

MEHANIZMI PRENOŠENJA REZISTENCIJE KOD BAKTERIJA

Maja Velhner *, Jelena Petrović, Igor Stojanov, Radomir Ratajac, Dragica Stojanović
Naučni institut za veterinarstvo «Novi Sad», Novi Sad, Rumenački put 20

Kratak sadržaj

Široka upotreba antimikrobnih agenasa uzrokovala je da bakterije koriste specifične gene i da menjaju genetičku strukturu kako bi preživele u prirodi. U ovom radu su ukratko opisani lateralni transfer gena, mobilni genetički elementi, rezistencija prenosiva putem plazmida kao i uloga spontanijih mutatora u nastanku rezistencije. Pošto bakterije na vrlo snalažljiv način prenose genetički materijal u okviru njihovog carstva, postavlja se pitanje da li će u budućnosti biti moguće da se infekcije uzrokovane mikroorganizmima drže pod kontrolom.

Ključne reči: rezistencija, integroni, transpozoni, mutatori

MECHANISMS OF RESISTANCE TRANSFER IN BACTERIA

Maja Velhner, Jelena Petrović, Igor Stojanov, Radomir Ratajac, Dragica Stojanović
Scientific Veterinary Institute „Novi Sad“, Novi Sad, Rumenački put 20

Abstract

Wide application of antimicrobial agents forces bacteria to utilize specific genes and rearrange genomic structure in order to survive in the environment. In this article lateral gene transfer, mobile genetic elements, plasmid mediated resistance and spontaneous mutators in bacteria are briefly described. This resourceful means, by which microorganisms manage to communicate and transfer genetic material in their own kingdom, raises concerns about the possibility to keep microbial infections under control in the future.

Key words: resistency, integrons, transposones, mutators

* E-mail: maja@niv.ns.ac.rs

UVOD

Upotreba antimikrobnih agenasa u profilaktičke i terapijske svrhe uzrokovala je pojavu rezistencije mikroorganizama na antibiotike. Bakterije su tokom evolucije razvile mnogobrojne mehanizme preko kojih neutrališu uticaj antimikrobnih agenasa. Takođe, preko specifičnih gena fenotipske osobine bakterija, poput rezistencije, mogu da se prenose između i unutar vrsta što može da rezultira njihovim interkontinentalnim širenjem. Smatra se da je lanac proizvodnje hrane glavni izvor patogenih ili nepatogenih rezistentnih bakterija. Lateralni transfer genetičkog materijala koji determiniše rezistenciju može uzrokovati prenošenje rezistencije u svim ekološkim nišama. Profesor Bennett ističe da se na osnovu današnjih naučnih saznanja o načinu sticanja i prenošenja rezistencije može pretpostaviti da će tokom evolucije bakterije uvek pronaći načine da razviju mehanizme kojima će favorizovati sopstveni opstanak (Bennett 1999). Takođe ističe da ukoliko upotreba antimikrobnih agenasa ne bude strogo kontrolisana, u budućnosti neće biti moguće stvoriti aseptične uslove prilikom izvođenja hirurških zahvata. Ovako alarmantna situacija je uslovila potrebu za nalaženjem novih antimikrobnih agenasa i drugih načina koji bi doprineli da se infekcije uzrokovane bakterijama održe pod kontrolom.

Lateralni transfer gena i njegova uloga u evoluciji bakterija

Lateralni transfer gena upakovanih u mobilne genetičke elemente jedna je od osobina bakterija koja obezbeđuje njihovo preživljavanje u uslovima izmenjene sredine. Međutim „nove” osobine koje se prenose na ovaj način ne moraju bezuslovno da se održe u prirodi. Mehanizmi popravka (MMR) mogu da eliminišu gene koji se prenose homolognom rekombinacijom. Dakle, čak i u relativno povoljnim uslovima za izmenu genetičkog materijala, poput rekombinacije između bliskih vrsta sa sekvencama visoke homologije, nije uvek moguć opstanak izmenjenih bakterija u životnoj sredini. Da bi se nova osobina održala, potrebno je da ćelija primalac prihvati novi genetički materijal, da ga ugradi u genom i eskprimira na način koji će biti od koristi za novi mikroorganizam (Ochman i sar., 2000). Postoje tri mehanizma preko kojih se odvijaju procesi prenosa genetičkog materijala: transformacija, transdukcija i konjugacija. Tokom procesa transformacije, ogoljena DNK iz životne sredine ugrađuje se u hromozom preko specifičnih sekvenci za prepoznavanje. Transdukcijom se naziva prenos genetičkog materijala u drugu bakterijsku ćeliju preko bakteriofaga. Prenos genetičkog materijala u jednom ciklusu razmnožavanja je limitiran na 100 kb i takođe je uslovljen receptorima za bakteriofag na zidu bakterijske ćelije. Za oba procesa nije neophodno blisko prisustvo donorske ćelije i ćelije recipijenta. Prema tome, bakterije mogu inkorporirati novu fenotipsku osobinu iz životne sredine. Proces konjugacije, međutim, podrazumeva da se dve bakterijske ćelije spoje i razmene

genetički materijal. Razmena genetičkog materijala se odigrava preko konjugabilnih plazmida koji su u sastavu ćelije kao slobodni elementi ili su ugrađeni u hromozom. Takođe do izmene genetičkog materijala može da dođe i preko konjugabilnih transpozona, koji kodiraju proteine neophodne za proces razmene genetičkog materijala sa donorske ćelije na ćeliju recipijenta. Prenos gena će biti uspešan ukoliko se genetički materijal stabilno integriše u genom recipijenta. Proces stabilne integracije genetičkog materijala se odigrava preko epizoma, homologne rekombinacije, putem integracije u hromozom pod uticajem integreza, bakteriofaga ili transposaza ili putem popravka dvostrukih prekida na DNK. Proces ugradnje novih gena prati takođe i proces delecije onih gena koji nisu korisni za mikroorganizam (Ochman i sar., 2000).

Mobilni genetički elementi

Prenošenje genetičkog materijala sa jedne ćelije ili jednog dela DNK na drugi, sa jednog plazmida na drugi ili sa plazmida na hromozom, vrši se putem mobilnih genetičkih elemenata - transpozona. Na krajevima transpozona nalaze se insercione sekvence (IS) koje se sastoje od direktnih ili obrnutih ponovaka koji omogućavaju mobilnost i ugradnju genetičkog materijala kao i njegovu stabilnost (Bennett 2008). U centru transpozona nalaze se geni za rezistenciju. Postoje dve klase transpozona. U klasu 1 spadaju transpozoni koji se transkribuju u RNK i potom se putem reverzne transkripcije prevode u DNK molekul koji može da se ugradi u hromozom bakterijske ćelije. Klasa 2 transpozona koristi enzim transposazu kako bi gene za rezistenciju mogla da premešta duž hromozoma, ili sa jedne ćelije na drugu, mehanizmom rekombinacije. Kako transpozoni mogu da se prenose sa jednog DNK molekula na drugi, istim mehanizmom mogu da se ugrade u plazmide. Ukoliko specifični geni u okviru transpozona kodiraju rezistenciju na više antimikrobnih agenasa nastaje multiplo-rezistentni fenotip. Bakterije sa plazmidima koji kodiraju multiplu rezistenciju uzrokuju velike probleme u humanoj medicini zbog pojava tvrdokornih bolničkih infekcija koje se teško leče antimikrobnim agensima. Takođe je poznato da su neke bakterije, nosioci multiplerezistentog fenotipa, interkontinentalno raširene i nađene u raznim ekološkim nišama u lancu proizvodnje hrane.

Integroni

Integroni su genetički elementi koji su integrisani u hromosome, transpozone ili plazmide. Konstruisani su tako da mogu da prime, odnosno ugrade, jednu ili više genetičkih kaseti, nosioca gena za rezistenciju. Geni za rezistenciju se ugrađuju u bakterijski genom mehanizmom rekombinacije. Rekombinacija se obavlja delovanjem enzima integreza koju kodiraju *intI1* geni. Ispred *intI1* gena na krajevima koji se oslanjaju na sekvencu transpozona, nalazi se konzervisana nekodirajuća sekvenca

obrnutih ponovaka od 25 baznih parova (bp) i ima oznaku IRI. IRI je zapravo obrnuta sekvenca IRT sekvence koja se nalazi na desnom kraju integrona klase 1. Ove sekvence predstavljaju mesta prepoznavanja transpozaza koji omogućavaju premeštanje integrona klase 1 i označavaju početak i kraj sekvence integrona (Stokes i sar., 2006). Do danas je poznato preko 100 genetičkih kaseti čija ugradnja se odvija preko receptora oznake *attL*, smeštenih na integronima. Na genetičkim kasetama se nalazi element od 59 nukleotida koji prepoznaje *attL* i ima ulogu u procesu rekombinacije. Zavisno od vrste i broja genetičkih kaseti koje su »upakovane» u integrone, rezistencija na više antimikrobnih agenasa može biti prenosiva. Prenosivi genetički elementi su nađeni kod velikog broja kliničkih izolata gram negativnih bakterija, kao i komensala izolovanih iz životinja koji se uzgajaju na farmama (Bennett 1999). Integroni klase I se takođe mogu naći i kod gram pozitivnih bakterija (Xu i sar., 2007, Kazama i sar., 1998). Hromozomski integrisani integroni su u evolucionom smislu od velikog značaja. Nađeni su kod bakterija iz uzoraka zemlje i iz sedimenta jezerskih voda koje nisu mogle doći u kontakt sa antimikrobnim agensima. Genetička konstrukcija nekih od ovih integrona klase 1 ukazuje da njihov nastanak i poreklo datira mnogo pre ere primene antibiotika. Takođe je jedna od pretpostavki da su integroni bili ugrađeni u bakterijski genom pre integracije sa transpozicionim elementima transpozona (Stokes i sar., 2006).

Plazmidski prenosiva rezistencija

Plazmidi se mogu prenositi sa jedne bakterijske ćelije na drugu. Oni se replikuju nezavisno od bakterijskog hromozoma iako za replikaciju koriste mehanizme ćelije domaćina. Plazmidi sadrže gene koji su važni za opstanak bakterijske ćelije, poput gena za virulenciju, gena za rezistenciju, gena koji učestvuju u mehanizmima popravke DNK i drugih. Iz tog razloga su plazmidi važni dodatni elementi bakterijske ćelije koji svojim aktivnostima omogućavaju da se neke osobine bakterija prenose sa generacije na generaciju i sa vrste na vrstu. Najupečatljiviji način prenosa plazmida sa ćelije donora na ćeliju recipijenta je konjugacija. Ovaj proces se odigrava preko niza genetičkih funkcija bakterijskih ćelija. Konjugabilni plazmidi su obično veličine od 30 do 100 kb (kilobaza), a mogu biti i veći (preko 250 kb). Njihova funkcija je pored ostalog da kodiraju proteine koji omogućavaju spajanje i prenos genetičkog materijala sa ćelije na ćeliju. Postoje i mobilni plazmidi koji su manji, veličine oko 10 kb, i nemaju funkciju konjugacije, ali kodiraju funkcije koje su neophodne za prenos sopstvene DNK (Bennett 2008). Sa plazmida se genetički materijal koji kodira rezistenciju može prenositi preko transpozona ili integrona. Takođe transfer gena može da se vrši rekombinacijom preko ISCR elemenata. Prenos genetičkog materijala preko ovih malih kriptičnih sekvenci sličnih IS elementima vrši se mehanizmom koji se naziva kotrljajući obruč (rolling circle). Na kraju sekvence ISCR elemenata se nalaze

terminalne sekvence (*oriIS* i *terIS*), koje se razlikuju od terminalne sekvence IS elemenata, a važne su za mobilizaciju genetičkog materijala. Na terminalnu sekvencu se nasumičnim izlaganjem može naslanjati integron klase 1 koji nosi sa sobom gene za rezistenciju. Zahvaljujući ovakvom genetičkom sklopu, geni koji kodiraju rezistenciju na veći broj antimikrobnih agenasa mogu da se prenose između bakterija od kojih se samo mali broj zadrži i opstane u prirodi (Bennet 2008).

Tabela 2: Plazmid pMG252 sa genima za rezistenciju i njihova funkcija

Antibiotik	Način delovanja	Geni koji kodiraju rezistenciju	Funkcija gena za rezistenciju
b-laktami	Inhibiraju sintezu peptidoglikana	<i>bla</i>	Kodiraju b-laktamaze, enzime koji otvaraju b-laktamski prsten i inaktiviraju antibiotik
Hinoloni	Vezuju se za kompleks Topoizomerase tip II ili IV sa DNK i blokiraju sintezu DNK	<i>gyrA</i> , <i>gyrB</i> , <i>parC</i> i <i>parE</i>	Mutacije na genima omogućavaju vezivanje antibiotika za kompleks DNK i topoizomerase, replikacija bakterije se nastavlja
Hloramfenikol	Vezuje se za 50S subjedinicu ribozoma i inhibira peptidil transferazu	<i>cat</i>	Kodira acetiltransferazu koja inaktivira hloramfenikol i sprečava njegovo vezivanje za ribozom
Efluks pumpa	Membranski proteini koji izbacuju toksične supstance iz bakterijske ćelije	<i>qacEΔ1</i>	Pojačanom ekspresijom uzrokuje uklanjanje toksičnih supstanci iz bakterijske ćelije
Sulfonamidi	Inhibiraju enzim DHPS	<i>sulI</i>	Kodira DHPS sa niskim afinitetom na sulfonamide

Uloga mutatora u nastajanju rezistencije

Bakterijski genom kodira čitav niz enzima koji imaju zadatak da ispravljaju greške tokom replikacije DNK. Oštećenja na genima koji kodiraju neke od ovih enzima uzrokuju povećan nivo mutacija i promenu fenotipskih osobina bakterija. Enzimi za-

duženi za ispravljanje grešaka u bakterijskom genomu su označeni sa Mut(X). U osnovi postoje tri glavna mehanizma reparacije nastalih mutacija. Popravlak oštećenja na bakterijskoj DNK koji nastaje zahvaljujući reaktivnim kiseonikovim molekulima (oxidative damage), regulišu kod *E. coli* enzimi oznake MutT, MutM i MutY. Naime, inducibilni reaktivni enzimi bakterija redukuju nivo 8-oxo-dG (2'-deoxy-7,8-dihydro-8-oxoguanosine), koji nastaje tokom metabolizma bakterijske ćelije ili je egzogenog porekla. 8-oxo-dG (GO lezija) se vezuje za adenin i uzrokuje transverzije G:C * T:A. MutM protein popravlj GO leziju i omogućava ponovno uspostavljanje G:C baznog para dok MuY uklanja bazu A iz GO lezije ostavljajući prostor da se inkorporira baza C. Kod mutatora *E. coli* kojoj nedostaje MutT protein ustanovljena je transverzija G:C * T:A. MutT kodira hidrolazu koja konvertovanjem 8-oxodGTP u 8-oxodGMP sprečava inkorporiranje GO u DNK. Ukoliko nema sinteze MutT dolazi do pogrešnog sparivanja sa A i gore navedene transverzije, Miller (1996). Čelije koje nemaju MutT su jaki mutatori kao i ćelije sa promenjenom funkcijom MutM i MutY proteina. Eksperimentalno je pokazano da se nivo mutacija bakterijske DNK smanjuje ukoliko se izazove smanjena sinteza MutT proteina, a poveća produkcija MutM i MutY. Sledeći mehanizam popravka nepravilnog sparivanja (Methyl directed mismatch repair MMR) regulisan je preko proteina oznake MutS MutL MutH i UvrD za bakterije *E. coli* i *Salmonella*. MMR mehanizam treba da prepozna nepravilno sparene nukleotide, prepozna stari i novi DNK lanac, iseče nepravilno spareni nukleotid sa novog DNK lanca i popravi grešku. Treći mehanizam popravke mutacija kod bakterija je kontrolno očitavanje (proof reading) pogrešno sparenih baza a odigrava se preko egzonukleaza koje kodiraju bakterijske ćelije. Regulacija „proof reading“ sistema vrši se preko MutD proteina kod *E. coli*. Mutacije na ovom proteinu dovode do pojave izrazitog mutatorskog fenotipa. Mogu se dogoditi spontano, ali najčešće nastaju u određenom kliničkom ambijentu, gde bakterije opstaju kao mutatori duže ili kraće vreme. Broj mutatorskih ćelija može biti umereno ili višestruko povećan zavisno od vrste bakterije i faktora sredine koji su uzrokovali pojavu mutacije (revijalni prikaz Chopra i sar., 2003).

Vrste mutacija na genima

Silent	TCC → TCT	Nema promene na nivou proteina
Missense	CTC → CCC	Menja se amino kiselina što dovodi do promene aminokiselinske sekvence proteina, a time i njegove sekundarne i tercijarne strukture

Nonesence mutation	CAG → TAG	Promena amino kiseline u stop kodon, što dovodi do skraćenja proteina i najčešće gubitka funkcije proteina
Ochre	CAA → TAA	Mutacija koja dovodi do pojave stop kodona ochra (UAA/TAA)
+1Frameshift/ Insertion	CCCC → CCCCC	Dodatak nukleotida menja okvir čitanja i može dovesti do sinteze nefunkcionalnog proteina
-1Frameshift/ Deletion	CCC → CC	Gubitak nukleotida, menja okvir čitanja, može dovesti do sinteze nefunkcionalnog proteina

Ako se u populaciji bakterija nađu spontani mutatori, ovakvi mikroorganizmi obično nemaju selekcionu prednost. U laboratorijskim uslovima je dokazano da bakterije koje nose mutacije na genima za popravak DNK, posle kultivisanja *in vitro* preživljavaju u malom broju. Naime kod takvih bakterija se vremenom nagomilavaju letalne mutacije i prilikom pasaža na hranljivim podlogama vrlo često zahtevaju posebne uslove da bi preživele. I pored toga mutatorske bakterije su prisutne pogotovo kod kliničkih izolata. Ukoliko postoji selekциони pritisak poput izlaganja bakterija antibioticima, stvara se populacija mutatora koja je održiva najčešće u uslovima trajanja promenjene sredine.

Enzimi koji spadaju u grupu beta laktamaza hidrolizuju peniciline, cefalosporine, monobaktame i karbapene (Bush 2001). Zahvaljujući tačkastim mutacijama na genima TAM-1 i SHV-1, nastali su enzimi proširenog spektra beta laktamaza (ESBL). Međutim, nema još uvek jasnih dokaza da su za ovu vrstu rezistencije zaslužni mutatori. Teorija može biti održiva činjenicom da ukoliko se *E. coli* sa mutacijom na TEM-1 u *in vitro* uslovima uzgajaju u prisustvu cefotaksima, nastaju mutatorske bakterije sa klinički izraženom rezistencijom na prošireni spektar b-laktama. Kako su zapravo tri mutacije potrebne da bi se razvio ESBL fenotip, smatra se da su dominantni mutatori zapravo zaslužni za razvoj ove rezistencije (Chopra i sar., 2003). Prolazni mutatori se mogu javiti ukoliko su bakterije u latentnom stadijumu u kojem mogu preživeti i tretman antimikrobnim agensima. Prolazni mutatori nemaju selekcionu prednost i ne moraju bezuslovno akumulirati značajan broj mutacija.

Mutatorski efekat na jednoj od 4 tRNA glicina uzrokuje da se kodon GGU i GGC promeni u GAU i GAC odnosno u aspartatnu amino kiselinu. Promena nastaje zahvaljujući mutacijama na *mutA* i *mutC* alelima. Kada se ova mutacija dogodi epsilon subjedini se vezuje za DNK polimerazu ali ne obavlja funkciju kontrolnog očitavanja, što dovodi do nivoa mutageneze od 1%. koje ukoliko se ne otkriju i uklone mehanizmima reparacije, uzrokuje da se formiraju mutatori (Miller 1996).

LITERATURA

1. Bennett P.M.: Integrons and gene cassettes: a genetic construction kit for bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 43, 1-4, 1999.
2. Bennett P.M.: Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *British Journal of Pharmacology*, 153, 5347-5357, 2008.
3. Bush K.: New β -Lactamases in Gram-negative bacteria: Diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. *Antimicrobial resistance*, 32, 1085-1089, 2001.
4. Chopra I., O'Neill A.J., Miller K.: The role of mutators in the emergence of antibiotic-resistant bacteria. *Drug Resistance Updates*, 6, 137-145, 2003.
5. Gillings M., Boucher Y., Labbate M., Holmes A., Krishnan S., Holley M., Stokes H.W.: The evolution of class 1 integrons and the rise of antibiotic resistance. *Journal of Bacteriology*, 190, 5095-5100, 2008.
6. Kazama H., Hamashima H., Sasatsu M., Arai T.: Distribution of the antiseptic-resistance gene *qacE Δ 1* in gram-positive bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 165, 295-299, 1998.
7. Miller J.H.: Spontaneous mutators in bacteria: Insights into pathways of mutagenesis and repair. *Annual Review in Microbiology*, 50, 625-43, 1996.
8. Ochman H., Lawrence J.G., Groisman E.A.: Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature*, 405, 299-304, 2000.
9. Stokes H.W., Nesbo C.L., Holley M., Bahl M.I., Gillings M.R., Boucher Y.: Class 1 integrons potentially predating the association with Tn402-Like transposition genes are present in a sediment microbial community. *Journal of Bacteriology*, 16, 5722-5730, 2006.
10. Xu Z., I., Shi C., Zhang X., Li Y., Cao L., Yamasaki S.: Nosocomial infection caused by class 1 integron-carrying *Staphylococcus aureus* in hospital in South China. *Microbiology Infection*, 13, 980-984, 2007.

Primljeno: 15.09.2010.

Odobreno: 17.10.2010.