009243	O antigen biosynthetic process	1.95E-03	0.08726	9.332721	upregulated
GO:0000725	recombinational repair	2.44E-03	0.08726	14.90734	upregulated
GO:0009231	riboflavin biosynthetic process	2.44E-03	0.08726	14.90734	upregulated
GO:0043335	protein unfolding	1.67E-03	0.08726	Inf	upregulated
GO:0006457	protein folding	2.93E-03	0.090185	3.413838	upregulated
GO:0006260	DNA replication	2.93E-03	0.090185	3.413838	upregulated
GO:0015949	nucleobase-containing small molecule interconversion	3.17E-03	0.090185	4.763987	upregulated
GO:0043165	Gram-negative-bacterium-type cell outer membrane assembly	3.53E-03	0.090185	7.465645	upregulated
GO:0046677	response to antibiotic	3.24E-03	0.090185	2.306811	upregulated
GO:0007059	chromosome segregation	3.53E-03	0.090185	7.465645	upregulated
GO:0006633	fatty acid biosynthetic process	8.66E-04	0.053513	5.455242	upregulated
GO:0015768	maltose transport	8.42E-07	0.000226	Inf	downregulated
GO:0042956	maltodextrin transport	8.42E-07	0.000226	Inf	downregulated
GO:0019645	anaerobic electron transport chain	1.89E-04	0.033824	30.97632	downregulated
GO:0008643	carbohydrate transport	6.39E-04	0.078265	3.448584	downregulated
GO:0015753	D-xylose transport	8.74E-04	0.078265	46.23496	downregulated
GO:0005978	glycogen biosynthetic process	8.74E-04	0.078265	46.23496	downregulated

2. táblázat. Szignifikáns feldúsulást mutató gén-ontológiai (GO) folyamatok az indukálódott, illetve represszálódott gének között a vad típus esetén, 1 órás ciprofloxacín kezelést követően.