

Геномний аналіз визначає мішені конвергентної позитивної селекції резистентної до протитуберкульозних препаратів мікобактерії туберкульозу*

Maha R. Farhat^{1,28}, B. Jesse Shapiro^{2–5,28}, Karen J. Kieser⁶, Razvan Sultana⁷, Karen R. Jacobson^{8,9}, Thomas C. Viktor⁹, Robin M. Warren⁹, Elizabeth M. Streicher⁹, Alistair Calver¹⁰, Alex Sloutsky¹¹, Devinder Kaur¹¹, Jemie E. Posey, Bonnie Plikaytis, Marko R. Oggioni, Jenifer L. Gardy¹⁴, James C. Jonhston¹⁵, Mabel Rodrigues¹⁶, Patrick K. C. Tang¹⁶, Midori Kato-Maeda¹⁷, Mark L. Borowsky^{18,19}, Bhavana Muddukrishna^{18,19}, Barry N. Kreiswirth²⁰, Natalia Kurepina^{2,21–23}, James Galagan^{2,21–23}, Sebastien Gagneux^{24,25}, Bruce Birren², Eric J. Rubin⁶, Eric S. Lander², Pardis C. Sabeti^{2–4,6} and Megan Murray^{26,27}

Швидкий розвиток резистентності мікобактерії туберкульозу до більшості препаратів загрожує втраченою контролю над епідемією цієї хвороби. Досі не до кінця вивчено механізми резистентності, визначені шляхом відбору резистентних штамів, та їхню генетичну мінливість. За допомогою використання 116 нових послідовностей та 7 рано виявлених послідовностей цільних геномів мікобактерії туберкульозу ми визначили геномні сигнатури позитивної селекції, характерні для 47 лікарсько-стійких штамів мікобактерій. Під час аналізу конвергентної еволюції мікобактерії туберкульозу відкрито 100 % із фрагментів відомих маркерів резистентності. Цей факт підтверджено завдяки незалежній фіксації мутації в одному й тому ж положенні нуклеотида або гена. Також ми знайшли докази позитивної селекції резистентних штамів у додаткових 39 частинах геному. Ці фрагменти кодуєть біосинтез клітинної стінки, регуляцію транскрипції і репарацію ДНК. Мутації в цих частинах геному можуть безпосередньо зумовлювати стійкість до хіміопрепаратів. Використано функціональний генетичний аналіз мутацій у гені *ropA1*, який у пробірці демонструє перевагу росту в присутності рифампіцину.

Еволюція стійких до антибіотиків бактерій є серйозним викликом охороні здоров'я в усьому світі. Для боротьби зі стійкістю інфекцій до антибіотиків потрібно розробляти не тільки нові надійні препарати, а важливо ефективніше

використовувати наявні засоби. Найчастіше резистентність кодується в бактеріальний геном, тому пов'язані з резистентністю мутації, які є безпосередньо причинами резистентності, можуть служити біомаркерами. Ці біомаркери

* Опубліковано в Nature Genetics.— Vol. 45, N 10.— P. 1183–1191.— Doi:10.1038/ng.2747.

¹Pulmonary and Critical Care Division, Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA. ²The Eli and Edythe L. Broad Institute, Cambridge, Massachusetts, USA. ³Department of Organismic and Evolutionary Biology, Faculty of Arts and Sciences, Harvard University, Cambridge, Massachusetts, USA. ⁴Center for Communicable Disease Dynamics, Harvard School of Public Health, Boston, Massachusetts, USA. ⁵ Département de Sciences Biologiques, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada. ⁶Department of Immunology and Infectious Diseases, Harvard School of Public Health, Boston, Massachusetts, USA. ⁷Department of Bioinformatics and Computational Biology, Dana-Farber Cancer Institute, Boston, Massachusetts, USA. ⁸Section of Infectious Diseases, Boston University School of Medicine, Boston, Massachusetts, USA. ⁹Department of Science and Technology/National Research Foundation Centre of Excellence for Biomedical TB Research, Medical Research Council (MRC) Centre for Molecular and Cellular Biology, Division of Molecular Biology and Human Genetics, Faculty of Medicine and Health Sciences, Stellenbosch University, Tygerberg, South Africa. ¹⁰Anglogold Ashanti Health West Vaal Hospital, Orkney, South Africa. ¹¹Massachusetts Supranational TB Reference Laboratory, University of Massachusetts Medical School, Boston, Massachusetts, USA. ¹²Division of Tuberculosis Elimination, National Center for HIV/AIDS, Viral Hepatitis, STD and TB Prevention, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, USA. ¹³Department of Genetics, University of Leicester, Leicester, UK. ¹⁴Communicable Disease Prevention and Control Services, British Columbia Centre for Disease Control, Vancouver, British Columbia, Canada. ¹⁵Clinical Prevention Services, British Columbia Centre for Disease Control, Vancouver, British Columbia, Canada. ¹⁶Mycobacteriology/TB Laboratory, Public Health Microbiology and Reference Laboratory, Provincial Health Services Authority Laboratories, British Columbia Centre for Disease Control, Vancouver, British Columbia, Canada. ¹⁷Division of Pulmonary and Critical Care, University of California, San Francisco, San Francisco, California, USA. ¹⁸Department of Molecular Biology, Massachusetts General Hospital, Boston, Massachusetts, USA. ¹⁹Department of Genetics, Harvard Medical School, Harvard University, Boston, Massachusetts, USA. ²⁰Public Health Research Institute Tuberculosis Center, Rutgers, The State University of New Jersey, Newark, New Jersey, USA. ²¹Department of Biomedical Engineering, Boston University, Boston, Massachusetts, USA. ²²Department of Microbiology, Boston University, Boston, Massachusetts, USA. ²³Bioinformatics Program, Boston University, Boston, Massachusetts, USA. ²⁴Swiss Tropical and Public Health Institute, Basel, Switzerland. ²⁵University of Basel, Basel, Switzerland. ²⁶Department of Global Health and Social Medicine, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA. ²⁷Department of Epidemiology, Harvard School of Public Health, Boston, Massachusetts, USA.

можна швидко визначити в клініці за допомогою ПЦР або новітніх методик секвенування. Вони дають змогу визначити профіль резистентності до препаратів протягом кількох годин, на відміну від звичайного ПЦР або культурального дослідження, за яких для отримання результатів потрібно кілька днів або тижнів. У деяких випадках зволікання може суттєво позначитися на успішності лікування пацієнтів.

У цій статті ми описуємо швидкий метод визначення біомаркерів резистентності до препаратів. Метод складається зі секвенування геному бактерій із різними фенотипами резистентності і застосування філогенетичних методів та статистичних тестів для позитивної селекції.

Еволюція та поширення хіміорезистентного туберкульозу загрожує зниженням ефективності програм боротьби з туберкульозом по всьому світові. Мультирезистентним туберкульозом (МРТБ) вважають такий, що стійкий до ізоніазиду і рифампіцину — двох найефективніших протитуберкульозних препаратів. За приблизною оцінкою ВООЗ, у 2010 р. виявлено 650 тис. випадків МРТБ [1]. З ростом загальної кількості випадків як МРТБ, так і туберкульозу з розширеною лікарською стійкістю (ХDR, визначений як МРТБ, також стійкий до фторхінолонів та інших ін'єкційних препаратів другої групи) хіміорезистентний туберкульоз є основним викликом сучасній медицині та вимагає удосконалення методів діагностики, спостереження і терапії.

Резистентність у мікобактерій туберкульозу, як вважають, зумовлюють послідовні точкові мутації у генах, що кодують ферменти, які активізують медикаментозну активність або власне мішені до цих медикаментів. Наявні методи молекулярної діагностики дають змогу виявити більшість відомих мутацій, які спричинюють резистентність до препаратів. Своєю чергою ефективність цих методів залежить від виявлення повного переліку згаданих мутацій. Хоча відомі мутації в генах мікобактерії туберкульозу і пояснюють виникнення резистентності до ліків, деякі мутації не було виявлено у 10–40 % клінічно стійких штамів [2], і навіть там, де мутації відомі, можливі додаткові варіанти, які сприяють резистентності до хіміотерапії.

На додаток до класичних генів, стійких до хіміопрепаратів, мутації в трьох інших генетичних класах можуть виявляти себе інакше в присутності тих чи тих препаратів. По-перше, мутації, що знижують проникність клітинної стінки або підвищують активність медикаментозної помпи, як очікується, збільшують середню інгібуючу концентрацію лікарських засобів, потенційно забезпечуючи перший крок до повної

стійкості до хіміопрепаратів [3]. По-друге, є ймовірність виникнення та селекції компенсаторних мутацій, які підвищують витрати часу на розшифрування інших мутацій, що спричинюють резистентність. Це доведено в експериментальних та клінічних дослідженнях зі створення медикаментозної стійкості [4]. По-третє, мутантні фенотипи можуть збільшити швидкість рідкісних корисних мутацій, забезпечивши ефективність медикаментозної терапії [5].

Результати дослідження

Щоб визначити генетичні маркери стійкості до препаратів, ми провели секвенування нового покоління для 116 геномних штамів мікобактерій туберкульозу чотирьох категорій:

- 1) 8 випадків епідеміологічно пов'язаних кластерів (епікластери) з розвинутою стійкістю до препаратів;
- 2) два епідеміологічно пов'язані кластери з однаковою чутливістю до препаратів;
- 3) 35 епідеміологічно не пов'язаних штамів (вбірка складалася з 6 основних клітинних ліній мікобактерій туберкульозу);
- 4) 8 штамів, які відображають стійкість у перше інфікованих людей (рис. 1а).

Ми порівняли ці дані з доступними геномами 7 штамів. Повний набір 123 штамів мікобактерії туберкульозу вміщують 47 стійких штамів хоча б до одного з протитуберкульозних препаратів, у тому ж числі 9 штамів мікобактерій туберкульозу з розширеною стійкістю. Результати охоплюють значний об'єм генетичної інформації, яка складається з 24,711 поліморфних сайтів, котрі мають стосунок до генома H37Rv. Повний філогенез генома засвідчив суттєву диференціацію між епікластерами, що підтверджено високими показниками фіксації ($F_{ST} > 0,36$) між парами епікластерів (рис. 1 б, в).

Насамперед ми визначали, чи пов'язується резистентність із відомими мутаціями, що надають стійкості до препаратів? Провели додаткове глибоке цільове секвенування відомих стійких генів, пов'язаних із резистентністю в 35 резистентних штамів (у тому числі у 15 з непевною стійкістю до мутацій та у 20, в яких стійкий до мутацій один штам). Виявили мутації у відомих детермінантах резистентності, які було пропущено під час початку повногеномного секвенування в 2 штамів. У решти 13 штамів підтверджено стійкість як мінімум до одного препарату, чого не можна пояснити відомими мутаціями.

Ми вважали, що варіанти резистентних штамів в умовах селекції можуть містити відомості про клітинні механізми, які забезпечують стійкість, а також служити біомаркерами стійкості.

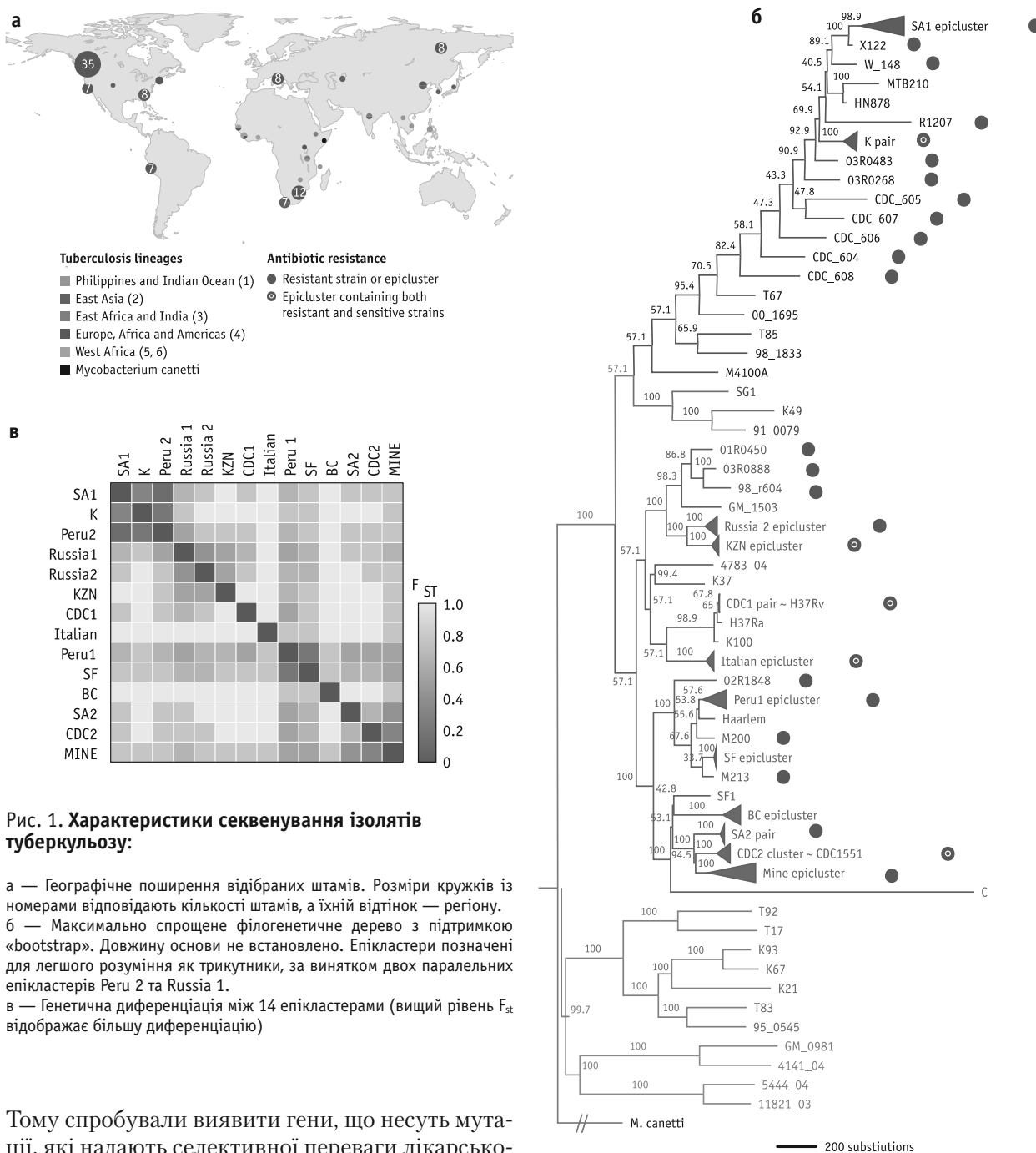


Рис. 1. Характеристики секвенування ізолятів туберкульозу:

а — Географічне поширення відібраних штамів. Розміри кружків із номерами відповідають кількості штамів, а їхній відтінок — регіону.
 б — Максимально спрощене філогенетичне дерево з підтримкою «bootstrap». Довжину основи не встановлено. Епікластери позначені для легшого розуміння як трикутники, за винятком двох паралельних епікластерів Peru 2 та Russia 1.
 в — Генетична диференціація між 14 епікластерами (вищий рівень F_{ST} відображає більшу диференціацію)

Тому спробували виявити гени, що несуть мутації, які надають селективної переваги лікарськостійким штамам. На жаль, багато тестів, що ідентифікують гени за позитивної селекції, не зовсім придатні для мікобактерій туберкульозу. Базовані на гаплотипі тести для визначення позитивної селекції, які часто використовують у людини та інших еукаріотів, не можуть бути застосовані, оскільки генетичне розмаїття у мікобактерій туберкульозу виникає головним чином через клональну експансію, а не внаслідок схрещування та гомологічної рекомбінації між штамми [6, 7]. Популярний метод dN/dS також не годиться у випадку з мікобактерією туберкульозу [8]. DN/dS метод недостатньо потужний та специфічний. Під час його застосування до нашої бази даних виявлено тільки 5 із 11 відомих детермінант резистентності за розпізнавання 143 додаткових генів.

Натомість ми прагнули використати еволюційну конвергенцію (виникнення повторних і незалежно стійких мутацій, пов'язаних зі специфічними локусами або генами) для розробки тесту з метою селекції у таких клональних бактеріальних видах, як *M. tuberculosis* [7]. Щоб визначити мутації, які самостійно виникають, реконструювали філогенетичне дерево для 123 штамів з використанням *Mycobacterium Canetti* як аутогрупу. В його основі виявили несинонімічні та некодуючі мутації послідов-

ності попередників. Тому зосередилися на несинонімічних мутаціях, оскільки, швидше за все, вони кодують функціональні зміни білків, а не їхні синонімічні аналоги. Мало того, з появою даних про те, що синонімічні аналоги також можуть підходити під селекцію адаптивних змін у експресії генів або в стабільності мРНК [6, 9], ми ввели синонімічні мутації в дослідження.

Застосували деякі запобіжні заходи, аби гарантувати, що реконструйовані генетичні зміни й стійкості в нашому аналізі не піддалися можливим помилкам у топології дерева. По-перше, реконструювали філогенії у трьох примірниках з використанням різних методологій і видалили всі не розпізнані в усіх трьох деревах мутації. Також пропустили неоднозначні мутації від попередніх реконструкцій та мутацій, які відбуваються в гілках з нижчою за 70 % підтримкою bootstrap. По-друге, щоб уникнути локальних невизначеностей у топології дерева, врахували «близькі зміни» тільки раз. Близькі зміни — це будь-які зміни, які відбулися в двох штаммах, розділених у менше ніж 98 перцентиліях за внутрішньо генетичною відстанню між епікластерами. По-третє, реалізували спрощені попарні тести секвенування, в яких порівнювали найчутливіші штами зі стійкими в кожному з восьми епікластерів, ігноруючи решту філогенезу.

На підставі результатів реконструкції ми зробили тест філогенетичної подібності (PhyC). Спочатку шукали незалежні генні мутації з більшою частотою в резистентних гілках. Потім порівнювали їх з чутливими гілками як цільовими кандидатами незалежних мутацій, щоб відрізнити конвергенцію за рахунок позитивної селекції в резистентних гілках від моделей, залежних від нейтральної еволюції [10]. Оцінили значення різниці для кожної мішені незалежної мутації через її очікуване поширення щодо розподілу на основі наявних мутацій по всій філогенії. Коротко для кожної мішені незалежної мутації з мутаціями в X-резистентних гілках та Y-чутливих гілках ввели $X + Y$ в філогенію з наявними гілками незалежно від їхньої довжини. Повторили цю перестановку 10 тис. разів, щоб мати емпіричне значення P, оцінюючи значення асоціації кожної мішені незалежної мутації з резистентністю. Ця процедура дає змогу контролювати топологію дерева, зокрема інформацію про розподіл фенотипів резистентності по дереву та частоту місцевої мутації в кожній мішені незалежної мутації.

Потім розширили PhyC-тест із певних нуклеотидних позицій, щоб охопити ген разом із міжгенними ділянками у якості мішеней. У цьому аналізі шукали гени і міжгенні ділянки з вищою

частотою незалежних мутацій, які виникають у будь-якій ділянці за довжиною генів, використовуючи підхід, описаний для сайт-специфічного тесту.

Застосовували PhyC-тест для мутацій генів і міжгенних ділянок повногеномного філогенезу 123 штамів мікобактерії туберкульозу. Для аналізу визначали стійкий фенотип резистентності до будь-якого з протитуберкульозних препаратів, які вивчають за допомогою звичайного тесту на чутливість. Так що могли б визначити мутації, пов'язані з кількома фенотипами стійкості, а також стійкі до одного з препаратів. Провели ці аналізи, щоб визначити набір штамів, стійких до кожного з п'яти протитуберкульозних препаратів першої лінії (ізоніазид, рифампіцин, піразинамід, етамбутол і стрептоміцин).

Оцінювали функціональний вплив на спостережувану мутацію через одну з мішеней незалежної мутації, визначених PhyC-тестом. Сконструювали два *ropA1* мутанти, які є носіями двох із трьох поліморфізмів (с.123C > G і с.1095G > T), що найбільш сконцентровані в резистентних штаммах. У лабораторному штамі H37Rv мікобактерії туберкульозу використовували рекомбінантний і сайт-спрямований мутагенез. Потім порівняли виживання двох мутантних штамів, що складаються з клітин немутантного типу та клітин, які не мали гена *ropA1* в умовах підвищення концентрації рифампіцину, ізоніазиду, стрептоміцину та офлоксацину.

Мішені незалежної мутації

За допомогою PhyC удалося розпізнати 11 відомих детермінант у ролі визначених мішеней незалежної мутації. Із них 9 також були ідентифіковані за допомогою слабшого, але філогенетично незалежного консервативного тесту. Крім того, нам удалося визначити 39 нових мішеней незалежної мутації, які попередньо не асоціювали з резистентністю. Складаються вони з 7 мутаційно несинонімічно заміненіх нуклеотидів, 2 некодованих нуклеотидів, 28 генів і 2 міжгенних ділянок ($p < 0,05$) (рис. 2). Всі 9 однонуклеотидних мішеней незалежної мутації можна розглядати як гени або міжгенні ділянки, що також ідентифікуються як мішені незалежної мутації. Ми помітили, що мутації в геномі резистентних гілок згруповані компактніше, ніж у чутливих гілках, і що багато мішеней незалежної мутації випадають у згаданих ділянках. Нуклеотидна алей 946T, яка кодує в гені мембранний білок Rv0218, має найбільше резистентних гілок у будь-якій мутації, які відбуваються у 8 резистентних гілках та на одній нерезистентній

($p < 0,00001$). Однак, оскільки в нашому дослідженні було більше чутливих гілок, ніж резистентних, мутації в чутливих гілках виникали значно частіше, ніж у резистентних (порівняйте червону і синю гістограми на рис. 2). Кілька мішеней незалежної мутації, які значною мірою пов'язані з резистентними гілками, також виявили в чутливих гілках. Це дослідження дає підстави припустити, що деякі мішені незалежної мутації не можуть безпосередньо зумовлювати резистентність, але здатні опосередковано надавати певні переваги резистентним штамам.

Функції відібраних локусів

Із 39 нових асоційованих геномних частин, розпізнаних PhyC, 11 відповідають за функції, пов'язані з гомеостазом клітини, а 16 належать до сімейства генів PE/PPE (становлять приблизно 10 % геному мікобактерії туберкульозу). Їхні функції невідомі, що є унікальним стосовно мікобактерії туберкульозу. Решта 12 геномних частин також мають невідомі функції. Ми систематично вивчали літературу стосовно інформації про гени, які попередньо не визнано стійкими. З'ясувалося, що деякі з них (на фізичному та генетичному рівні), взаємодіючи з відомими генами резистентності до препаратів або з медикаментозними помпами та змінюючи спадкову стійкість мікобактерій туберкульозу або нетуберкульозних мікобактерій, беруть участь у репарації, реплікації та рекомбінації ДНК або впливають на біогенез клітинних стінок.

Локуси, асоційовані з резистентністю

Під час дослідження виявлено дві нові мішені незалежної мутації, розташовані поблизу резистентних генів у геномі. Це дає змогу припустити, що вони змінюють або компенсують фенотипи мутацій у відомих генах. Першу виявлено в промоторній клітині відомого резистентно-асоційованого гена RRS, що відповідає за компонент РНК 16S рибосоми, основну діючу речовину аміноглікозидів. Другу, *groC* (рис. 3), виявлено в тому самому опероні, що й *groV*, який кодує β -субодиниці РНК-полімерази, тобто основну діючу речовину рифампіцину. *RpoC* кодує β -субодиниці і визначається як мішень компенсаторних мутацій, які модифікують природну витривалість резистентних до рифампіцину штамів мікобактерії туберкульозу та одного з видів сальмонели (*Salmonella Typhimurium*) [11–14]. Попередні дослідження дали змогу дійти висновку, що заміщається *groC* досить часто в резистентних до рифампіцину штамів із відомими *groV*-мутаціями. Окрім цього, вдалося виявити, що відносна витривалість подвійних

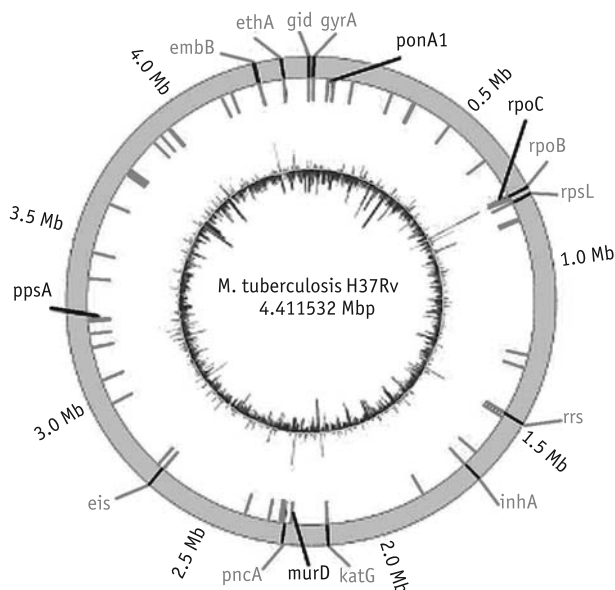


Рис. 2. Відібрані гени під час селекції в резистентних мікобактеріях туберкульозу. Круглограма розташування гена

Зовнішні чорні лінії позначають 11 асоційованих із резистентністю генів у вже згаданому геномі H37Rv (виділений сірим текстом). Внутрішні сірі лінії позначають розташування клітин незалежної мутації. Чотири нові клітини незалежної мутації, що є об'єктом дослідження, виділено текстом чорного кольору. Найглибша риска визначає кількість мутацій на ген або міжгенну ділянку в резистентному (сірому) та чутливому (чорному) штамах.

Побудовано з використанням Circos [29].

мутацій *groC* та *groV* в лабораторних умовах вища, ніж у штамів тільки з мутацією *groV* [12, 13]. Деякі *groC*-мутації у сальмонели забезпечують низький рівень резистентності до рифампіцину, даючи змогу припустити, що фенотип резистентності до рифампіцину є наслідком наявності допоміжних речовин у генах [13]. Із 43 резистентних до рифампіцину штамів у нашій колекції було 13 (30 %) прихованих *groC*-заміщень, що не траплялися в жодному чутливому до рифампіцину штамі. Ми визначали, чи може несинонімічна мутація в мішенях незалежних мутацій обґрунтувати опір 13 штамів, у яких не було набутої мутації резистентності до будь-якого відомого препарату. Для кожного препарату і штаму було визначено мутації в генах, за винятком тих, що відбуваються у чутливому до конкретного протитуберкульозного препарату штамі. Хоча не виявлено жодної мутації та гена, які могли б пояснити резистентність до того чи того протитуберкульозного препарату, два з шести штамів з канаміциновою резистентністю приховали мутації в PPE60. Із 13 штамів у 8 (62 %) виявили зміни, щонайменше, в одній мішені незалежної мутації, у 4 інших — у 2 і більше клітинах.

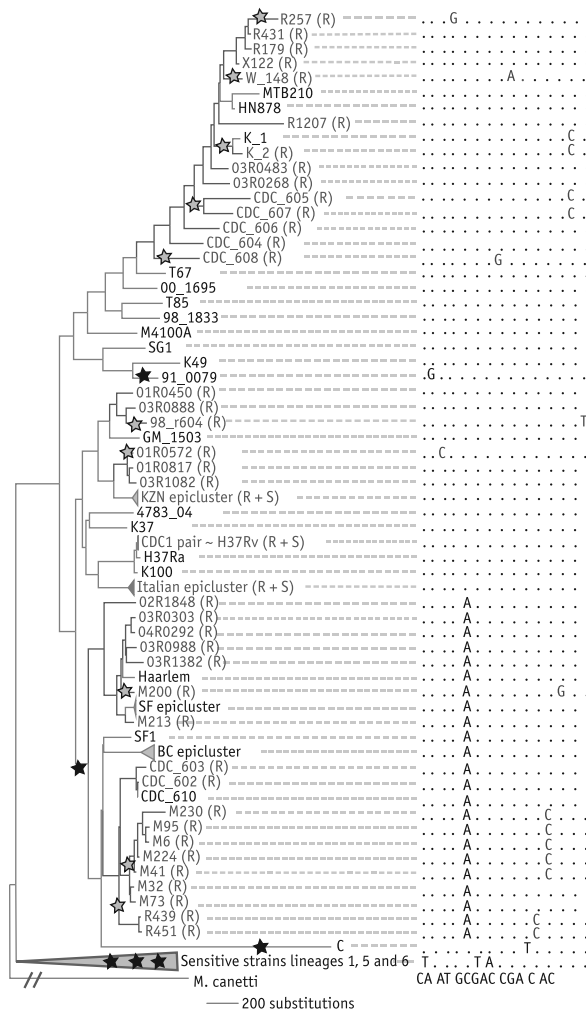


Рис. 3. Еволюційна конвергенція на генному рівні в groC
 Резистентні гілки та штамми зображено сірим, чорним показано чутливі гілки. Зірочками помічено послідовність змін у groC.

Медикаментозні помпи

Хоча медикаментозні помпи не ідентифіковано серед генів як мішені незалежної генної мутації, ми знайшли кілька, в тому числі ABC-транспортер, Rv0194 і Rv1463. Ці помпи були уражені більшою кількістю незалежних мутацій серед резистентних штамів порівняно з чутливими.

Репарація ДНК

Ще одна нова мішень незалежних мутацій — dnaQ, що кодує компонент ДНК полімерази III, який забезпечує вірогідне зчитування активності під час реплікації ДНК. Кілька мутацій *Escherichia coli* призвели до створення сильних мутантних фенотипів [15]. Досі не описано схожих фенотипів у мікобактерій туберкульозу, хоча dnaQ-варіації не рідкісні серед клінічних штамів [16].

Сімейство генів PE/PPE як мішені незалежної мутації

Шістнадцять нових мішеней незалежної мутації є членами сімейства PE/PPE з більшістю представників підродино PGRS. Більшість членів цього сімейства кодуєть поверхневі білки мембрани клітини, деякі впливають на структуру клітинної мембрани та її проникність [17]. У складі PE/PPE-генів міститься величезна кількість заміщених, тому їх вилучено з повногеномного філогенезу. Внаслідок цього згадані гени можуть бути збагачені великою кількістю суперечливих сигналів (гомоплазій), хоча це не означає, що за появи гомоплазій з'являтиметься стійкість. Тому слід звернути увагу на зв'язок генів сімейства PE/PPE зі стійкістю. Завдяки розмаїттю цих генів їхнє об'єднання може зумовити випадкову фіксацію під час навмисного зменшення популяції, яке відбувається під час протитуберкульозної терапії частіше, ніж позитивний відбір серед стійких штамів. Іншими словами, стійкість штамів може передаватися у спадок від тих, що вижили під час навмисного зменшення популяції, коли нейтральні мутації стають стабільними. Нейтральні мутації найлегше спостерігати в різних локусах, особливо таких, як PE/PPE-гени. Проте ми не можемо заперечити роль PE/PPE-генів у розвитку стійкості. Наприклад, ген PPE60 є одним із найкращих кандидатів для вивчення деяких непояснених стійких до канаміцину штамів.

Гомеостаз клітинної стінки

Біогенезу клітинної стінки мікобактерії туберкульозу або її реконструкції сприяють 5 нових мішеней незалежної мутації. Структура клітинної стінки мікобактерій є унікальною серед прокариот, бо на додаток до шару пептидогліканів, характерного для більшості бактерій, містить кілька зовнішніх шарів, які складаються з незвичайних та складних ліпідів. Ці шари утворюють бар'єр, котрий є основою для стійкості більшості мікобактерій до протитуберкульозних препаратів [18]. Більшість із них впливають на структури клітинної стінки. Також багато з відомих генів, пов'язаних зі стійкістю, кодуєть ферменти ліпідних шляхів у клітинній стінці. Три з п'яти генів (ppsA, pks12 та pks3), які беруть участь у біосинтезі і транслокації, розташовані на поверхні ліпідів із фтицеролу димікоцерозатом (PDIM) включно, водночас як інші два (murD та ropA1) сприяють біосинтезу і гомеостазу пептидогліканів (компоненти клітинної стінки) [22]. Делеція ppsA і виснаження pks12 або ropA1 впливає на чутливість до антибіотиків нетуберкульозних мікобактерій або мікобакте-

рій туберкульозу [23 – 25]. Делеція *rks12* призвела до ремодулювання шляхів клітинної стінки та підвищення резистентності до препаратів у *Mycobacterium avium* [26]. На додаток до цього *rks12* мав синонімічну ділянку – важливу мішень незалежної мутації.

Функціональний аналіз мутантів *ropA1*

У разі концентрації рифампіцину 0,00125 мкг/мл штам, який несе мутацію в *ropA1* с.1095G > T, має в 4–6 разів більшу перевагу над немутантними штамми. Розраховано мінімальну концентрацію для цього мутанта – 0,0025 мкг/мл, яка в 2 рази вища, ніж потрібна для немутантного штаму (0,00125 мкг/мл). Порівняно зі штамом, який несе мутацію в *ropA1* с.123C > G під впливом рифампіцину, мутант не показав переваги в зростанні під впливом ізоніазиду, стрептоміцину або офлоксацину. С.1095-нуклеотид, розташований поряд із ділянкою *ropA1* транспептидази, може призвести до інактивації ферментативної активності. Це підтверджується тим, що після видалення мутанта *ropA1* зберігається фенотип стійкості до рифампіцину (рис. 4).

Висновки

У роботі описано повногеномний скринінг біомаркерів для генів, відібраних серед штамів резистентності до препаратів мікобактерій. Метод придатний для різних мікроорганізмів із різними фенотипами. Полягає в секвенуванні геномів бактерії з різними фенотипами (в даному разі – стійкості до антибіотиків), змінюючи філогенез та ідентифікуючи мішені конвергентної еволюції за допомогою простого статистичного тесту. Цей метод селекції високочутливий та дає змогу відобразити всі 11 маркерів стійкості до препаратів. Зазвичай рекомбінантні ділянки дуже відрізняються від виявів усього генома, а за згаданим методом можна встановити односпрямовані ознаки, якщо вони пов'язані з фенотипом, але не тоді, коли розподілені безладно. Тому можна досліджувати тільки бактерії з певними діапазоном швидкості та частоти перебудови фенотипу. Це забезпечує швидке та ефективне ідентифікування молекулярних біомаркерів, які є предикторами потенційно цікавих для дослідження фенотипів.

Метод використано для дослідження мікобактерій туберкульозу: вилучено 39 генів та міжгенних ділянок, пов'язаних зі стійкістю. Також деякі з відібраних мутацій проходять у генах, близьких до локусів, пов'язаних зі стійкістю до препаратів. Переважно це ті гени, які мають ділянки, пов'язані з фенотипами проникності клітинної стінки. Цей факт дає підстави припустити, що фенотипи стабільності стінки до пре-

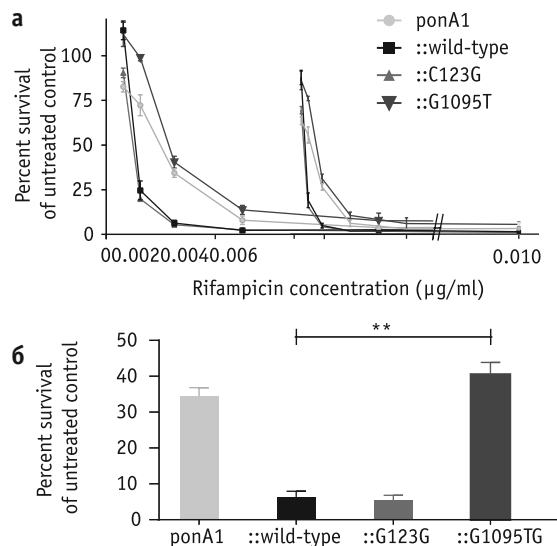


Рис. 4. Бактеріальна виживаність мутанта *ropA1* під дією рифампіцину:

а — в умовах підвищення його концентрації;
б — штамів, вирощених під дією 0,00125 мкг/мл рифампіцину

паратів можуть еволюціонувати за допомогою комплексу поетапних процесів, зокрема ремодулювання клітинної стінки. Тобто за цією моделлю *ropA1* визначають як незалежну мутацію переважно в присутності рифампіцину.

Стосунок ремодулювання клітинної стінки до хіміорезистентності також доведено в двох останніх дослідженнях, у яких порівнювали стійкі штамми з їхніми чутливими попередниками. У першому помітили збільшення рівня білка PDIM та пептидогліканових попередників із посиленням активності біосинтезу оперона PDIM у стійких до рифампіцину штаммах. Цікаво, що було визначено також фосфоенолпіруват синтазу (PPSA) як мішень незалежної мутації в штаммах, стійких до рифампіцину (95 % мали непов'язані мутації у гені *groV*). Друге дослідження встановило появу ще 11 непов'язаних мутацій у послідовності штамів мікобактерії туберкульозу, виділених від трьох пацієнтів, у яких під час хвороби сформувалася стійкість до протитуберкульозних препаратів. Сім мутацій відбулися в генах, що беруть участь у транспорті або біосинтезі клітинної стінки, в тому числі у *fadD32* та *Rv1739c*, та кодують транспортний білок ABC. Хоча ні один із цих генів не пов'язується з мішенями незалежної мутації, визначеними в пропонуваному дослідженні. Виявлено доповнення мутацій у генах, пов'язаних з біосинтезом клітинної стінки, серед прогресуючих резистентних штамів. Ці факти не суперечать висновкам експертів і підтверджують гіпотезу, що всі перераховані вище зміни відображають пристосування мікобактерій туберкульозу до дії хіміопрепаратів.

Список літератури

- World Health Organization Global tuberculosis report 2011 // WHO.— Geneva: WHO, 2011.
- Campbell P.J. et al. Molecular detection of mutations associated with first- and second-line drug resistance compared with conventional drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* // *Antimicrob. Agents Chemother.*— 2011.— N 55.— P. 2032–2041.
- Nikaido H. Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux // *Science.*— 1994.— N 264.— P. 382–388.
- Schrag S.J., Perrot V., Levin B.R. Adaptation to the fitness costs of antibiotic resistance in *Escherichia coli*. // *Proc. Biol. Sci.*— 1997.— N 264.— P. 1287–1291.
- Denamur E., Matic I. Evolution of mutation rates in bacteria // *Mol. Microbiol.*— 2006.— N 60.— P. 820–827.
- Namouchi A., Didelot X., Schöck U. et al. After the bottleneck: genome-wide diversification of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by mutation, recombination, and natural selection // *Genome Res.*— 2012.— N 22.— P. 721–734.
- Shapiro B.J., David L.A., Friedman J., Alm E.J. Looking for Darwin's footprints in the microbial world // *Trends Microbiol.*— 2009.— N 17.— P. 196–204.
- Kryazhimskiy S., Plotkin J.B. The population genetics of dN/dS // *PLoS Genet.*— 2008.— N 4.— P. e1000304.
- Agashe D., Martinez-Gomez N.C., Drummond D.A., Marx C.J. Good codons, bad transcript: large reductions in gene expression and fitness arising from synonymous mutations in a key enzyme // *Mol. Biol. Evol.*— 2013.— N 30.— P. 549–560.
- Rokas A., Carroll S.B. Frequent and widespread parallel evolution of protein sequences // *Mol. Biol. Evol.*— 2018.— N 25.— P. 1943–1953.
- Casali N. et al. Microevolution of extensively drug-resistant tuberculosis in Russia // *Genome Res.*— 2012.— N 22.— P. 735–745.
- Comas I. et al. Whole-genome sequencing of rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains identifies compensatory mutations in RNA polymerase genes // *Nat. Genet.*— 2012.— N 44.— P. 106–110.
- Brandis G., Wrande M., Liljas L., Hughes D. Fitness-compensatory mutations in rifampicin-resistant RNA polymerase // *Mol. Microbiol.*— 2012.— N 85.— P. 142–151.
- de Vos M. et al. Putative compensatory mutations in the rpoC gene of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* are associated with ongoing transmission // *Antimicrob. Agents Chemother.*— 2013.— N 57.— P. 827–832.
- Tanabe K., Kondo T., Onodera Y., Furusawa M. A conspicuous adaptability to antibiotics in the *Escherichia coli* mutator strain, dnaQ49 // *FEMS Microbiol. Lett.*— 1999.— N 176.— P. 191–196.
- Dos Vultos T., Mestre O., Tonjum T., Gicquel B. DNA repair in *Mycobacterium tuberculosis* revisited // *FEMS Microbiol. Rev.*— 2009.— N 33.— P. 471–487.
- Soldini S. et al. PPE₁MPTR genes are differentially expressed by *Mycobacterium tuberculosis* in vivo // *Tuberculosis (Edinb.)*— 2011.— N 91.— P. 563–568.
- Kaur D., Guerin M.E., Skovierov H. et al. Chapter 2: biogenesis of the cell wall and other glycoconjugates of *Mycobacterium tuberculosis* // *Adv. Appl. Microbiol.*— 2009.— N 69.— P. 23–78.
- Yu J. et al. Both phthiocerol dimycocerosates and phenolic glycolipids are required for virulence of *Mycobacterium marinum*. // *Infect. Immun.*— 2012.— N 80.— P. 1381–1389.
- Matsunaga I. et al. *Mycobacterium tuberculosis* pks12 produces a novel polyketide presented by CD1c to T cells. // *J. Exp. Med.*— 2004.— N 22.— P. 1559–1569.
- Dubey V.S., Sirakova T.D., Kolattukudy P.E. Disruption of msl3 abolishes the synthesis of mycolipanoic and mycolipenic acids required for polyacyltrehalose synthesis in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and causes cell aggregation // *Mol. Microbiol.*— 2002.— N 45.— P. 1451–1459.
- Hett E.C., Chao M.C., Rubin E.J. Interaction and modulation of two antagonistic cell wall enzymes of mycobacteria // *PLoS Pathog.*— 2010.— N 6.— P. e1001020.
- Billman-Jacobe H., Haites R.E., Coppel R.L. Characterization of a *Mycobacterium smegmatis* mutant lacking penicillin binding protein 1 // *Antimicrob. Agents Chemother.*— 1999.— N 43.— P. 3011–3013.
- Philalay J.S., Palermo C.O., Hauge K.A. et al. Genes required for intrinsic multidrug resistance in *Mycobacterium avium*. // *Antimicrob. Agents Chemother.*— 2004.— N 48.— P. 3412–3418.
- Chavadi S.S. et al. Inactivation of tesA reduces cell wall lipid production and increases drug susceptibility in mycobacteria // *J. Biol. Chem.*— 2011.— N 286.— P. 24616–24625.
- Bisson G.P. et al. Upregulation of the phthiocerol dimycocerosate biosynthetic pathway by rifampin-resistant, rpoB mutant *Mycobacterium tuberculosis* // *J. Bacteriol.*— 2012.— N 194.— P. 6441–6452.
- Sun G. et al. Dynamic population changes in *Mycobacterium tuberculosis* during acquisition and fixation of drug resistance in patients // *J. Infect. Dis.*— 2012.— N 206.— P. 1724–1733.
- Shigemura K. et al. Presence of a mutation in ponA1 of *Neisseria gonorrhoeae* in numerous clinical samples resistant to various β -lactams and other, structurally unrelated, antimicrobials // *J. Infect. Chemother.*— 2005.— N 11.— P. 226–230.
- Nguyen H.T., Wolff K.A., Cartabuke R.H. et al. A lipoprotein modulates activity of the MtrAB two-component system to provide intrinsic multidrug resistance, cytokinetic control and cell wall homeostasis in *Mycobacterium* // *Mol. Microbiol.*— 2010.— N 76.— P. 348–364.
- Jiang X. et al. Comparison of the proteome of isoniazid-resistant and -susceptible strains of *Mycobacterium tuberculosis* // *Microb. Drug Resist.*— 2006.— N 12.— P. 231–238.
- Sandgren A. et al. Tuberculosis drug resistance mutation database // *PLoS Med.*— 2009.— N 6.— P. e2.
- Nessar R., Reyrat J.M., Murray A., Gicquel B. Genetic analysis of new 16S rRNA mutations conferring aminoglycoside resistance in *Mycobacterium abscessus* // *J. Antimicrob. Chemother.*— 2011.— N 66.— P. 1719–1724.

M.R. Farhat, B.J. Shapiro, K.J. Kieser, R. Sultana, K.R. Jacobson, T.C. Victor, R.M. Warren, E.M. Streicher, A. Calver, A. Sloutsky, D. Kaur, J.E. Posey, B. Plikaytis, M.R. Oggioni, J.L. Gardy, J.C. Johnston, M. Rodrigues, P.K.C. Tang, M. Kato-Maeda, M.L. Borowsky, B. Muddukrishna, B.N. Kreiswirth, N. Kurepina, J. Galagan, S. Gagneux, B. Birren, E.J. Rubin, E.S. Lander, P.C. Sabeti & M. Murray

Геномний аналіз визначає мішені конвергентної позитивної селекції резистентної к противотуберкульозним препаратам мікобактерії туберкульоза

Швидке розвиток резистентності мікобактерії туберкульоза к більшості препаратів грізят втрат контролю над епідемією цієї хвороби. До сих пор не до кінця вивчені механізми резис-

тентности, определенные путем отбора резистентных штаммов, и их генетическая изменчивость. Посредством использования 116 новых последовательностей и 7 рано выявленных последовательностей цельных геномов микобактерий туберкулеза мы определили геномные сигнатуры положительной селекции, характерные для 47 лекарственно-устойчивых штаммов микобактерий. При анализе конвергентной эволюции микобактерии туберкулеза открыто 100 % из фрагментов известных маркеров резистентности. Этот факт подтвержден благодаря независимой фиксации мутации в одном и том же положении нуклеотида или гена. Также мы нашли доказательства положительной селекции резистентных штаммов в дополнительных 39 частях генома. Эти фрагменты кодируют биосинтез клеточной стенки, регуляцию транскрипции и репарацию ДНК. Мутации в этих частях генома могут непосредственно вызывать устойчивость к химиопрепаратам. Использован функциональный генетический анализ мутаций в гене *ponA1*, который в пробирке демонстрирует преимущество роста в присутствии рифампицина.

M.R. Farhat, B.J. Shapiro, K.J. Kieser, R. Sultana, K.R. Jacobson, T.C. Victor, R.M. Warren, E.M. Streicher, A. Calver, A. Sloutsky, D. Kaur, J.E. Posey, B. Plikaytis, M.R. Oggioni, J.L. Gardy, J.C. Johnston, M. Rodrigues, P.K.C. Tang, M. Kato-Maeda, M.L. Borowsky, B. Muddukrishna, B.N. Kreiswirth, N. Kurepina, J. Galagan, S. Gagneux, B. Birren, E.J. Rubin, E.S. Lander, P.C. Sabeti & M. Murray

Genomic analysis identifies targets of convergent positive selection in drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*

Mycobacterium tuberculosis is successfully evolving antibiotic resistance, threatening attempts at tuberculosis epidemic control. Mechanisms of resistance, including the genetic changes favored by selection in resistant isolates, are incompletely understood. Using 116 newly and 7 previously sequenced *M. tuberculosis* genomes, we identified genome wide signatures of positive selection specific to the 47 resistant genomes. By searching for convergent evolution, the independent fixation of mutations at the same nucleotide site or gene, we recovered 100 % of a set of known resistance markers. We also found evidence of positive selection in an additional 39 genomic regions in resistant isolates. These regions encode pathways of cell wall biosynthesis, transcriptional regulation and DNA repair. Mutations in these regions could directly confer resistance or compensate for fitness costs associated with resistance. Functional genetic analysis of mutations in one gene, *ponA1*, demonstrated an in vitro growth advantage in the presence of the drug rifampicin.

Контактна інформація:

Correspondence should be addressed to M.R.F. (mrfarhat@partners.org) or M.M. (mmurray@hsph.harvard.edu).