

УДК 579.887.121

АДАПТАЦИЯ К АНТИМИКРОБНЫМ ПРЕПАРАТАМ И ПАТОГЕННОСТЬ МИКОПЛАЗМ: РАЗВИТИЕ УСТОЙЧИВОСТИ К ЦИПРОФЛОКСАЦИНУ И ЭВОЛЮЦИЯ ВИРУЛЕНТНОСТИ У *ACHOLEPLASMA LAIDLAWII*

© 2021 г. Е. С. Медведева¹, А. А. Музыкантов^{1,*}, В. В. Костенко^{1,2},
Н. Б. Баранова¹, М. И. Маркелова^{1,2}, Р. Г. Сабунни^{1,2}, Д. Р. Хуснутдинова^{1,2},
О. А. Чернова¹, В. М. Чернов¹

Представлено академиком РАН А.Н. Гречкиным
Поступило 10.08.2021 г.
После доработки 02.09.2021 г.
Принято к публикации 03.09.2021 г.

Впервые показано, что развитие устойчивости к ципрофлоксацину *in vitro* у *A. laidlawii* – широко распространенной микоплазмы, являющейся основным контаминантом клеточных культур и вакцин, ассоциирует с различными траекториями эволюции вирулентности: вирулом, а также вирулентность существенно различаются у ципрофлоксацин-устойчивых штаммов, в том числе штаммов с одинаковым уровнем резистентности к антимикробному препарату.

Ключевые слова: *Acholeplasma laidlawii*, ципрофлоксацин-устойчивые штаммы, фенотипическая резистентность, везикулярный протеом, геномный профиль, вирулом, вирулентность, *Drosophila melanogaster*

DOI: 10.31857/S2686738921060111

Эволюция вирулентности у микроорганизмов в условиях селективного давления биотических и абиотических стрессоров, в том числе антимикробных препаратов – серьезная проблема, на решение которой направлены усилия исследователей и фундаментальных и прикладных наук [1]. С выяснением молекулярной машинерии модуляции вирулентности микроорганизмов и определением сигнатур высоковирулентных штаммов связывают перспективы создания эффективной системы контроля эмерджентных инфекций [2]. Особый аспект этой проблемы – возможность стремительного изменения вирулентности у та-

хителичных (гипермутабельных) бактерий. К таким бактериям относятся микоплазмы (здесь и далее – собирательное название представителей класса Mollicutes) – мельчайшие из способных к самостоятельному существованию прокариоты. Они широко распространены как комменсалы высших эукариот; некоторые являются патогенами человека и животных, основными контаминантами клеточных культур и вакцинных препаратов. Инцидент внезапного расширения спектра инфицируемых видов, произошедшего у *Mycoplasma gallisepticum* – патогена домашней птицы, вследствие которого погибли миллионы диких птиц [3], существенно интенсифицировал исследование адаптации микоплазм к стрессорам, в результате которых был получен массив данных, свидетельствующих, что мельчайшие прокариоты далеко не так примитивны, как считалось ранее. При этом было установлено, что: 1) значительный вклад в адаптацию микоплазм к стрессорам и реализацию вирулентности вносят внеклеточные везикулы микоплазм; 2) антибиотикорезистентность не всегда ассоциирована с

¹ Казанский институт биохимии и биофизики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки “Федеральный исследовательский центр “Казанский научный центр Российской академии наук”, Казань, Россия

² ФГАУ ВПО “Казанский (Приволжский) федеральный университет”, Казань, Россия

*e-mail: muzaleksei@mail.ru

мутациями в генах мишеней антимикробных препаратов, но сопровождается множественными изменениями в первичной структуре и экспрессии сотен генов, участвующих в фундаментальных клеточных процессах и реализации вирулентности; 3) селективное давление антимикробных препаратов может индуцировать крупномасштабные перестройки геномов в популяции микоплазмы по неканоническим механизмам, определяющим возможность появления множества линий с различными вариантами фенотипов и вирулентности [4, 5]. Полученные данные свидетельствуют о значительном арсенале средств адаптации у мельчайших прокариот, их высокой пластичности, и позволяют предполагать, что адаптация микоплазмы даже к одному антибиотику может ассоциировать с разнообразными траекториями эволюции вирулентности. Однако публикации в отношении проверки соответствующей гипотезы пока отсутствуют. Сравнительный анализ профилей геномов и везикулярных протеомов, а также вирулентности штаммов *Acholeplasma laidlawii* (убиквитарная микоплазма, инфицирующая человека, животных, растения, являющаяся основным контаминантом клеточных культур и вакцинных препаратов), проявляющих высокий уровень устойчивости к цiproфлоксацину, явился задачей нашего исследования, в результате выполнения которого впервые показано, что развитие устойчивости к цiproфлоксацину *in vitro* у *A. laidlawii* ассоциирует с различными траекториями эволюции вирулентности: вирулом, а также вирулентность существенно различаются у цiproфлоксацин-устойчивых штаммов, в том числе штаммов с одинаковым уровнем резистентности к антимикробному препарату.

В работе использовали штамм *Acholeplasma laidlawii* PG8B из коллекции микроорганизмов ФГБУ “ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи” Минздрава России (Москва). Резистентный к цiproфлоксацину штамм *A. laidlawii* PG8R10 (МПК 20 мкг/мл) был получен нами из клона штамма PG8B (МПК 0.5 мкг/мл), а резистентные к цiproфлоксацину штаммы PG8r3 и PG8r1 с одинаковым показателем МПК (10 мкг/мл) – в результате пошаговой селекции изолятов одного клона PG8B при совместном культивировании с везикулами PG8R10 и без добавления везикул микоплазмы соответственно [6]. Культивирование микоплазмы, выделение, очистку внеклеточных везикул штаммов и контроль чистоты препаратов (отсутствие клеток микоплазмы в образцах везикул) осуществляли, как описано [7].

Секвенирование геномов штаммов *A. laidlawii* проводили на секвенаторе MiSeq (“Illumina”, США). Для анализа нуклеотидных последовательностей использовали программу Sequencing Analysis 5.3.1 (“Applied Biosystems”, США), а также базу данных NCBI (National Center for Biotech-

nology Information); для выравнивания нуклеотидных последовательностей – Bowtie2 (<http://bowtie-bio.sourceforge.net/bowtie2/index.shtml>), для поиска и аннотации однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) – Samtools (<http://samtools.sourceforge.net/mpileup.shtml>) и SnpEff (<http://snpeff.sourceforge.net/SnpEff.html>) соответственно.

Протеомное профилирование внеклеточных везикул *A. laidlawii* проводили с помощью хромато-масс-спектрометрии, как описано [7]. Для поиска белков, ассоциированных с бактериальной вирулентностью, использовали базу данных VFDB (<http://www.mgc.ac.cn/VFs/main.htm>). Анализ вирулентности штаммов микоплазмы проводили на модельном организме *Drosophila melanogaster* (линия *Canton-S*). Мух выращивали на стандартной сахарно-дрожжевой среде; для инфицирования клетками штаммов *A. laidlawii* получали синхронные кладки эмбрионов, которые переносили на питательную среду с добавлением 10^6 – 10^7 клеток бактерии. Клетки штаммов *A. laidlawii* предварительно отмывали от культуральной среды и суспендировали в фосфатно-солевом буфере. В качестве контроля использовали мух, выращенных на среде, не содержащей *A. laidlawii*. Контроль инфицирования дрозофил микоплазмой осуществляли с помощью ПЦР со специфичными праймерами [6]. Для оценки вирулентности штаммов *A. laidlawii* использовали стандартные показатели репродукции и жизнеспособности особей (количество отложенных яиц и выживших эмбрионов [8, 9]). Для оценки поврежденности ДНК в энтероцитах мух применяли вариант метода “ДНК-комет” (“DNA-comet assay”), позволяющий определять односторонние разрывы ДНК в клетках [10]. Для визуализации и ранжировки “ДНК-комет” использовали флуоресцентный микроскоп (Carl Zeiss Axio Imager M2, Германия).

Метагеномное профилирование микробного сообщества кишечника инфицированных и не инфицированных микоплазмой дрозофил проводили с помощью секвенирования 16S рРНК, как описано [11]. Для оценки таксономического разнообразия микробиоты кишечника мух использовали индекс Шеннона. Метагеномные данные анализировали с помощью программного пакета QIIME v1.9.

Статистическую обработку данных выполняли с помощью программного обеспечения Statistica 12.0. Эксперименты проводили в трех повторностях. Для каждого показателя вычисляли среднее арифметическое, его ошибку и стандартное отклонение. Статистически значимые различия между исследуемыми группами оценивали с использованием *post-hoc* теста с применением критерия Фишера. В тесте ДНК-комет статистически значимые различия определяли с помощью *t*-критерия Стьюдента ($p < 0.05$).

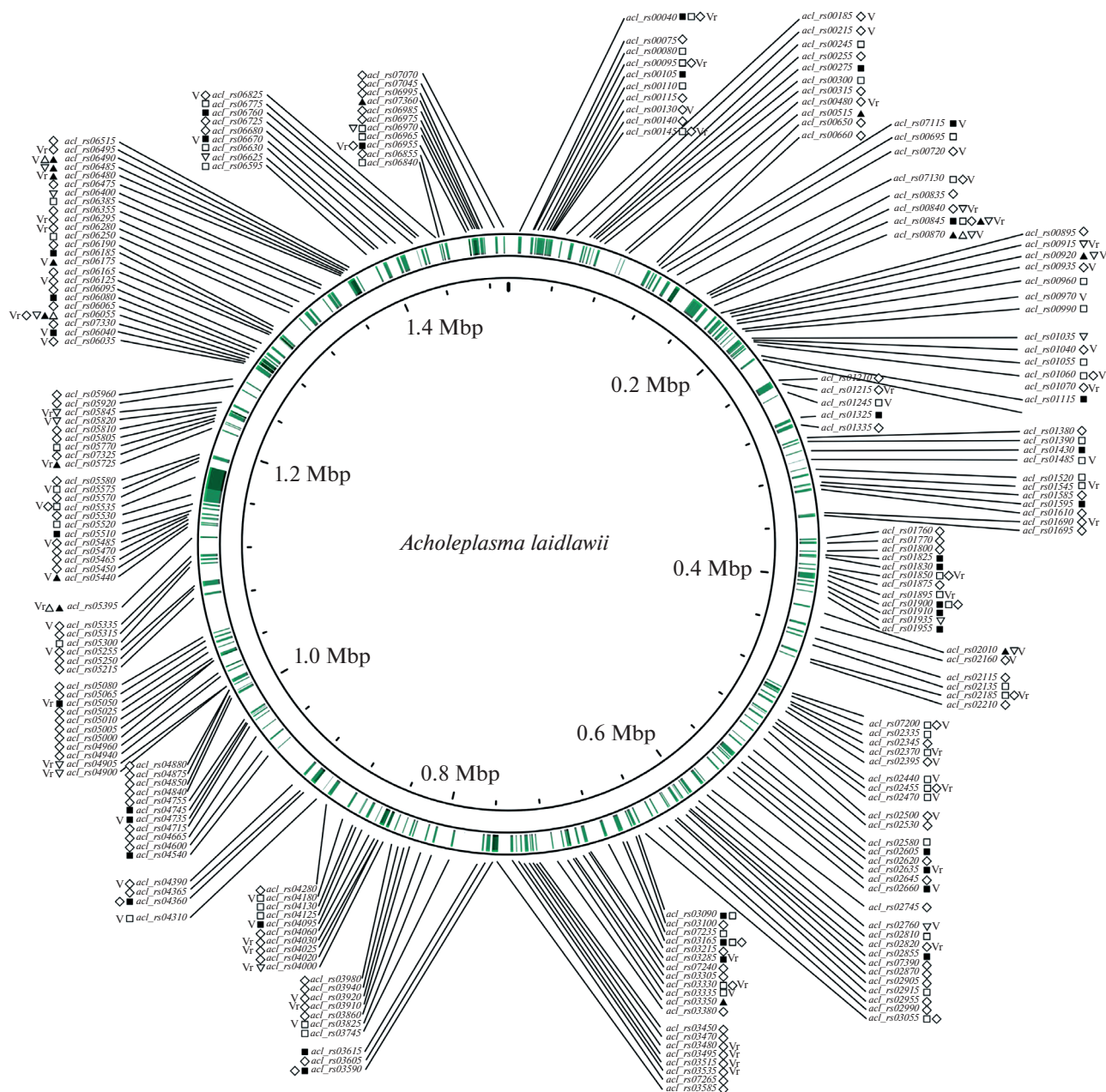


Рис. 1. Локализация генов, ассоциированных с развитием резистентности *Acholeplasma laidlawii* к ципрофлоксацину, на геномной карте референсного штамма *A. laidlawii* PG-8A. Данные представлены для штаммов *A. laidlawii* PG8r1 (■, ▲), *A. laidlawii* PG8r3 (□, △) и *A. laidlawii* PG8R10 (◇, ▽). ■, □, ◇ – гены, в первичной структуре которых обнаружены мутации у штаммов (относительно *A. laidlawii* PG8B); ▲, △, ▽ – гены, кодирующие белки, выявленные во внеклеточных везикулах штаммов; V – гены, кодирующие факторы бактериальной вирулентности; Vr – гены, кодирующие белки, регулирующие бактериальную вирулентность. Графическое изображение хромосомы получено с помощью программы Proksee (<https://beta.proksee.ca/>).

В результате анализа данных полногеномного секвенирования штаммов *A. laidlawii* с дифференциальной чувствительностью к ципрофлоксацину нами было установлено, что развитие резистентности к антимикробному препарату во всех случаях сопровождается множественными изменениями в первичной структуре генома микро-

плазмы. Мутации регистрируются в генах, вовлеченных не только в адаптацию к фторхинолонам, но также фундаментальные клеточные процессы. При этом адаптация *A. laidlawii* к ципрофлоксацину сопровождается изменениями в вируломе – мутации обнаруживаются в генах факторов/регуляторов бактериальной вирулентности, но про-

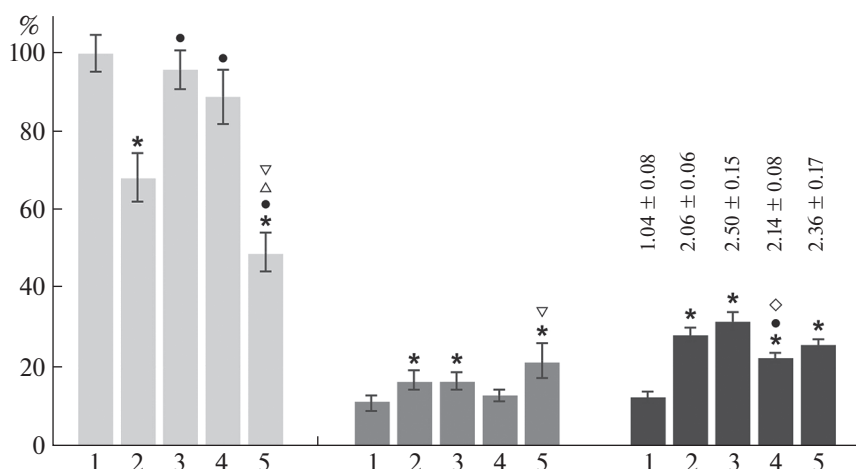


Рис. 2. Вирулентность штаммов *A. laidlawii* в отношении *D. melanogaster*.

1 – мухи, не инфицированные *A. laidlawii*; 2–5 – мухи, инфицированные штаммами *A. laidlawii* PG8B, PG8R10, PG8r1, PG8r3 соответственно. Данные представлены в виде среднего арифметического значения \pm стандартное отклонение.

■, ■, ■ – количество отложенных яиц, погибших особей, энтероцитов с одностранными разрывами ДНК (цифры указывают индекс повреждения ДНК) соответственно. * – достоверные ($p < 0.05$) отличия по сравнению с неинфицированными мухами; • – достоверные ($p < 0.05$) отличия по сравнению с мухами, инфицированными *A. laidlawii* PG8B; ◊, Δ, ∇ – достоверные ($p < 0.05$) отличия между мухами, инфицированными штаммами *A. laidlawii* PG8R10 и PG8r1, PG8R10 и PG8r3, PG8r1 и PG8r3 соответственно.

филь мутантных генов у штаммов существенно различается (рис. 1).

Обнаружены только четыре гена, мутации в которых есть у всех резистентных штаммов микоплазмы – *acl_rs00040*, *acl_rs00845*, *acl_rs01900* и *acl_rs03165*, кодирующих: 1) ДНК-гиразу (субъединица А); 2) ДНК-зависимую РНК-полимеразу (субъединица бета'); 3) ДНК топоизомеразу IV (субъединица А) и 4) белок семейства MscC соответственно. Однако профиль мутаций этих генов у штаммов не совпадает. Таким образом, генетическая сигнатура вирулома, характерная для всех исследованных ципрофлоксацин-устойчивых штаммов *A. laidlawii*, отсутствует.

Развитие антибиотикоустойчивости у *A. laidlawii* связано с изменением секреции сотен белков, ассоциированной с везикулами микоплазмы, опосредующими межклеточные взаимодействия и патогенез. При этом профили везикулярных белков разных штаммов, резистентных к ципрофлоксацину, существенно различаются. Эти различия касаются и факторов/регуляторов вирулентности (рис. 1). Единственный общий фактор вирулентности в везикулах штаммов – бифункциональная ацетальдегид-СоА/алкогольдегидрогеназа, но специфичным маркером вирулентности ципрофлоксацин-устойчивых штаммов микоплазмы этот белок не является, поскольку присутствует также в везикулах ципрофлоксацин-чувствительного штамма *A. laidlawii* PG8B [7], что может определять его перспективы как мишени-кандидата для контроля микоплазмы.

Различия профилей геномов и везикулярных протеомов у *A. laidlawii* PG8R10, PG8r1 и PG8r3, ассоциированные с факторами/регуляторами вирулентности, позволяют предполагать дифференциальный потенциал вирулентности у соответствующих штаммов микоплазмы. Для проверки этого предположения нами выполнен анализ вирулентности штаммов *A. laidlawii* *in vivo* на модельном организме *D. melanogaster*, по отношению к которому микоплазмы могут быть комменсалами и патогенами [12]. Согласно полученным данным, инфицирование *D. melanogaster* клетками штаммов *A. laidlawii* может оказывать негативное влияние на жизнеспособность и репродукцию дрозофилы, структуру ДНК энтероцитов (рис. 2) и состав микробиоты кишечника мух (рис. 3; нуклеотидные последовательности 16S рРНК депонированы в базу данных Sequence Read Archive, номер PRJNA751047, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/PRJNA751047>), в том числе в отношении представленности рода *Lactobacillus*, изменения которой могут приводить к значимым изменениям геномного профиля в популяциях *D. melanogaster* за короткое время – в течение пяти генераций [13].

Выраженность негативного эффекта штаммов микоплазмы в отношении структуры ДНК энтероцитов и состава микробиоты кишечника *D. melanogaster* совпадает – чем ниже оказывается таксономическое разнообразие кишечной микробиоты у мух, тем выше уровень ДНК-повреждений в клетках их кишечника. Различия между ципрофлоксацин-устойчивыми штаммами в от-

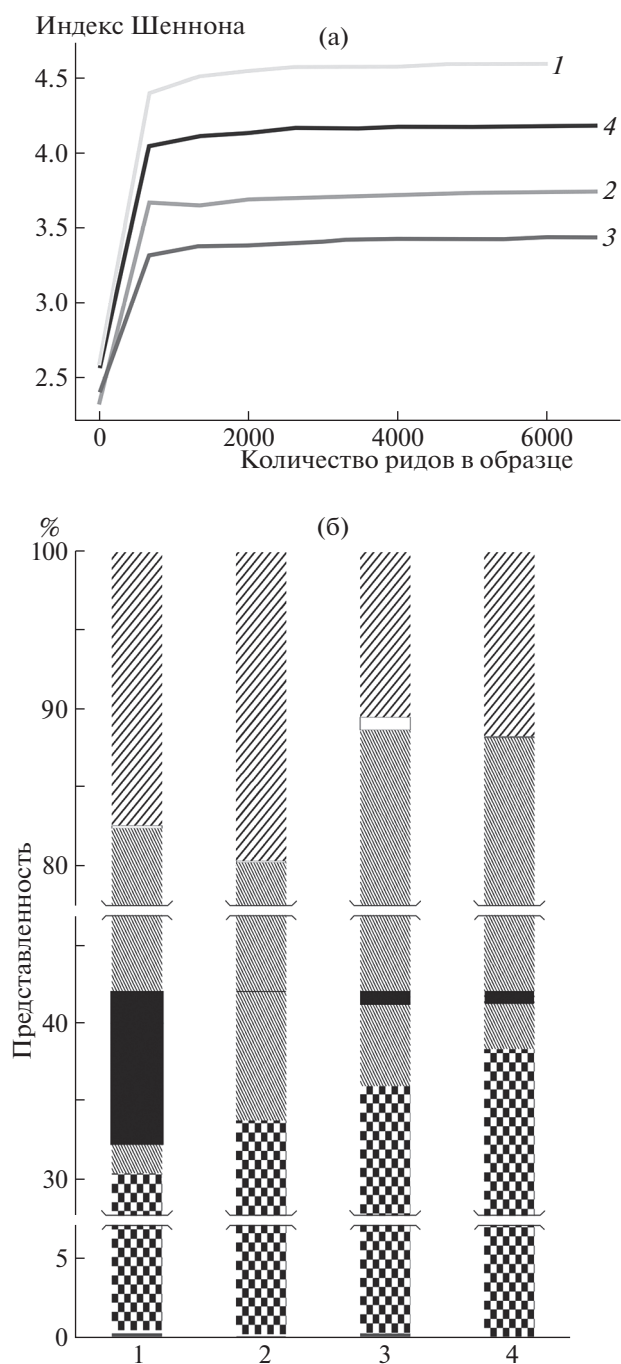


Рис. 3. Особенности изменений таксономического разнообразия (а) и относительной представленности бактериальных отделов (б) в микробном сообществе кишечника у *D. melanogaster* при инфицировании штаммами *A. laidlawii*.

1 – мухи, не инфицированные *A. laidlawii*; 2–4 – мухи, инфицированные штаммами *A. laidlawii* PG8B, PG8R10 и PG8r3 соответственно.

/// Actinobacteria, □ Bacteroidetes, ■ Firmicutes, ■ род *Lactobacillus*, ■ Proteobacteria, ▣ другие.

ношении повреждений ДНК энтероцитов в основном незначимы – достигают достоверности только у PG8R10 и PG8r1, штаммов с разным

уровнем резистентности. В случае других параметров достоверные различия обнаруживаются и у штаммов с одинаковым уровнем резистентности.

Таким образом, в результате наших исследований впервые показано, что развитие устойчивости к ципрофлоксацину *in vitro* у *A. laidlawii* ассоциирует с различными траекториями эволюции вирулентности микоплазмы: вирулом, а также вирулентность существенно различается у ципрофлоксацин-устойчивых штаммов, в том числе штаммов с одинаковым уровнем резистентности к антимикробному препарату. Полученные данные определяют необходимость проведения всесторонних исследований механизмов эволюции вирулентности тахителичных бактерий *in vivo* на модельных организмах при селективном давлении антимикробных препаратов для выяснения потенциала клональной диверсификации в бактериальной популяции [14] в отношении модуляции вирулентности, определения маркеров высоковирулентных штаммов и коррекции стратегии контроля микоплазм.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Turner W.C., Kamath P.L., van Heerden H., et al. // R Soc Open Sci. 2021. V. 8. P. 210088.
2. Pan Y., Zeng J., Li L., et al. // mSystems. 2020. V. 5. № 3. P. e00821-19.
3. Hochachka W.M., Dhondt A.A., Dobson A., et al. // Proc Biol Sci. 2013. V. 280. P. 20131068.
4. Faucher M., Nouvel L.-X., Dordet-Frisoni E., et al. // PLoS Genet. 2019. V. 15. № 1. P. e1007910.
5. Chernova O.A., Chernov V.M., Mouzykantov A.A., et al. // Int J Antimicrob Agents. 2021. V. 57. P. 106253.
6. Mouzykantov A.A., Medvedeva E.S., Baranova N.B., et al. // Data in Brief. 2020. V. 33:106412.
7. Chernov V.M., Mouzykantov A.A., Baranova N.B., et al. // J. Proteomics. 2014. V. 110. P. 117–128.
8. Qiao H., Keesey I.W., Hansson B.S., Knaden M. // J Exp Biol. 2019 Mar 1;222(Pt 5):jeb192500.
9. Sullivan W., Ashburner M., Hawley E.S. *Drosophila* protocols. 2000. New York: Cold Spring Harbour Press. 728 p.
10. Mukhopadhyay I., Chowdhuri D.K., Bajpayee M., et al. // Mutagenesis. 2004. V.19. P. 85–90.
11. Kang D., Douglas A.E. // Biol Lett. 2020. V. 16. № 2. P. 20190803.
12. Ventura I.M., Martins A.B., Lyra M.L., et al. // Microb Ecol. 2012. V. 64. P. 794–801.
13. Rudman S.M., Greenblum S., Hughes R.C., et al. // Proc Natl Acad Sci U S A. 2019. V. 116. P. 20025–20032.
14. Rakovskaya I.V., Ermolaeva S.A., Levina G.A., et al. // J Med Microbiol. 2019. V. 68. P. 1747–1758.

**ADAPTATION TO ANTIMICROBIALS AND PATHOGENICITY
IN MYCOPLASMAS: DEVELOPMENT OF CIPROFLOXACIN-RESISTANCE
AND EVOLUTION OF VIRULENCE IN *ACHOLEPLASMA LAIDLAWII***

**E. S. Medvedeva^a, A. A. Mouzykantov^{a,#}, V. V. Kostenko^{a,b}, N. B. Baranova^a, M. I. Markelova^{a,b},
R. G. Sabouni^{a,b}, D. R. Khusnutdinova^{a,b}, O. A. Chernova^a, and V. M. Chernov^a**

^a Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, FRC Kazan Science Centre of RAS, Kazan, Russian Federation

^b Kazan (Volga region) Federal University, Kazan, Russian Federation

[#]e-mail: muzaleksei@mail.ru

Presented by Academician of the RAS A.N. Grechkin

For the first time it was shown that the development of resistance to ciprofloxacin *in vitro* in *Acholeplasma laidlawii*, a widely spread in nature mycoplasma, which is the main contaminant of cell cultures and vaccines, is associated with diverse trajectories of virulence evolution: virulome as well as virulence differ significantly between ciprofloxacin-resistant strains, including ones with the same level of antimicrobial resistance.

Keywords: *Acholeplasma laidlawii*, ciprofloxacin-resistant strains, phenotypic resistance, vesicular proteome, genomic profile, virulome, virulence, *Drosophila melanogaster*