

细菌耐药性进化的代谢约束

周开银

2017年10月30

一、背景

- 代谢通量：反应底物分配在各代谢途径上的反应物的量；也可以指各代谢途径上的反应速率。
- 基于限制的通量平衡分析（Flux balance analysis, FBA）
通量平衡分析方法使用数学上的最优化理论解决生物问题，计算最优的目标函数值以及在目标函数下最优解的集合。从生物的角度来说是根据代谢反应的化学计量学信息以及稳态下的代谢物质量守恒定律使用数学上的线性规划(Linear programming, 以下简称 LP) 来求解通量分布。
- E. coli MG1655 genome-scale metabolic model：将生物体所有相关的代谢信息用数学模型进行模拟通常表现为网络形式。

二、研究内容

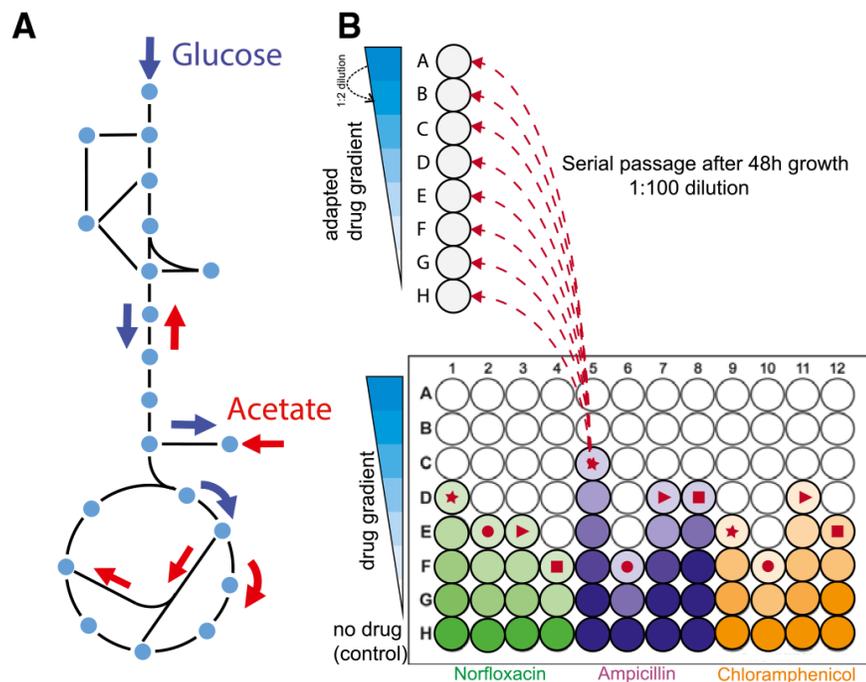
- 研究两种不同的营养条件下大肠杆菌耐药性进化过程中的代谢变化；
- 以大肠杆菌全基因组代谢模型为基础结合基于限制的通量（flux）平衡分析方法并引入影子价格的概念提出新的建模方法；
- 利用该模型结合耐药群体的基因组测序结果研究耐药性与补偿机制之间的关系；

一、耐药性突变的产生和代谢分析

试验一：

目的：研究耐药性进化与细菌生长环境之间的关系

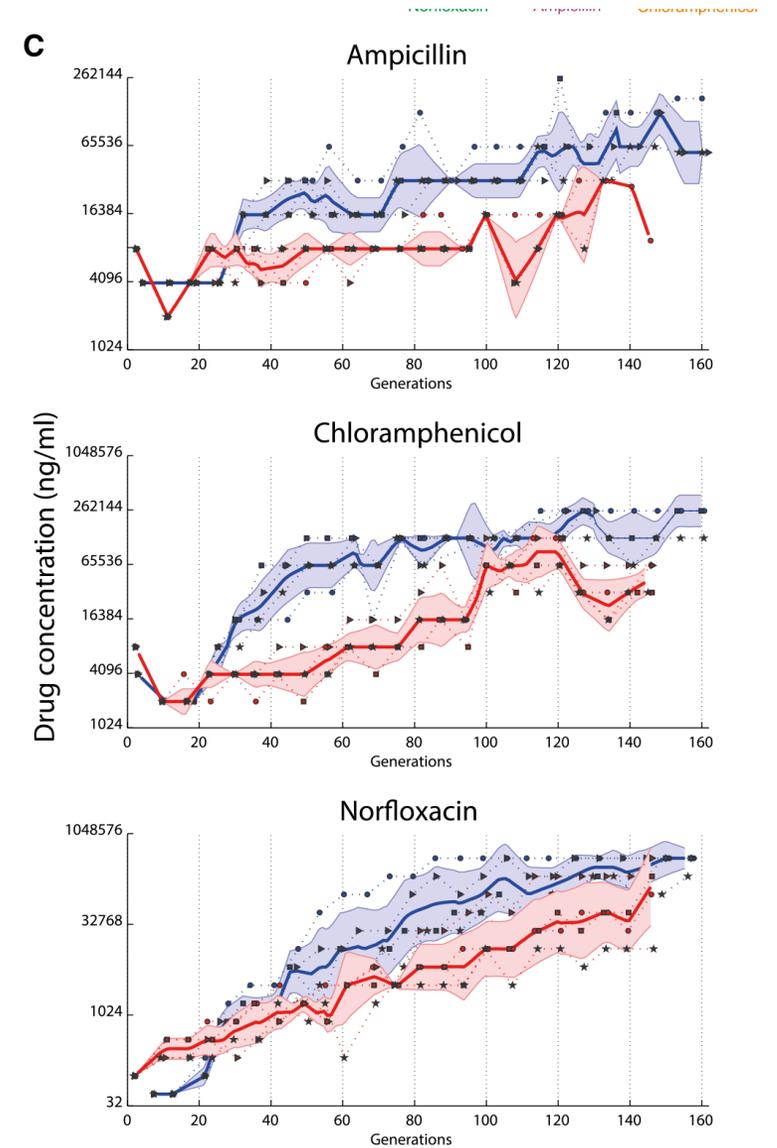
方法：三种抗生素—四种柱系（*E.coli*）—两种碳源（Glu,Ace）—连续传代培养（150-160）—对照组



结果:

- 1、两组不同营养条件下的菌株突变率相同 (Dataset EV1) ;
- 2、同一抗生素条件下以葡萄糖为唯一碳源的菌株获得耐药性的速度要快;

结论: 表明环境条件 (Glu,Ace) 影响耐药性获得的速率 (图C)

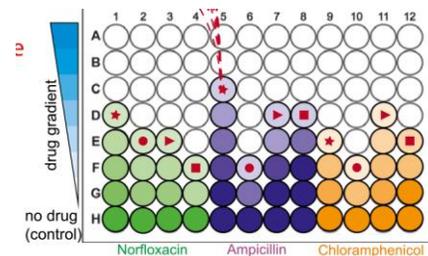
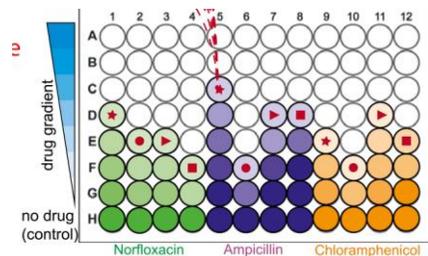


试验二：

目的：弄清代谢影响细菌耐药进化的深层机制

方法：

- 沿进化轨迹选取8个进化群体，每个群体包含24个柱系共192个群体
- 无抗生素基本培养基上培养指数期取样
- 细胞内和细胞外代谢物用质并用质谱检测，分别发现413和392个离子
- 根据测得的离子精确质量推测出分别有586和553种代谢物

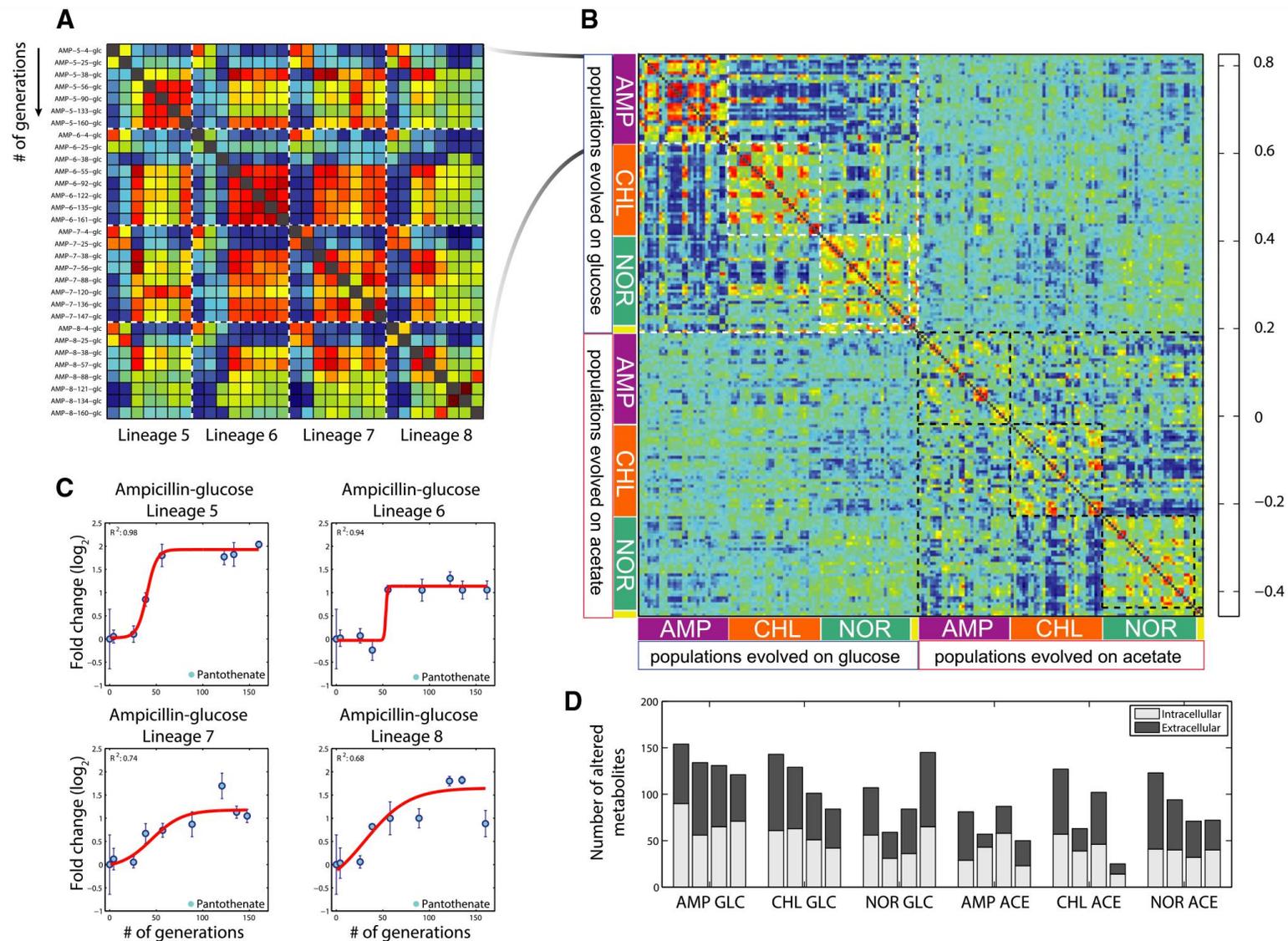


结果:

- 仅经过数代 (30-50代) 细胞内外的代谢物就发生巨大变化 (图A, 图B)
- 相同选择压下这种代谢变化是高度可复制的 (图A)

分析:

- 这里耐药群体表现出普遍的代谢改变, 表明耐药群体代谢适应的改变是由相应的抗生素驱动的与碳源无关 (图A, 图B)
- 为了排除这种代谢改变可能的随机性, 用S型曲线拟合相对代谢丰度 (代谢从初始状态变化到了新的稳定状态) (图C)
- 葡萄糖中细菌代谢物的改变量要比乙酸盐中代谢物的改变大 (图D)
- 葡萄糖为唯一碳源时细菌耐药进化速率快 (试验一), 代谢物改变量大, 这反映了细菌在葡萄糖条件下高度自由的呼吸发酵分解代谢, 所以很有可能细菌在通过改变代谢来提高自己的耐药性。 (图D)



二、通过基于限制的建模方法来解释代谢状态的改变

实验一：

目的：构建模型来描述耐药细胞的代谢状态的改变

理念：之前的实验表明通量的改变通常伴随代谢丰度的改变。因此作者假设进化菌株代谢浓度的改变反映了一种将细胞内通量重定向到特定的但是未知的代谢目标上从而来驱动和补偿细菌的耐药进化。

方法：

- 通过改变大肠杆菌全基因组代谢模型的每一个单独反应来最小化或者最大化细胞代谢通量
- 对于每一个反应计算影子价格（评价目标函数（反应通量）对可获得所有单独代谢产物的灵敏度），影子价格为负数，说明该代谢物是整个反应的限制因素
- 通过置换检验挑选出 耐药进化过程中实验的发现被改变的代谢物中影子价格为负的代谢物被过多表达 的反应（也就是说挑选出明显受代谢物限制的代谢反应）
- 通过系统的搜索这些限制性代谢物明显变化的反应，如过这些反应在耐药进化和耐药补偿中起到积极作用作者就将其作为代谢参数。并且将这些限制性的代谢反应称为 EMCs(进化的代谢特征)

三、利用模型结合耐药群体的基因组测序结果研究耐药性与补偿机制之间的关系

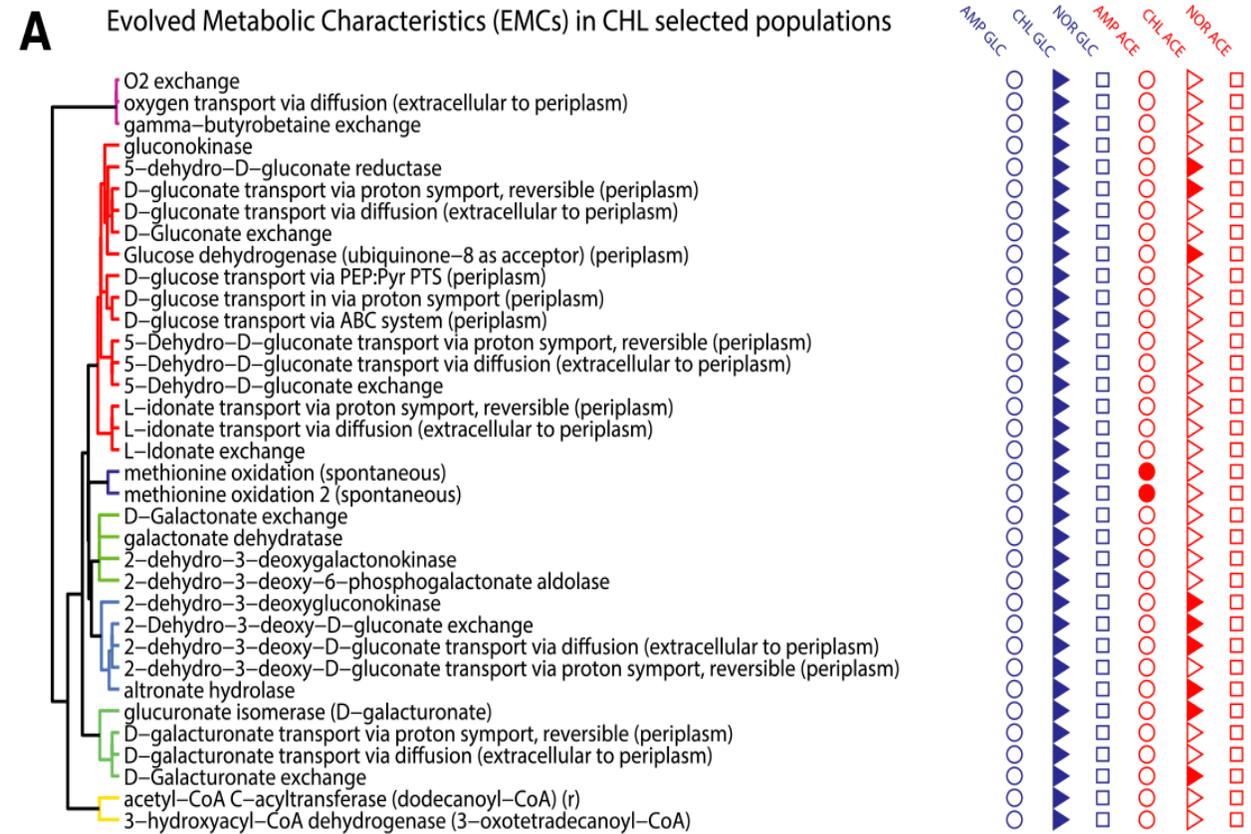
实验一：

方法：

- 用模型预测氯霉素葡萄糖进化群体发现 EMCs 主要涉及糖转运，氧摄取，辅酶A生成几个功能块（图A）

分析：主要的代谢变化发生在葡萄糖分解代谢途径中。

结果：



实验一:

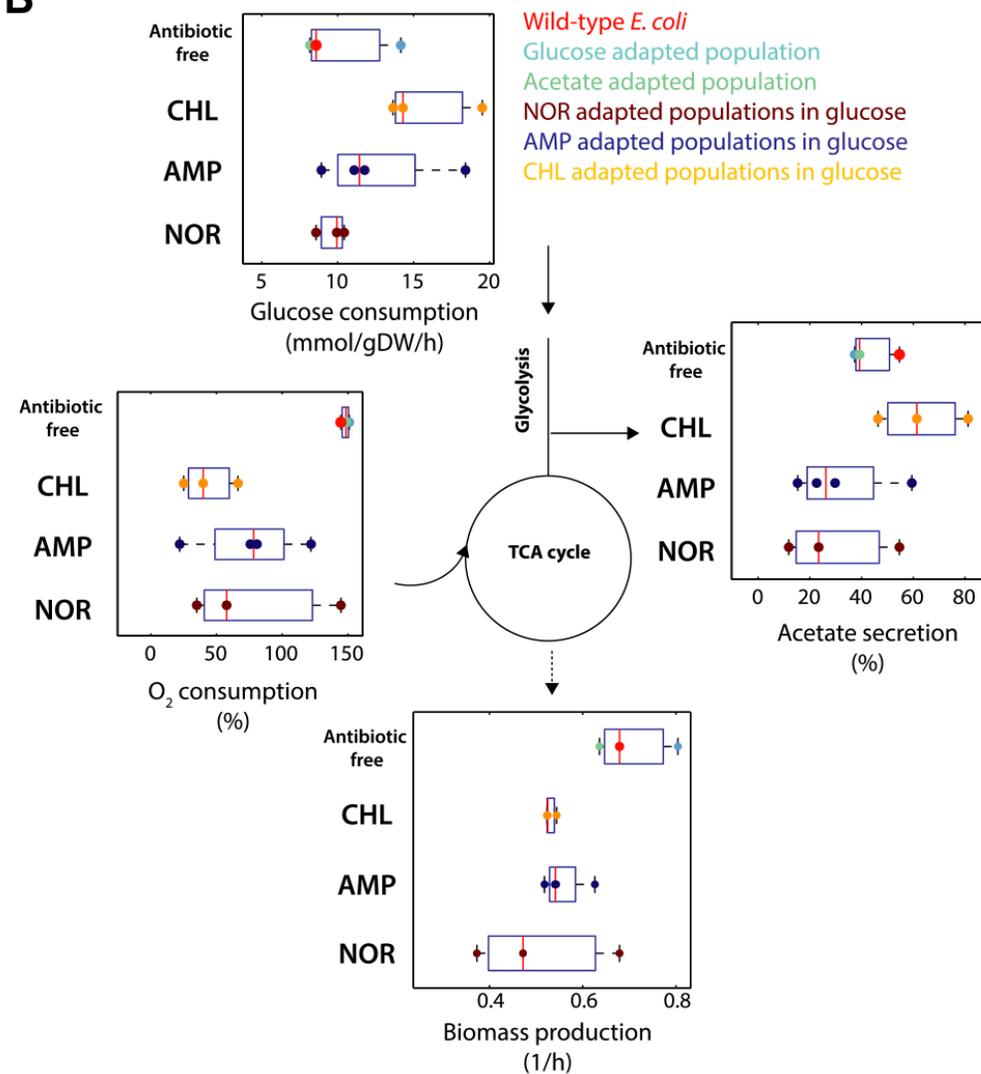
方法:

- 用模型预测氯霉素葡萄糖进化群体发现EMCs主要涉及糖转运, 氧摄取, 辅酶A生成几个功能块 (图A)
- 再具体的分析涉及的功能块代谢反应的变化趋势 (较高葡萄糖消耗, 和酸分泌相对需氧量的减少)。

分析: 生物体在从呼吸代谢向发酵代谢转变

结果:

B



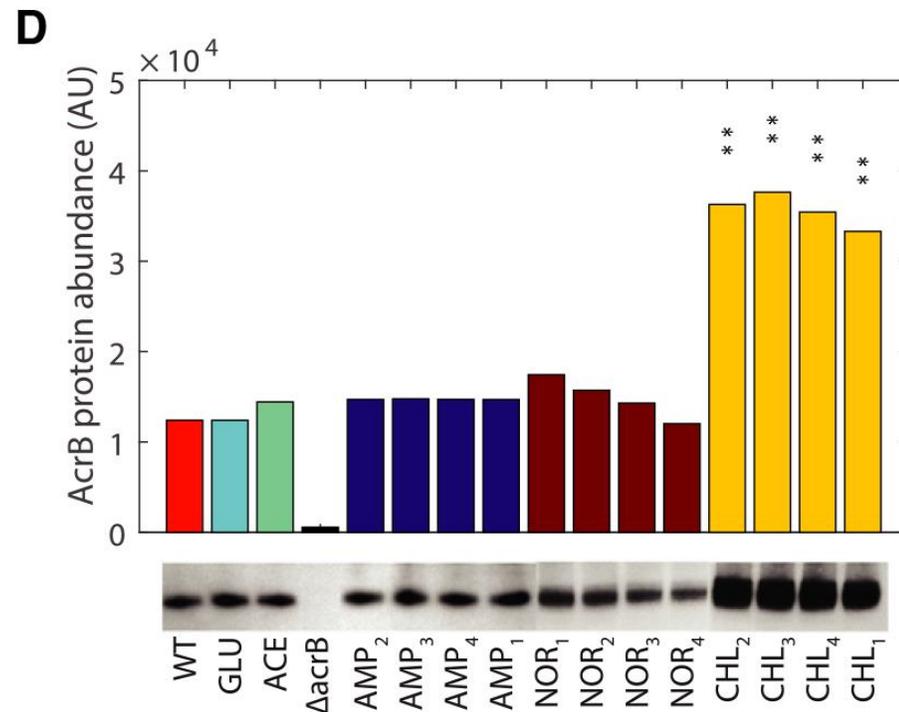
实验一:

方法:

- 用模型预测氯霉素葡萄糖进化群体发现EMCs主要涉及糖转运, 氧摄取, 辅酶A生成几个功能块 (图A)
- 再具体的分析涉及的功能块代谢反应的变化趋势 (较高葡萄糖消耗, 和酸分泌相对需氧量的减少)。
- 通过对耐药群体进化终点的细胞进行全基因组测序, 再利用多变量统计分析来推定哪些基因的突变与所测得的呼吸率相关

结果: 需氧量的减少主要与四个基因相关 (*acrB*, *acrR*, *fecA*, *yjhF*), 其中*acrB*基因处在多药外排泵编码基因的启动子区。(代谢补偿)

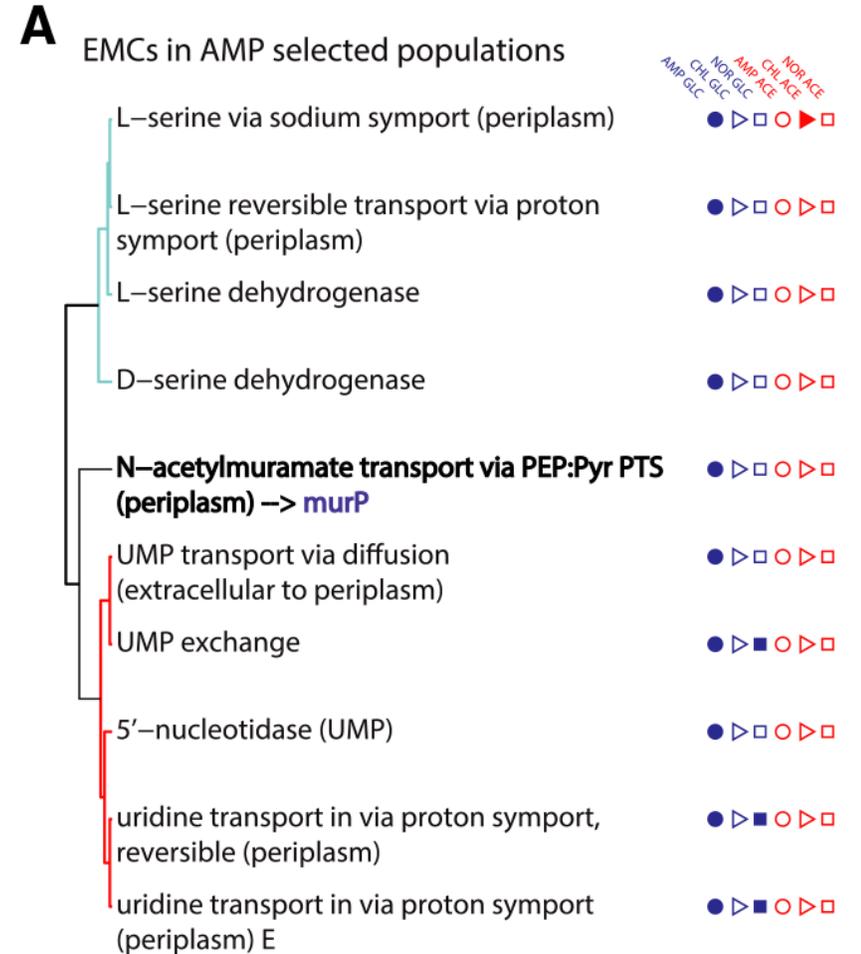
结论: 解释了氯霉素葡萄糖耐药进化的代谢补偿机制。



实验二:

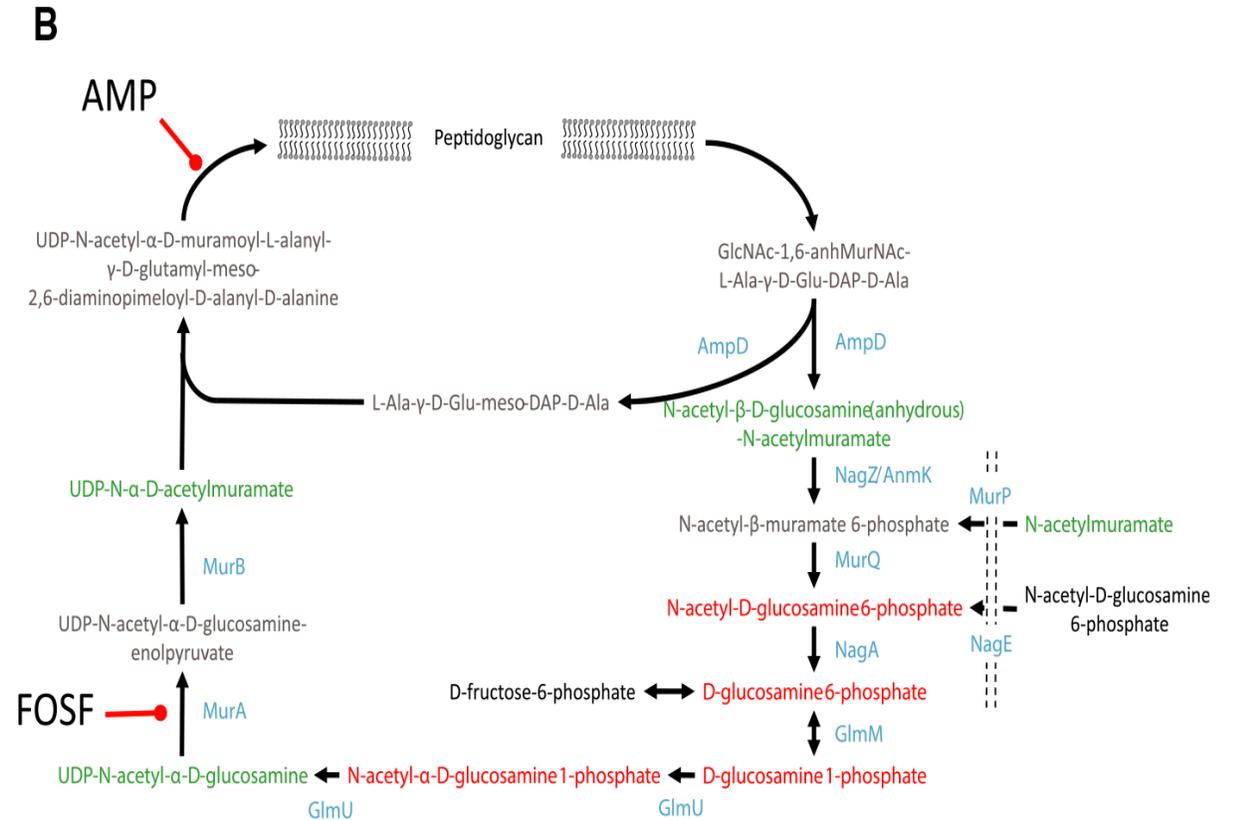
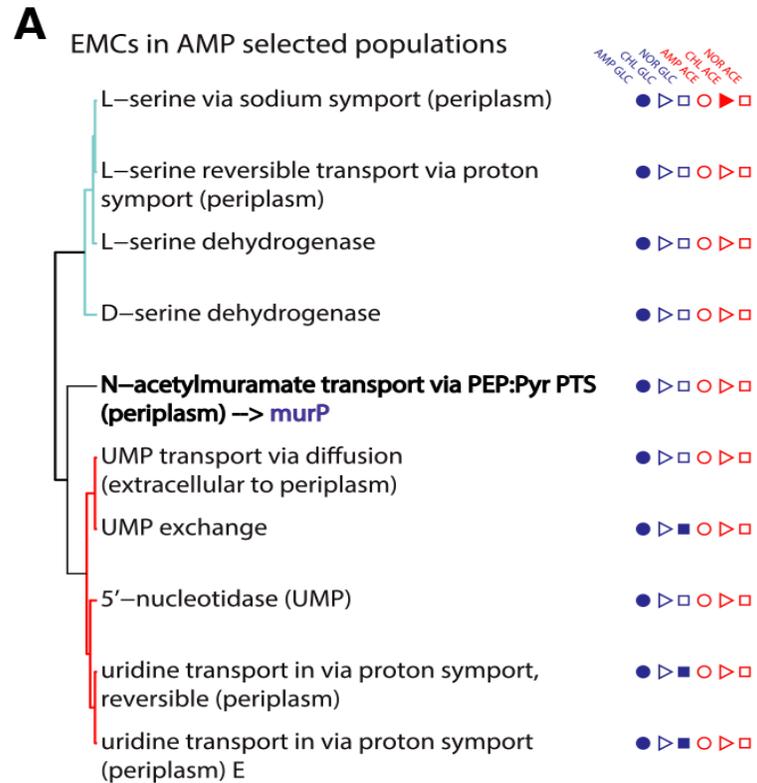
方法:

- 在葡萄糖氨苄青霉素抗性群体中，我们用模型找出主要的EMCs包括核苷酸代谢，丝氨酸生物合成，以及细胞壁回收（图A）



实验二：
方法：

- 在葡萄糖氨苄青霉素抗性群体中，我们用模型找出主要的EMCs包括核苷酸代谢，丝氨酸生物合成，以及细胞壁回收（图A）
- 作者着重分析在细胞壁循环过程中的脱氢胞壁肽(anhydromuropeptide)的转运，因为它最接近实际的氨苄青霉素靶标：肽聚糖生物合成。（图B）

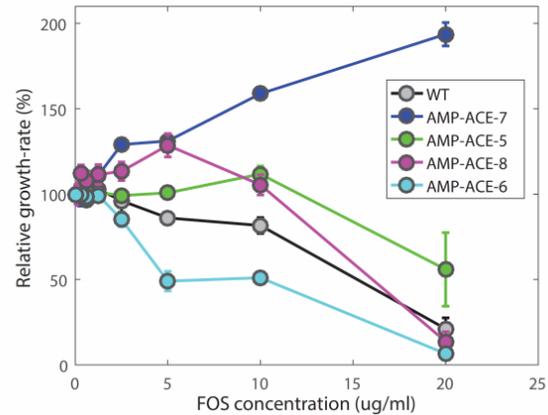
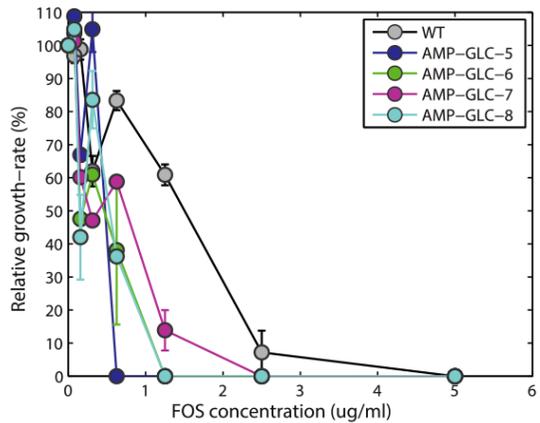


实验二：（细胞壁循环在介导氨基青霉素抗性中的作用）

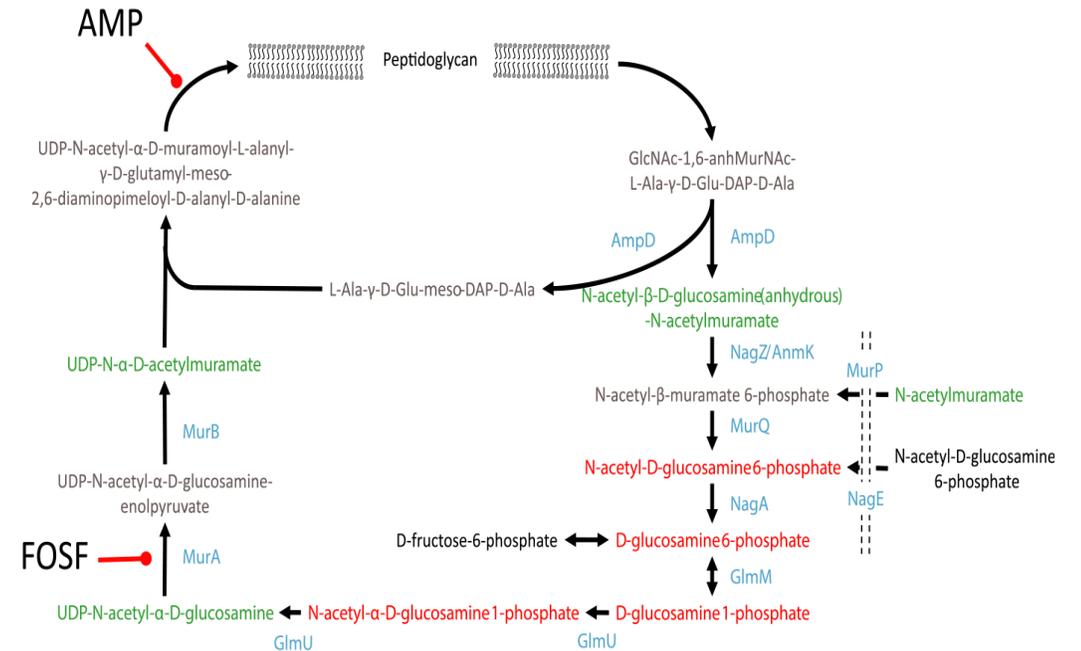
方法：

- 在葡萄糖氨基青霉素抗性群体中，我们用模型找出主要的EMCs包括核苷酸代谢，丝氨酸生物合成，以及细胞壁回收（图A）
- 作者着重分析在细胞壁循环过程中的脱氢胞壁肽(anhydromuropeptide)的转运，因为它最接近实际的氨基青霉素靶标：肽聚糖生物合成。（图B）
- 证明氨基青霉素葡萄糖耐受群体对磷霉素（fosfo-mycin）敏感性高。氨基青霉素乙酸盐耐受群体对磷霉素耐受性高。（研究脱氢胞壁肽的循环在介导氨基青霉素耐药性产生中的重要作用）

C

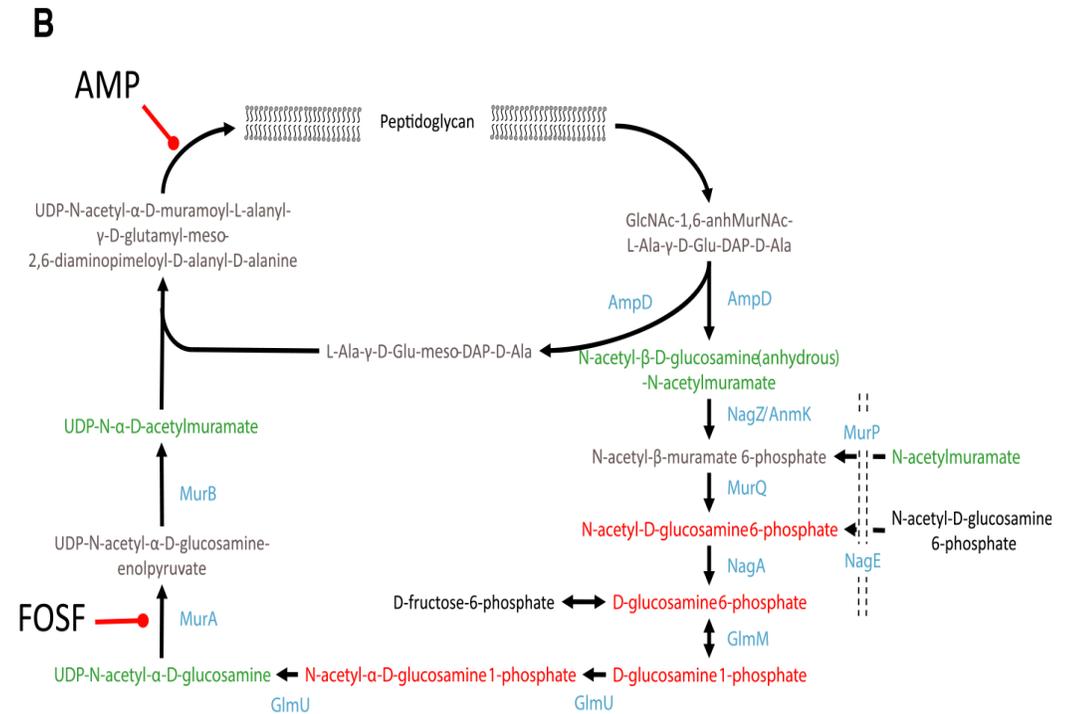


B



分析：脱氢胞壁肽的循环仅在葡萄糖为碳源条件下产生，可能是因为该过程需要葡萄糖PTS磷酸转移蛋白EIIA^{Glc}用以激活乙酰谷氨酸转运蛋白（MurpM），而在以乙酸盐为碳源时EIIA^{Glc}的表达被抑制。

结论：在给定环境下代谢的改变可能有利于耐药的产生但同时也会使得该抗性个体对其它试剂过敏。



结论：

- 1、呼吸发酵代谢的可塑性比呼吸代谢更高。
- 2、细菌耐药的产生将驱动代谢适应和代谢补偿突变。
- 3、在给定环境下代谢的改变可能有利于耐药的产生但同时也会使得该抗性个体对其它抗生素过敏。

➤ **该研究的主要结论或创新点：**

将耐药突变与代谢变化联系在一起，研究代谢如何补偿耐药突变。构建可计算模型使得耐药进化群体的代谢改变可以被有效预测。

➤ **所受到的启发：**

构建合适的生物模型能够有效的帮助我们解决复杂的生物模型，此外对已构建的现有模型加以扩展可以为自己所用。

➤ **此研究有待改进的地方：**

在研究耐药驱动补偿机制的部分显然忽视了其他可能存在的非代谢的补偿。

Thank you