

©Коллектив авторов

БИОИНФОРМАТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ КОЛОКАЛИЗАЦИИ ГЕНОВ РЕЗИСТЕНТНОСТИ И ПРОФАГОВ В МЕТАГЕНОМАХ КИШЕЧНИКА ЧЕЛОВЕКА

Е.В. Старикова^{1*}, Н.А. Пряничников¹, Е. Здобнов², В.М. Говорун¹

¹Федеральный Научно-Клинический Центр Физико-Химической Медицины,
119991, Москва, ул. Малая Пироговская, 1а; эл. почта: estarikova@rcpcm.org

²Медицинский Факультет Университета Женевы, Женева, Швейцария

Увеличение доли лекарственно-устойчивых штаммов бактерий непосредственно связано с широким применением антибиотиков в медицине и животноводстве. Предполагается, что микрофлора кишечника служит резервуаром генов антибиотикорезистентности, которые могут передаваться от симбиотических бактерий к патогенным микроорганизмам, в том числе в результате фаговой трансдукции. С использованием программы предсказания профагов PHASTER и базы данных генов антибиотикорезистентности CARD проведён поиск генов антибиотикорезистентности, находящихся в составе профагов, в микробном сообществе кишечника человека. В результате анализа метагеномных сборок восьми образцов в составе последовательностей профагов были обнаружены гены *lsaE*, *mdfA* и *cpxR/cpxA*, присутствие которых обеспечивает устойчивость бактерий к антимикробным пептидам, плевромутину, линкомицину, стрептограминам группы А, а также множественную лекарственную устойчивость. Из 659 предположительных профагов, предсказанных в метагеномных сборках, три (0,46%) имели в своём составе гены антибиотикорезистентности.

Ключевые слова: метагеномика, антибиотикорезистентность, бактериофаги

DOI: 10.18097/PBMC20176306508

ВВЕДЕНИЕ

Лекарственная устойчивость возбудителей инфекционных заболеваний человека становится возрастающей проблемой, о чём говорится, в частности, в Глобальной стратегии ВОЗ по сдерживанию резистентности к антимикробным препаратам. Повышение антибиотикорезистентности связано с широким применением антибиотиков в медицине и животноводстве. Предполагается, что человеческий кишечник может служить резервуаром генов антибиотикорезистентности, которые могут передаваться от симбиотических бактерий к патогенным микроорганизмам [1].

Гены антибиотикорезистентности могут возникать *de novo* либо передаваться путём трансформации, конъюгации или трансдукции [2]. В горизонтальном переносе генов лекарственной устойчивости принимают участие плазмиды, бактериофаги и другие мобильные элементы [3]. Вклад каждого из этих путей распространения антибиотикорезистентности на данный момент неясен.

Высказывалось предположение, что фаговый путь может являться преобладающим при распространении лекарственной устойчивости, поскольку большое количество АР-генов обнаруживалось в образцах вирусных частиц, полученных из мокроты больных, страдающих муковисцидозом [4, 5]. Также высокая частота трансдукции генов антибиотикорезистентности была замечена в микробиоме мышей, получавших антибиотики; при этом повышалась частота переноса генов устойчивости к другим антибиотикам, не связанным с теми, которые получали мыши [6]. Метагеномный анализ образцов сточных вод больниц

показал, что относительная распространённость генов резистентности в вирусной фракции (0,26%) была выше, чем в бактериальной (0,18%) [7].

Мобилизация генов устойчивости к антибиотикам была ранее показана *in vitro* для умеренного фага *Bacillus anthracis* Wβ, переносившего ген устойчивости к фосфомицину [8], а также для сателлитных фагов *Staphylococcus aureus* [8, 9] и индуцированных профагов из изолятов *Salmonella enterica* [8-10]. Ряд генов антибиотикорезистентности также был обнаружен в вирусе, выделенном из образца копролита XIV века, что может свидетельствовать о том, что фаговые геномы могли являться резервуаром генов антибиотикорезистентности ещё задолго до эры антибиотиков [11].

Остаётся неясным, является ли фаговый путь распространения генов антибиотикорезистентности преобладающим. В исследовании, проведённом на 1642 фаговых геномах и 1571 бактериальном геноме, было показано, что лишь 0,21% фагов и 0,97% профагов содержат гены антибиотикорезистентности [12]. В другом исследовании гены, обнаруживаемые в составе фаговых геномов и предсказанные как гены антибиотикорезистентности на основе гомологии, не подтвердили антибиотических свойств в экспериментах *in vitro* [12, 13]. Однако поиск последовательностей генов резистентности в аннотированных фаговых геномах и в профагах аннотированных бактериальных геномов не позволяет произвести оценку частоты встречаемости этого явления в природе. Более полное представление о распространённости фагового пути мобилизации генов антибиотикорезистентности может дать метагеномный анализ.

Целью данной работы был поиск генов антибиотикорезистентности в фаговом окружении, присутствующем в микробном сообществе кишечника человека. Был произведён поиск генов антибиотикорезистентности, колокализованных с профагами в сборках метагеномов, и оценка их встречаемости.

МЕТОДИКА

Данные

В исследовании были использованы данные метагеномного секвенирования микробиоты кишечника пациентов, проходивших эрадикацию *Helicobacter pylori* [14]. Всего было проанализировано 8 образцов.

Методы

Сборку метагеномов производили с помощью Spades3.9. Открытые рамки считывания и белки были предсказаны с помощью MetaGeneMark (версия 3.38). Выявление генов антибиотикорезистентности производили следующим образом: белки, полученные с помощью MetaGeneMark, выравнивались на белковые последовательности из базы данных генов лекарственной устойчивости CARD (версия 1.2.0) с помощью BLASTP. Затем производили дополнительную фильтрацию результатов: последовательности, имеющие идентичность белку, кодируемому геном резистентности, менее чем 80% и длину выравнивания менее чем 90% от длины белка, отбрасывались.

Для выявления профагов в образцах использовали веб-сервис PHASTER (<http://phaster.ca/>), позволяющий предсказывать профаги в бактериальных геномах.

Для таксономической аннотации контигов производили выравнивание целых контигов на базу данных nt с помощью BLASTN.

Аннотацию фаговых белков производили с помощью скрытых марковских моделей (HMM) pVOG [15], специфичных к фаговым белкам. Аннотацию производили с использованием программы hmmscan из пакета HMMER (версия 3.1b2) при пороге E-value 0,00001.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате анализа 177442 контигов длиной более 2000 пар нуклеотидов из 8 образцов нами было обнаружено 659 предположительных профагов и 548 генов, имеющих сходство с известными генами антибиотикорезистентности при пороге идентичности 80% (табл. 1). Три профага из 659 (0,46%) имели в своем составе предположительные гены антибиотикорезистентности. Гены, имеющие сходство с генами антибиотикорезистентности и находящиеся вне профагов, не учитывались, поскольку в подобных случаях невозможно установить, был ли ген резистентности привнесён при встройке профага, или же находился на бактериальной хромосоме изначально. Из 548 предположительных генов антибиотикорезистентности четыре (0,73%) находились внутри профагов.

В результате аннотации трёх контигов, имевших гены антибиотикорезистентности в составе профоговой последовательности (в дальнейшем – Hp7-2, Hp22-113 и Hp22-326), два контига были отнесены к профагам *Escherichia coli*, и один из контигов не показал сходства к аннотированным последовательностям (табл. 2).

Нами были проаннотированы кодирующие последовательности данных профагов с использованием фагоспецифичных HMM [15].

Анализ взаимного расположения фаговых генов и генов антибиотикорезистентности показал, что гены лекарственной устойчивости располагаются преимущественно поблизости от интеграз (рис. 1-3).

Таблица 1. Число генов антибиотикорезистентности (АР) и профагов, обнаруженных в образцах метагеномов

Образец	Число профагов	Число генов в контигах длиной >2000 п.н.	Число АР генов в контигах длиной >2000 п.н.	% АР генов от общего числа генов	АР генов внутри профага
Hp_5	137	300518	95	0,03%	-
Hp_6	44	125704	33	0,03%	-
Hp_7	116	237563	94	0,04%	1
Hp_73	57	176986	31	0,02%	-
Hp_74	97	189934	91	0,05%	-
Hp_76	102	198616	25	0,01%	-
Hp_21	47	99339	32	0,03%	-
Hp_22	59	120439	183	0,15%	3
Всего	659	1449099	548	0,04%	4

Таблица 2. Аннотация профагов и генов антибиотикорезистентности (АР), обнаруженных в составе профагов

Контиг	Аннотация контига (лучшее совпадение из базы данных nt)	Покрытие, % ширины	Идентичность, %	Ген АР (CARD)	% идентичности гену CARD
Hp_7_NODE_2_length_340179	<i>Streptococcus suis</i> strain 584	1	98	<i>lsaE</i>	99
Hp_22_NODE_113_length_44530	<i>Escherichia coli</i> strain CI5	68	99	<i>mdfA</i>	97
Hp_22_NODE_326_length_29118	<i>Escherichia coli</i> strain AR_0128	99	99	<i>cpxA</i> , <i>cpxR</i>	100, 99

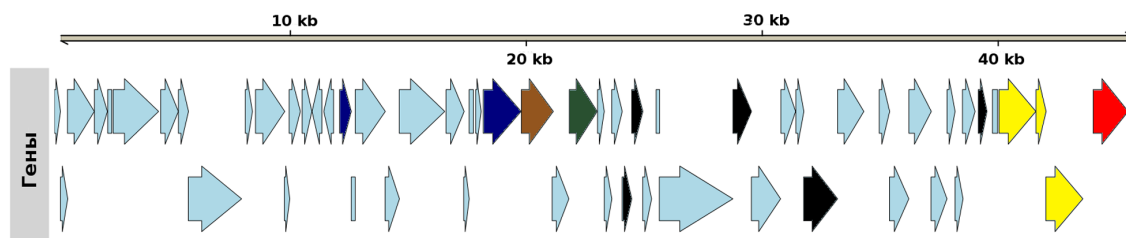


Рисунок 1. Расположение генов профага Hp7-2. Красным обозначен ген устойчивости к антибиотикам, жёлтым - гены интеграз, чёрным - гены “хвоста”, зелёным - гены, связанные с капсидом, синим - субъединицы терминазы, коричневым - ген “портала”.

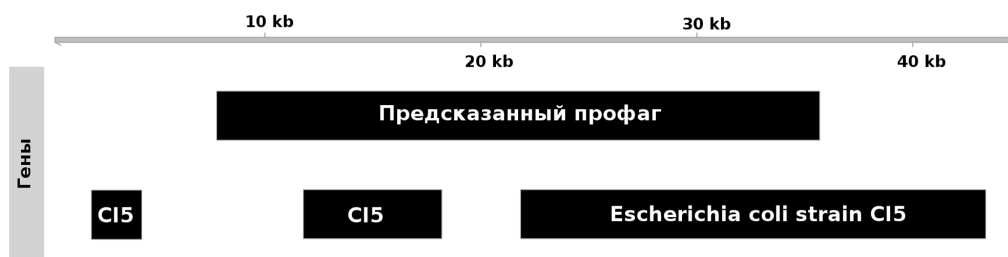


Рисунок 2. Выравнивание последовательностей *E. coli* CI5 (лучшее совпадение из базы данных nt) и контига Hp22-113.

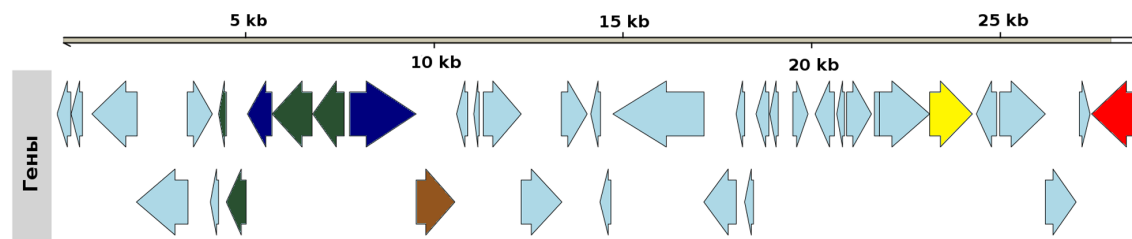


Рисунок 3. Расположение генов профага Hp22-113. Красным обозначен ген устойчивости к антибиотикам, жёлтым - гены интеграз, чёрным - гены “хвоста”, зелёным - гены, связанные с капсидом, синим - субъединицы терминазы, коричневым - ген “портала”.

Ген *lsaE* в последовательности контига Hp7-2

Ген, кодирующий белок длиной 494 а.о., имеющий 99% идентичности к АТФ-связывающему кассетному транспортеру *lsaE* (GenBank: AHC08069.1) с устойчивостью к плевомутилину, линкомицинам и стрептограминам группы А, был обнаружен в последовательности профага длиной 45508 п.н. на контиге Hp7-2 длиной 340179 п.н.

Ген *lsaE* обнаруживался ранее в хромосомах и плазидах многих бактерий типа *Firmicutes* (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus suis*, *Enterococcus faecalis*, *Clostridium botulinum* и пр.). Точный механизм, по которому данный ген осуществляет устойчивость к вышеупомянутым антибиотикам, не до конца понятен; однако кодируемый им белок имеет гомологию к известным АВС-транспортерам, и его наличие было однозначно соотнесено с устойчивостью к линкозамидам и стрептограминам группы А [16, 17].

Выравнивание белковой последовательности метагеномного варианта данного гена на последовательности из базы данных nt показало высокое сходство (99% идентичности) данного белка с консервативным *lsaE*-геном ряда бактерий (NCBI Ref Seq: WP_002294513.1) с аминокислотными заменами в позициях 281, 308, 419, 421 и 493. Поскольку точный механизм действия белкового

продукта *lsaE* гена неизвестен, невозможно установить, имеют ли замены в этих позициях значение для поддержания функции вышеупомянутого белка.

Выравнивание нуклеотидной последовательности метагеномного варианта гена *lsaE* на последовательности из базы данных nt показало, что наибольшее сходство (99%) он имеет с геном, обнаруженным в сборках генома некультивируемой бактерии (GenBank: KJ797470.1), а также с *lsaE*-геном одного из штаммов *S. suis* (GenBank: KT716758.1).

Полная последовательность контига Hp7-2 не показала сходства к аннотированным бактериальным или вирусным геномам, однако на основании данных о распространённости гена *lsaE* можно заключить, что неаннотированная бактерия, содержащая последовательность профага с данным геном, относится к типу *Firmicutes*.

Анализ расположения *lsaE* относительно фаговых генов (рис. 1) показывает, что *lsaE* находится поблизости от трёх последовательно расположенных генов интеграз.

Ген *mdfA* в последовательности контига Hp22-113

Ген, кодирующий белок длиной 410 а.о., имеющий 96,83% идентичности гену множественной лекарственной устойчивости *mdfA* (GenBank:

AFH35853.1) из базы данных CARD, был обнаружен в последовательности профага длиной 27929 п.н. на контиге Hр22-113 длиной 44530 п.н.

Ген *mdfA* (также называемый *cmlA* или *cmr*) был обнаружен у *Escherichia coli* в последовательностях многокопийных плазмид [18]. *MdfA* является эффлюксным насосом, обеспечивающим множественную лекарственную устойчивость, а также устойчивость к щелочной среде. Штаммы, обладающие копией данного гена, устойчивы к ряду химически различных антибиотиков, таких как хлорамфеникол, эритромицин, даунорубин, тетрациклин и др., включая ряд аминогликозидов и фторхинолонов [18]. Варианты данного гена встречаются также в изолятах ряда видов семейства *Enterobacteriaceae* [19, 20].

Мобилизация других генов устойчивости к хлорамфениколу была показана ранее для фагов *S. typhimurium* [21], однако нам не удалось найти сообщений о переносе гена *mdfA* бактериофагами.

Выравнивание белковой последовательности обнаруженного нами в метагеноме варианта *mdfA* на последовательности из базы данных nt показало полную идентичность белка продукту гена *mdfA*, присутствующему у ряда штаммов *E. coli* и *Shigella sonnei* (GenBank: OYI40306.1). Поскольку нами не было обнаружено аминокислотных замен в позиции 26, соответствующей активному сайту, можно заключить, что данный белок является функциональным.

Выравнивание нуклеотидной последовательности метагеномного варианта гена *mdfA* на последовательности из базы данных nt показало полную идентичность данного гена вариантам *mdfA*, присутствующим у *E. coli* ATCC 8739 и *E. coli* HS.

Полная последовательность контига Hр22-113 выравнивается на ряд штаммов *E. coli*, однако ширина выравнивания составляет не более 68% (рис. 2).

Анализ расположения *mdfA* относительно фаговых генов (рис. 3) показал, что *mdfA* находится поблизости от гена фаговой интегразы и на отдалении от структурных генов.

Гены *срхA/cрхR* в последовательности контига Hр22-326

Два гена, кодирующие белки длиной 457 и 232 а.о., имеющие 100 и 99,14% идентичности генам *срхA* (NCBI Ref Seq: NP_312864.1) и *срхR* (GenBank: ANK04473.1) из базы данных CARD, соответственно,

были обнаружены в последовательности профага длиной 26235 п.н. на контиге Hр22-326 длиной 29118 п.н. Данные гены образуют двукомпонентную регуляторную систему *срхR/cрхA*, участвующую в ответе *E. coli* и *S. typhimurium* на воздействие альфа-спиральных антимикробных пептидов и протамина [22, 23].

Согласно результатам выравнивания нуклеотидных и соответствующих белковых последовательностей, кодируемых этими генами, на базы данных nt/nr, нуклеотидные последовательности *срхR* и *срхA* полностью идентичны таковым у следующих штаммов *Escherichia coli*: H2, 127, P12b, ATCC 8739, HS. Белковые последовательности, кодируемые данными генами, полностью соответствуют белковым последовательностям *срхR/cрхA*, присутствующим у множества штаммов *E. coli* и *Shigella ssp.* (NCBI Ref Seq: WP_000580417.1, WP_001033722.1).

Данная двукомпонентная система обнаружена как у *E. coli* и *S. typhimurium*, так и у ряда протеобактерий [24], однако сообщений о мобилизации этих генов бактериофагами в естественных условиях не поступало.

Что интересно, гены *срхR/cрхA* расположены посередине профага, что нетипично для трансдуцированных генов (рис. 4).

Хотя *срхR/cрхA* гены не способны независимо обеспечивать антибиотикорезистентность, горизонтальный перенос данных генов может привести к возникновению лекарственной устойчивости у ранее восприимчивых штаммов при наличии в их геноме других генов, связанных с обеспечением функциональности эффлюксных транспортеров.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нами было продемонстрировано наличие генов *mdfA*, *срхA/cрхR* и *lsaE* в составе последовательностей двух профагов *E. coli* и профага неустановленной бактерии типа *Firmicutes*, соответственно. По-видимому, данные гены были привнесены в бактериальный геном в процессе трансдукции. На основании имеющихся данных невозможно предсказать, являются ли данные профаги “активными”, то есть способными к переходу к литическому циклу и дальнейшему распространению генов антибиотикорезистентности, однако предположительно привнесённые ими гены, по-видимому, являются функциональными.

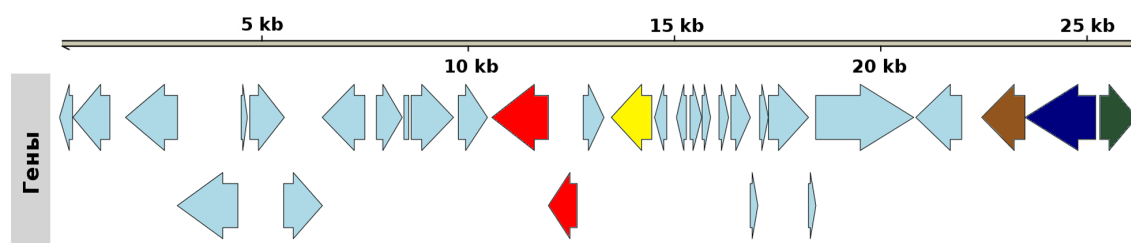


Рисунок 4. Расположение генов профага Hр22-326. Красным обозначен ген устойчивости к антибиотикам, жёлтым - гены интеграз, чёрным - гены “хвоста”, зелёным - гены, связанные с капсидом, синим - субъединицы терминазы, коричневым - ген “портала”.

Согласно нашим оценкам, примерно 0,5% умеренных бактериофагов, встраивающихся в бактериальную хромосому, могут переносить гены, задействованные в реализации устойчивости к антибиотикам, что в целом согласуется с оценками частоты трансдукции генов антибиотикорезистентности, проводившимися ранее: гомологи таких генов обнаруживались приблизительно в 0,97% профагов в бактериальных геномах [12], а также на них приходится около 0,26% прочтений виромов, выделенных из сточных вод больниц [7].

Полученные данные позволяют предположить, что фаговый путь распространения генов лекарственной устойчивости не является преобладающим, однако, тем не менее, переносимые бактериофагами гены резистентности способны дать бактерии-хозяину преимущество в условиях антибиотикотерапии и, таким образом, внести изменения в течение болезни (в частности, при комбинировании антибиотико- и фаговой терапии).

Закономерности распространения генов антибиотикорезистентности бактериофагами требуют дальнейшего изучения.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 16-54-21012.

ЛИТЕРАТУРА

1. van Schaik W. (2015) *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, **370**, 20140087–20140087.
2. Martinez J.L. (2008) *Science*, **321**, 365–367.
3. Ochman H., Lawrence J.G., Groisman E.A. (2000) *Nature*, **405**, 299–304.
4. Rolain J.M., Fancello L., Desnues C., Raoult D. (2011) *J. Antimicrob. Chemother.*, **66**, 2444–2447.
5. Fancello L., Desnues C., Raoult D., Rolain J.M. (2011) *J. Antimicrob. Chemother.*, **66**, 2448–2454.
6. Modi S.R., Lee H.H., Spina C.S., Collins J.J. (2013) *Nature*, **499**, 219–222.
7. Subirats J., Sánchez-Melsió A., Borrego C.M., Balcázar J.L., Simonet P. (2016) *Int. J. Antimicrob. Agents*, **48**, 163–167.
8. Schuch R., Fischetti V.A. (2006) *J. Bacteriol.*, **188**, 3037–3051.
9. Novick R.P., Christie G.E., Penadés J.R. (2010) *Nat. Rev. Microbiol.*, **8**, 541–551.
10. Zhang Y., LeJeune J.T. (2008) *Vet. Microbiol.*, **129**, 418–425.
11. Appelt S., Fancello L., Le Bailly M., Raoult D., Drancourt M., Desnues C.C. (2014) *Appl. Environ. Microbiol.*, **80**, 2648–2655.
12. Kleinheinz K.A., Joensen K.G., Larsen M.V. (2014) *Bacteriophage*, **4**, e27943.
13. Enault F., Briet A., Bouteille L., Roux S., Sullivan M.B., Petit M.-A. (2017) *ISME J.*, **11**, 237–247.
14. Glushchenko O.E., Samoilov A.E., Olekhovich E.I., Kovarsky B.A., Tyakht A.V., Pavlenko A.V. et al. (2017) *Data Brief.*, **11**, 68–71.
15. Grazziotin A.L., Koonin E.V., Kristensen D.M. (2017) *Nucleic. Acids Res.*, **45**, D491–D498.
16. Dina J., Malbrun B., Leclercq R. (2003) *Antimicrob. Agents Chemother.*, **47**, 2307–2309.
17. Miller W.R., Munita J.M., Arias C.A. (2014) *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.*, **12**, 1221–1236.
18. Edgar R., Bibi E. (1997) *J. Bacteriol.*, **179**, 2274–2280.
19. Nishino K., Latifi T., Groisman E.A. (2006) *Mol. Microbiol.*, **59**, 126–141.
20. Wu Y., Li H., Li J., Huang Z.H.H. (2008) *J. Microbiol.*, **46**, 687–691.
21. Briggs C.E., Frattamico P.M. (1999) *Antimicrob. Agents Chemother.*, **43**, 846–849.
22. Weatherspoon-Griffin N., Zhao G., Kong W., Kong Y., Morigen, Andrews-Polymenis H. et al. (2011) *J. Biol. Chem.*, **286**, 5529–5539.
23. Weatherspoon-Griffin N., Yang D., Kong W., Hua Z., Shi Y. (2014) *J. Biol. Chem.*, **289**, 32571–32582.
24. Gal-Mor O., Segal G. (2003) *J. Bacteriol.*, **185**, 4908–4919.

Поступила: 22. 10. 2017.
Принята к печати: 23. 11. 2017.

BIOINFORMATICS ANALYSIS OF ANTIMICROBIAL RESISTANCE GENES AND PROPHAGES COLOCALIZED IN HUMAN GUT METAGENOMES

E.V. Starikova¹, N.A. Prianichnikov¹, E. Zdobnov², V.M. Govorun¹

¹Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine,
1a Malaya Pirogovskaya str., Moscow, 119991 Russia; e-mail: estarikova@rccpcm.org

²University of Geneva Medical School, Geneva, Switzerland

The constant increase of antibiotic-resistant strains of bacteria is caused by extensive uses of antibiotics in medicine and animal breeding. It was suggested that the gut microbiota serves as a reservoir for antibiotics resistance genes that can be carried from symbiotic bacteria to pathogenic ones, in particular, as a result of transduction. In the current study, we have searched for antibiotics resistance genes that are located inside prophages in human gut microbiota using PHASTER prophage predicting tool and CARD antibiotics resistance database. After analysing metagenomic assemblies of eight samples of antibiotic treated patients, *IsaE*, *mdfA* and *cpxR/cpxA* genes were identified inside prophages. The abovementioned genes confer resistance to antimicrobial peptides, pleuromutilin, lincomycins, streptogramins and multidrug resistance. Three (0.46%) of 659 putative prophages predicted in metagenomic assemblies contained antibiotics resistance genes in their sequences.

Key words: metagenomics, antibiotic resistance, bacteriophages