

©Borgis

\*Agnieszka Napiórkowska, Zofia Zwolska, Ewa Augustynowicz-Kopeć

## Mutacje w genie *pncA* jako główny mechanizm oporności na pirazynamid wśród prątków gruźlicy\*\*

### Mutations in the *pncA* gene as a major mechanism of resistance to pyrazinamide among *Mycobacterium tuberculosis*

Zakład Mikrobiologii, Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc, Warszawa  
Kierownik Zakładu: prof. dr hab. n. med. Ewa Augustynowicz-Kopeć

#### Słowa kluczowe

oporność na pirazynamid, gen *pncA*, mutacje, *Mycobacterium tuberculosis*

#### Key words

pyrazinamide resistance, the *pncA* gene, mutations, *Mycobacterium tuberculosis*

#### Adres/address:

\*Agnieszka Napiórkowska  
Zakład Mikrobiologii I GiChP  
ul. Płocka 26, 01-138 Warszawa  
tel./fax +48 (22) 431-21-82  
a.napiorkowska@igichp.edu.pl

#### Streszczenie

**Wstęp.** Postęp w oznaczaniu oporności na PZA dokonał się wraz z poznaniem genomu prątka oraz określeniem molekularnych mechanizmów oporności na lek, jakimi są mutacje w genie *pncA*. Gen *pncA* jest odpowiedzialny za prawidłową syntezę pirazynamidazy (PZaza) przekształcającej lek w jego aktywną formę. Mutacje w genie *pncA* występują na całej jego długości (561pz) oraz w regionie promotorowym. Mają one różnorodny charakter, najczęściej typu *missense* (skutkujące substytucją aminokwasu), ponadto insercje, delecje oraz mutacje typu *nonsense*.

**Cel pracy.** Celem pracy była identyfikacja mutacji w genie *pncA* występujących wśród prątków gruźlicy opornych na pirazynamid.

**Materiał i metody.** Analizie poddano 195 szczepów *M. tuberculosis* opornych na pirazynamid, które zostały wyizolowane od polskich chorych w latach 2000-2011. Mutacje wykrywano, analizując sekwencje genu *pncA* i jego regionu promotorowego (700pz) w porównaniu z sekwencją „dzikiego” genu *pncA* szczepu *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>R<sub>v</sub>.

**Wyniki.** Analiza sekwencyjna genu *pncA* oraz regionu promotorowego wykazała, że 174 (89,2%) szczepy oporne na PZA posiadały mutacje w genie odpowiedzialnym za oporność na ten lek. Wykryto 57 różnych mutacji, które rozmieszczone były wzdłuż całego genu, ponad 60% szczepów wykazywało mutacje w części 3' genu, między kodonem 86 a 187. W pracy zidentyfikowano 25 nowych mutacji, które do tej pory nie zostały zarejestrowane w bazie TB Drug Resistance Mutation Database.

**Wnioski.** Identyfikacja mutacji w genie *pncA* daje możliwość uzyskania w krótkim czasie informacji o PZA-oporności, co skutkuje szybkim włączeniem prawidłowego leczenia chorego na gruźlicę. Przedstawiona w pracy analiza może być podstawą do opracowania wiarygodnych i szybkich testów molekularnych do wykrywania PZA-oporności.

#### Summary

**Introduction.** Progress in the determination of resistance to PZA was made while learning the genome of the mycobacterium and molecular mechanisms of the resistance to the drug, which are mutations in the *pncA* gene. The *pncA* is responsible for the proper synthesis of pyrazinamidase (PZase) which converts the drug into its active form. The *pncA* mutations are highly diverse and scattered along the gene (561 bp) as well as the promoter region. They have diverse character, mostly missense causing amino acid substitutions, in some cases nucleotide insertions or deletions and nonsense mutations.

**Aim.** The aim of the study was to identify mutations in the *pncA* gene among PZA-resistant *M. tuberculosis* strains.

**Material and methods.** This study included 195 PZA-resistant *M. tuberculosis* strains isolated from Polish patients in the years 2000-2011. Mutations in the *pncA* gene were detected by comparing DNA sequences with the corresponding sequence of a wild-type *pncA* gene of *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>R<sub>v</sub>.

\*\*Praca wykonana w ramach projektu systemowego Samorządu Województwa Mazowieckiego pn. „Potencjał naukowy wsparciem dla gospodarki Mazowsza – stypendia dla doktorantów” (Poddziałanie 8.2.2 PO KL). Projekt współfinansowany ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego.

**Results.** The sequence analysis of the *pncA* gene revealed that 174 (89.2%) strains had mutation. 57 different mutations were detected and they were dispersed along the *pncA* gene but more than 60% of the strains showed mutations in the 3' part of the gene (between 86 and 186 codon). Among 57 different mutations 25 not previously reported in TB Drug Resistance Mutation Database were found.

**Conclusions.** Analysis of the *pncA* gene provides rapid information regarding PZA susceptibility in *M. tuberculosis* and may therefore contribute to early optimization of treatment. Analysis of mutations in the *pncA* gene in *M. tuberculosis* strains may contribute to the development of reliable and rapid molecular tests for detection of PZA resistance.

## WSTĘP

Pirazynamid (PZA) należy do grupy głównych leków przeciwprątkowych, który razem z izoniazidem, rifampicyną i etambutolem stosowany jest w rekomendowanym schemacie leczenia. Pomimo że zajmuje bardzo ważne miejsce w leczeniu gruźlicy, WHO nie rekomenduje oznaczenia oporności na ten lek, co wynika głównie z trudności w wykonaniu testu lekooporności na PZA. Postęp w oznaczaniu PZA-oporności dokonał się wraz z poznaniem genomu prątka oraz molekularnych mechanizmów oporności na lek (1, 2).

Podstawowym mechanizmem oporności prątków gruźlicy na pirazynamid są mutacje w genie *pncA* (561 pz). Gen *pncA* odpowiedzialny jest za prawidłową syntezę pirazynamidazy (PZasa) przekształcającej lek w jego aktywną formę (2-4). Wśród szczepów PZA-opornych enzym ten nie wykazuje swojej aktywności lub jego aktywność jest niższa niż u szczepów wrażliwych (2).

Mutacje odpowiedzialne za oporność na PZA występują wzdłuż całego genu *pncA* i obszaru promotorowego oraz mają różnorodny charakter. Najczęściej są to mutacje typu *missense* skutkujące substytucją aminokwasu, ale również insercje, delecje oraz mutacje typu *nonsense* (1, 5). Liczne badania pokazują, że istnieje kilka obszarów w genie *pncA*, które w znaczący sposób mogą wpływać na aktywność pirazynamidazy. Mutacje występujące w pierwszym kodonie (Met1) genu *pncA* zakłócają proces inicjacji translacji (6, 7). Mutacje w kodonie Asp8, który jest częścią triady katalitycznej Cys138-Asp8-Lys96, wpływają na zaburzenie jej prawidłowego funkcjonowania, a co za tym idzie utrudniają proces wiązania substratu podczas katalizy, podobnie w przypadku mutacji w kodonach Lys96 oraz Cys138. Ostatnie badania nad strukturą krystaliczną białka PncA wyizolowanego od *M. tuberculosis* wykazały, że większość obserwowanych mutacji wpływa na zmniejszenie stabilności struktury białka, co w konsekwencji powoduje obniżoną aktywność enzymu. Mutacje dotyczące aminokwasów występujących zarówno w aktywnym centrum katalitycznym, jak i w miejscu wiązania jonów żelaza czy miejscu wiązania substratu są mutacjami bezpośrednio zaangażowanymi w oporność na pirazynamid. Mutacje w kodonach Asp49, His51, His57 oraz His71 skutkują zmianą w miejscu wiązania jonu żelaza. Mutacje w kodonach Asp8, Val9, Thr47, Gly132, Ala134, Cys138 oraz Val139 wpływają na centrum aktywne enzymu, w wyniku czego powodują utratę jego aktywności. Zmiany w kodonach Gln10, Asp12, Ser104 oraz Thr142 zakłócają tworzenie wiązań wodorowych między atomami łańcu-

cha głównego i łańcuchów bocznych białka. Wszystkie z wymienionych mutacji w istotny sposób wpływają na aktywność enzymatyczną białka PncA (8).

## CEL PRACY

Celem pracy była identyfikacja mutacji w genie *pncA* występujących wśród prątków gruźlicy opornych na pirazynamid.

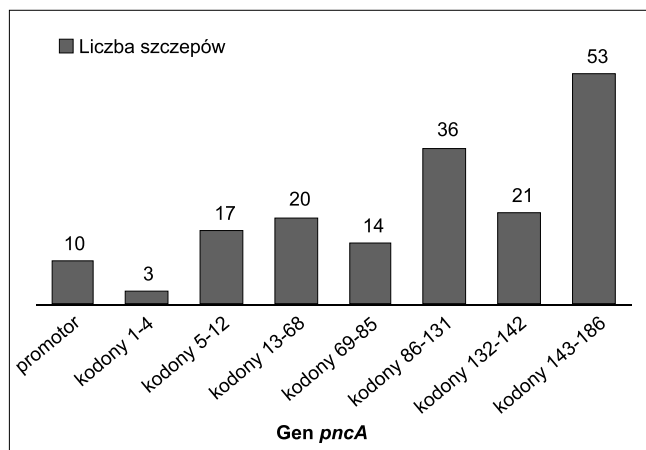
## MATERIAŁ I METODY

Materiał do badań stanowiło 195 szczepów *M. tuberculosis* opornych na pirazynamid, które zostały wyizolowane w latach 2000-2011 od chorych pochodzących z różnych rejonów Polski.

Mutacje w genie *pncA* wykrywano, sekwencjonując gen wraz z jego regionem promotorowym (fragment 700 pz), który otrzymywano w wyniku amplifikacji techniką PCR przy użyciu pary starterów *pncA*<sub>f</sub> (5'-GCTGGTCATGTTTCGCGATCG-3') i *pncA*<sub>r</sub> (5'-GCTTGCGGCGAGCGCTCCA-3') (9). Otrzymane produkty PCR oczyszczano z zastosowaniem zestawu ExoSAP-IT (GE Healthcare, United States), a następnie sekwencjonowano przy użyciu automatycznego analizatora DNA typu ABI PRISM 310 (Applied Biosystems, CA, USA) w Zakładzie Sekwencjonowania DNA firmy Genomed. Do sekwencjonowania używano tych samych primerów, które stosowano w amplifikacji genu *pncA* metodą PCR. Analizę otrzymanych sekwencji nukleotydowych prowadzono przy użyciu programu Chromas 1.45 oraz programu Mutation Surveyor ver. 3.30 (SoftGenetics LLC, USA). Sekwencje analizowano w odniesieniu do sekwencji „dzikiego” genu *pncA* szczepu *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>R<sub>v</sub> dostępnej w bazie GenBank (kod dostępu: NC\_018078).

## WYNIKI

Wśród analizowanej puli 195 szczepów *M. tuberculosis* opornych na PZA, u 174 (89,2%) stwierdzono mutacje w genie *pncA*. Większość analizowanych szczepów posiadało mutację w części 3' genu *pncA*, tj. między kodonem 86 a 186. Mutacje w kodonach 86-131 stwierdzono u 36 szczepów (18,5%), w kodonach 132-142 u 21 (10,8%), w kodonach 142-186 u 53 szczepów (27,2%). Mutacje w genie *pncA* stwierdzono również w kodonach: 1-4 (3 szczepy – 1,5%), 5-12 (17 szczepów – 8,7%), 13-68 (20 szczepów – 10,3%), 69-85 (14 szczepów – 7,2%) oraz w regionie promotorowym (10 szczepów – 5,1%) (ryc. 1).



**Ryc. 1.** Miejsce występowania mutacji w genie *pncA* wśród prątków gruźlicy opornych na PZA.

W analizowanej puli szczepów wykryto 57 różnych mutacji, które rozmieszczone były wzdłuż całego genu *pncA* (tab. 1). Większość wykrytych mutacji (42 z 57) to mutacje punktowe skutkujące substytucją aminokwasów (133 szczepy). Pozostałe mutacje to: 7 delecji (24 szczepy), 5 insercji (7 szczepów) oraz 1 delecja i 2 mutacje punktowe w regionie promotorowym (10 szczepów).

Wśród analizowanych szczepów najczęściej występowały dwie mutacje w genie *pncA*. Była to substytucja T → G w pozycji 347 skutkująca zmianą aminokwasów w kodonie 116 Leu → Arg oraz delecja 6 pz (CCAGCG) w pozycji 533 genu *pncA* skutkująca delecją 178 i 179 aminokwasu ( $\Delta$ 178 Ala, 179 Ser). Odsetek szczepów, u których stwierdzono ww. mutacje, wynosił odpowiednio 10,8% (21 szczepów) oraz 8,2% (16 szczepów).

Analiza sekwencji nukleotydowych i aminokwasowych genu *pncA* pozwoliła na wykrycie u 70 szczepów 25 nowych mutacji, do tej pory niezarejestrowanych w bazie TB Drug Resistance Mutation Database (tab. 1).

## DYSKUSJA

Mutacje w genie *pncA* identyfikowane są u 72-97 szczepów prątków gruźlicy opornych na PZA (3, 4, 10). Jak opisano we wstępie, są to przede wszystkim mutacje typu *missense*, ale również insercje, delecje oraz mutacje *nonsense* (5, 10, 11). W pracy, wśród analizowanych 195 szczepów prątków u 174 (89,2%) stwierdzono mutacje w genie *pncA*. Mutacje te występowały wzdłuż całego genu *pncA*, jednak ponad 60 szczepów wykazywało mutacje w części 3' genu – pomiędzy kodonem 86 a 187. Podobny rozkład mutacji w genie *pncA* obserwowano w Brazylii, gdzie 61 szczepów posiadało mutacje w kodonach od 128 do 171 (12). Inny rozkład zaobserwowali Clemente i wsp., którzy u 60 szczepów mutacje w genie *pncA* zidentyfikowali pomiędzy 46 a 63 kodonem (13). Również Pandey i wsp. częściej stwierdzali mutacje w kodonach od 18 do 57 oraz od 82 do 128 niż w pozostałych regionach genu (14).

Scorpio i wsp. w swoich badaniach nad poszukiwaniem molekularnych podstaw oporności na PZA stwierdzili, że istnieją trzy regiony w genie *pncA*, w których mutacje pojawiają się najczęściej. Do regionów tych należą kodony 5-12, 69-85 oraz 132-142 (15). Lemaitre i wsp., na podstawie badań własnych oraz badań pochodzących z Azji oraz Ameryki Północnej i Południowej, zasugerowali trzy nieco inne regiony genu *pncA*, w których najczęściej występuje mutacja. Regiony te w dużym stopniu pokrywają się z tymi zaproponowanymi przez Scorpio i są to kodony: od 3 do 17, od 61 do 76 i od 132 do 142 (16). Jednak Barco i wsp. w swoich badaniach wykazali, że ponad 60 badanych szczepów prątków gruźlicy posiada mutacje w innych regionach genu *pncA* niż opisywane przez Lemaitre'a i wsp. oraz Scorpio i wsp. Autorzy obserwowali najczęściej mutacje w kodonach 45-59 (23), 96-120 (23) oraz w kodonach 155-172 (18) genu *pncA* (17).

W pracy gen *pncA* podzielono na 8 obszarów, uwzględniając przede wszystkim regiony zaproponowane przez Scorpio, region promotorowy oraz pozostałe sąsiadujące regiony. Z przeprowadzonej analizy wynika, że mutacje w genie *pncA* najczęściej występowały w kodonach od 143 do 187 (27,2%) oraz w kodonach od 86 do 131 (18,5%), a więc w kodonach sąsiadujących z opisanymi przez Scorpio. W kodonach od 5 do 12, od 69 do 85 oraz od 132 do 142 odsetek stwierdzonych mutacji wynosił odpowiednio 8,7%, 7,2% oraz 10,8%.

Przeprowadzona analiza sekwencyjna genu *pncA* pozwoliła na zidentyfikowanie 57 różnych mutacji, z czego większość stanowiły mutacje punktowe (74%) skutkujące substytucją aminokwasów. Pozostałe to delecje (12%), insercje (9%) oraz mutacje w promotorze (5%).

W literaturze światowej szeroko opisywane są mutacje w regionie promotorowym genu *pncA*, które wpływają na proces transkrypcji, a w konsekwencji na syntezę białka (17). Do najczęściej opisywanych należy tranzycja A → G w pozycji -11 przed genem, która występuje wśród różnych pod względem filogenetycznym szczepów (18). Mutację tę stwierdzono u szczepów PZA-opornych izolowanych od chorych w Stanach Zjednoczonych (11), Kanadzie (19), Brazylii (17), Peru (20), Korei (21), Iranie (22), Rosji (5), Portugalii (7) oraz Szwecji (23). W badaniach własnych wśród 10 szczepów posiadających mutacje w regionie promotorowym u 6 stwierdzono substytucję A → G w pozycji -11 przed genem. W tej samej pozycji u trzech szczepów stwierdzono inny typ mutacji – transwersję A → C, która również opisywana jest przez wielu autorów (15, 18). Inne mutacje w regionie promotorowym to: -12T → C (11), -10T → C (24), -7T → C (21) oraz -6G → C (18). W pracy, podobnie jak w badaniach przeprowadzonych przez Stoffelsa i wsp., oprócz mutacji punktowych w regionie promotorowym stwierdzono również delecje. W badaniach własnych była to delecja G w pozycji -8, natomiast w badaniach Stoffelsa delecja A w pozycji -4 (18).

W pracy u 20 szczepów PZA-opornych zidentyfikowano mutacje, które, jak opisano we wstępie,

**Tabela 1.** Mutacje w genie *pncA* wśród 195 szczepów *M. tuberculosis* opornych na PZA.

Kodon	Zmiana w sekwencji nukleotydowej <sup>a</sup>	Zmiana w sekwencji aminokwasowej <sup>b</sup>	Liczba szczepów	%
Promotor	-8 del.G*	-	1	0,5
	-11 A → C	-	3	1,5
	-11 A → G	-	6	3,1
Kodony 1-4	2 T → A*	1 Met → Lys	3	1,5
Kodony 5-12	20 T → C*	7 Val → Ala	3	1,5
	23 A → C*	8 Asp → Ala	4	2,1
	29 A → C	10 Gln → Pro	3	1,5
	29 A → G	10 Gln → Arg	6	3,1
	36 C → G*	10 Asp → Glu	1	0,5
Kodony 13-68	42 C → A*	14 Cys → STOP	2	1,0
	50 G → T	17 Gly → Val	1	0,5
	83 C → A	28 Ala → Asp	1	0,5
	102 C → G*	34 Tyr → STOP	1	0,5
	141-219 del. 79 pz.*	Zmiana ramki odczytu	1	0,5
	147 C → G*	49 Asp → Glu	1	0,5
	153 C → A	51 His → Gln	2	1,0
	153 C → G	51 His → Gln	7	3,6
	185 C → A	62 Pro → Gln	2	1,0
	202 T → G	68 Trp → Gly	2	1,0
Kodony 69-85	211 C → T	71 His → Tyr	1	0,5
	212 A → G	71 His → Arg	3	1,5
	214 T → C	74 Cys → Arg	1	0,5
	226 A → C	76 Thr → Pro	9	4,6
Kodony 86-131	286 A → C	96 Lys → Gln	1	0,5
	292 dup. G*	Zmiana ramki odczytu	1	0,5
	308 A → G	103 Tyr → Cys	2	1,0
	309 C → A	103 Tyr → STOP	1	0,5
	316 T → G*	106 Phe → Val	2	1,0
	321-561 del. 241 pz.*	Zmiana ramki odczytu	1	0,5
	322 G → C*	108 Gly → Arg	1	0,5
	340 A → C	114 Thr → Pro	1	0,5
	347 T → G	116 Leu → Arg	21	10,8
	383 T → G*	128 Val → Gly	1	0,5
	389 del. T*	Zmiana ramki odczytu	1	0,5
	391 dup. G	Zmiana ramki odczytu	3	1,5
	Kodony 132-142	401 C → T	134 Ala → Val	2
403 A → C		135 Thr → Pro	2	1,0
404 C → A*		135 Thr → Asn	9	4,6
416 T → C		139 Val → Ala	1	0,5
422 A → C		141 Gln → Pro	1	0,5
424 A → G		142 Thr → Ala	3	1,5
429 C → T*		142 Pro → Ser	1	0,5
Kodony 143-186		430-434 del. GAGGA*	Zmiana ramki odczytu	2
	446-447 del. AT	Zmiana ramki odczytu	2	1,0
	465 ins. T	Zmiana ramki odczytu	1	0,5
	470 T → C*	157 Val → Ala	9	4,6
	476 T → C	159 Leu → Pro	1	0,5
	478 A → C	160 Thr → Pro	1	0,5
	487 ins. T*	Zmiana ramki odczytu	1	0,5
	486 dup.T*	Zmiana ramki odczytu	1	0,5
	511 G → C	171 Pro → Ala	1	0,5
	512 C → A	171 Ala → Glu	2	1,0
	515 T → G*	172 Leu → Arg	4	2,1
	523 A → G	175 Met → Val	7	3,6
	524 T → C*	175 Met → Thr	4	2,1
	531-536 del. CGCCAG*	178 del. Ala, 179 del. Ser	1	0,5
	533-538 del. CCAGCG*	178 del. Ala, 179 del. Ser	16	8,2

<sup>a</sup>T – Tymina, C – Cytosyna, A – Adenina, G – Guanina, del. – Delecja, ins. – Insercja, dup. – Duplikacja, pz – Par zasad

<sup>b</sup>Ala – Alanina, Arg – Arginina, Asn – Asparagina, Asp – Kwas asparaginowy, Cys – Cysteina, Gln – Glutamina, Glu – Kwas glutaminowy, Gly – Glicyna, His – Histydyna, Leu – Leucyna, Lys – Lizyna, Met – Metionina, Phe – Fenylalanina, Pro – Prolina, Ser – Seryna, Thr – Treonina, Trp – Tryptofan, Tyr – Tyrozyna, Val – Valina

\*Mutacje w genie *pncA*, do tej pory niezarejestrowane w bazie TB Drug Resistance Mutation Database (<http://www.tbdreamdb.com>).

w znaczący sposób obniżają aktywność pirazynamidazy. Dla 3 szczepów zidentyfikowano mutację wpływającą na proces inicjacji translacji (Met1), u 5 mutację zaburzającą funkcjonowanie triady katalitycznej (Asp8 – 4 szczepy, Lys96 – 1 szczep). Mu-

tacje skutkujące zmianą w miejscu wiązania żelaza stwierdzono łącznie u 14 szczepów i dotyczyły one kodonów Asp49 (1 szczep), His51 (9 szczepów) oraz His71 (4 szczepy). Dla trzech szczepów stwierdzono mutacje mające bezpośrednio wpływ na aktywne

centrum enzymu – 3 szczepy (Ala134 – 2 szczepy oraz Val139 – 1 szczep) oraz mutacje zakłócające tworzenie wiązań wodorowych – 13 szczepów (Thr142 – 3 szczepy, Gln10 – 10 szczepów).

W literaturze światowej oprócz mutacji mających negatywny wpływ na strukturę białka PncA, a w konsekwencji na jego aktywność, opisano również mutacje wpływające neutralnie lub stabilizująco na funkcję białka. Mutacje wpływające stabilizująco zlokalizowane są w kodonie 46 oraz 64, mutacje neutralne w kodonach 82, 87, 103, 175. Jedynym wyjaśnieniem charakteru mutacji może być to, że dotyczą one aminokwasów Ala46 (46Ala → Val/Ser/Pro), His82 (82His → Asp/Arg/Leu), Tyr103 (103Tyr → His/Ser/Asp/Cys), położonych w niewielkiej odległości od miejsca wiązania substratu. W związku z tym mogą wpływać na aktywność enzymatyczną pirazynamidazy, ale nie na strukturę samego białka (8).

W pracy zidentyfikowano mutacje opisywane w literaturze jako neutralne i dotyczyły one kodonów: Tyr103 (103 Tyr → Cys – 2 szczepy) oraz Met175 (175 Met → Val – 7 szczepów, 175 Met → Thr 4 szczepy).

Z przeglądu literatury wynika, że większość opisywanych mutacji w genie *pncA* to mutacje punktowe typu *missens* lub mutacje o charakterze niewielkich (1-8-nukleotydowych) delecji lub insercji. W niektórych badaniach stwierdzono jednak insercje (16) lub delecje większej liczby nukleotydów (23), jak również delecję całego genu *pncA* (21, 25). Przykładem jest insercja 29 pz w pozycji 215 genu *pncA* (20), jak również delecje opisywane w badaniach pochodzących z Korei, Turcji, Francji czy Azerbejdżanu. W Korei wśród szczepów opornych na PZA wykryto delecję 80 pz w pozycji 151 genu *pncA* oraz delecję 234 pz w pozycji 56 genu *pncA* (6, 21), w Turcji delecję 167 pz w pozycji 102 genu *pncA* (24), we Francji delecję 68 pz w pozycji 419 genu *pncA* (24), natomiast w Azerbejdżanie delecję 68 pz w pozycji 195 genu *pncA* (25). Wśród szczepów opornych na PZA stwierdzono również delecje większej liczby nukleotydów w genie *pncA*. Była to delecja 79 pz w pozycji 141 genu *pncA* (1 szczep) oraz delecja 241 pz w pozycji 321 genu *pncA* (1 szczep); obie skutkowały zmianą ramki odczytu (ang. *frame-shift*). Wśród 195 analizowanych szczepów prątków gruźlicy nie stwierdzono insercji większej liczby nukleotydów w obrębie genu *pncA*.

Ciekawe zjawisko dotyczące insercji zaobserwowano w badaniach przeprowadzonych we Francji. Szczep oporny na PZA posiadał insercję 1,355 pz w pozycji 341 genu *pncA*, która powodowała duplikację 3 pz docelowej sekwencji, co sugerowało istnienie procesu transpozycji. Autorzy stwierdzili, że sekwencja fragmentu 1,335 pz odpowiada sekwencji insercyjnej *IS6110* (16). Z przeglądu literatury wynika, że francuscy naukowcy po raz pierwszy zidentyfikowali transpozycję kompletnej sekwencji insercyjnej *IS6110* do genu odpowiedzialnego za lekooporność. Sekwencja *IS6110* może być włączana w różne miejsca chromosomu *M. tuberculosis*, jednak z większą częstością włączana

jest w tzw. „gorące miejsca” (ang. *hot spots*), jak np. region DR (ang. *direct repeat*), locus *ipl* (ang. *the IS6110 preferential locus*) oraz DK1 (1). Ten niespotykany fakt można wytłumaczyć tym, że insercja sekwencji *IS6110* wystąpiła w regionie obejmującym sekwencję od 337 do 346 nukleotydu w genie *pncA* (GGCAC ↓ GCCAC), który jest identyczny jak sekwencja *hot spots* w locus *ipl* (od 382 do 391 nukleotydu – GGCACGCCAC) (16).

Analiza sekwencyjna genu *pncA* przeprowadzona wśród szczepów opornych na PZA izolowanych od chorych na gruźlicę w Polsce wykazała, że najczęściej obserwuje się substytucję T → G w pozycji 347 skutkującą zamianą aminokwasów w kodonie 116 Leu → Arg oraz delecję 6 pz w pozycji 533 genu *pncA*. Odsetek szczepów, u których stwierdzono ww. mutacje, wynosił odpowiednio 10,8 oraz 8,2. Transwersja T → G w pozycji 347 genu *pncA* po raz pierwszy została zidentyfikowana przez Marttilę i wsp. w Rosji (5). Obecnie rejestrowana jest w różnych regionach świata, m.in. w Szwecji (23), Hong Kongu (26), Chinach (4), Peru (27), Brazylii (12) i Stanach Zjednoczonych (28). Delecję 6 pz w pozycji 533 genu *pncA* po raz pierwszy zidentyfikowano w niniejszej pracy.

W niniejszej pracy po raz pierwszy zidentyfikowano również 24 inne mutacje, które do tej pory nie zostały zarejestrowane w bazie TB Drug Resistance Mutation Database (29). Większość z nich stanowiły mutacje punktowe (60), następnie delecje (24), insercje (12) oraz mutacje w regionie promotorowym (6).

Jak wspomniano, głównym mechanizmem oporności prątków gruźlicy na pirazynamid są mutacje w genie *pncA*, jednak wyniki badań wielu prac pokazują, że od 3 do 28 szczepów fenotypowo opornych nie posiada mutacji w tym genie (1, 3, 10). W pracy stwierdzono 21 (10,8%) takich szczepów. Brak mutacji sugeruje istnienie innych, alternatywnych mechanizmów oporności na pirazynamid.

W literaturze światowej do alternatywnych mechanizmów oporności na pirazynamid zalicza się: obniżenie absorpcji leku przez komórkę bakteryjną, system aktywnie wypompowujący POA z komórki bakteryjnej (tzw. *efflux pump*) (30), jak również zaburzenia w wiązaniu POA do miejsc jego działania (31). Cheng i wsp. sugerują istnienie genu regulacyjnego, który może prawdopodobnie wpływać na ekspresję *pncA*. Jego zidentyfikowanie pozwoliłoby do końca wyjaśnić podstawy oporności na PZA prątków gruźlicy (19).

Badania przeprowadzone w 2011 roku przez Shi i wsp. wykazały, że za PZA-oporność odpowiedzialne są mutacje w genie *rpsA* (Rv1630) (31). Gen *rpsA* jest genem kodującym rybosomalne białko S1 (RpsA), z którym może łączyć się kwas pirazynowy, zaburzając proces translacji oraz trans-translacji. Autorzy pracy opisali szczep oporny na PZA (MIC > 200 µg/ml) nieposiadający mutacji w *pncA*, z mutacją w genie *rpsA*. Wykrytą mutacją była delecja 3 pz GCC w pozycji 1314 genu *rpsA*, która skutkowała utratą alaniny (ΔAla438) na C-końcu RpsA – regionie, który nie jest wymagany do syntezy białka *in vivo* (1). Naukowcy wyizolowali

wali zmutowane białko RpsA i ocenili jego zdolność do wiązania POA. Kontrolę badania stanowiło białko RpsA wyizolowane z dzikiego szczepu *M. tuberculosis* oraz białko RpsA wyizolowane z *M. smegmatis*, szczepu naturalnie opornego na PZA. Wykazano, że POA wiązało się z RpsA dzikiego szczepu *M. tuberculosis* oraz w niewielkim stopniu z RpsA *M. smegmatis*, nie wiązało się natomiast z białkiem RpsA wyizolowanym ze zmutowanego szczepu. Wyniki badań sugerują, że POA najprawdopodobniej wiąże się z C-końcem białka RpsA. Porównanie sekwencji aminokwasowych RpsA różnych gatunków prątków wykazało, że C-końiec jest najbardziej zmiennym regionem białka wśród szczepów opornych na PZA. Wyniki badań sugerują, że zmiany w opisywanym regionie białka RpsA mogą mieć również wpływ na PZA-oporność.

Aleksander i wsp. badający wpływ mutacji w genie *rpsA* na PZA-oporność wykazali, że szczep wzorcowy *M. bovis* BCG, naturalnie oporny na PZA, oprócz charakterystycznej mutacji w *pncA* (169 A → G, 57His → Asp) posiada również mutację w genie *rpsA* – substytucję G → A w pozycji 1318 genu skutkującą zamianą 440 aminokwasu (440 Ala → Thr). Mutacja ta okazała się konserwatywną zmianą występującą również u pozostałych szczepów *M. bovis* naturalnie opornych na PZA. Wpływ mutacji na PZA oporność pozostaje nadal do ustalenia, choć przypuszcza się, że występowanie jej w sąsiedztwie wspomnianej wyżej

mutacji  $\Delta$ Ala438 może świadczyć o tym, że ma ona wpływ na brak wiązania POA z białkiem RpsA (32).

Badania Simonsa i wsp. pokazują, że wśród pięciu szczepów opornych na PZA, nieposiadających mutacji w genie *pncA*, tylko jeden posiadał mutację w *rpsA*. Była to transwersja A → C w kodonie 260 skutkująca zamianą waliny w izoleucynę (33). Na podstawie badań dotyczących genu *rpsA* oraz reanalizy wyników sekwencjonowania genu *pncA* stwierdzili, że włączenie sekwencjonowania *rpsA* do algorytmu diagnostycznego wykrywającego oporność na pirazynamid (34) zwiększa jego czułość z 72 do 77. Wydaje się, że dwuetapowe określanie oporności metodami molekularnymi, tak jak w przypadku izoniazydu, gdzie INH-oporność identyfikuje się na podstawie mutacji w *katG* oraz *inhA*, może być bardzo przydatne do wykrywania oporności na PZA (35).

## WNIOSKI

1. Wykrycie mutacji w genie *pncA* daje możliwość uzyskania w krótkim czasie informacji dotyczących PZA-oporności, co może przyczynić się do wczesnej optymalizacji leczenia chorego na gruźlicę.
2. Analiza występowania mutacji w genie *pncA* wśród szczepów *M. tuberculosis* opornych na PZA może być podstawą do opracowania wiarygodnych i szybkich testów molekularnych wykrywania PZA-oporności.

## PIŚMIENNICTWO

1. Napiórkowska A: Charakterystyka fenotypowa i molekularna szczepów *Mycobacterium tuberculosis* opornych na pirazynamid (PZA) wyizolowanych od chorych na gruźlicę w Polsce, w latach 2000-2011. Rozprawa doktorska, IGIChP, Warszawa 2014.
2. Zhang Y, Mitchison D: The curious characteristics of pyrazinamide: a review. *Int J Tuberc Lung Dis* 2003; 7(1): 6-21.
3. Campbell PJ, Morlock GP, Sikes RD 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; 55(5): 2032-2041.
4. Hou L, Osei-Hyiaman D, Zhang Z et al.: Molecular characterization of *pncA* gene mutations in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from China. *Epidemiol Infect* 2000; 124(2): 227-232.
5. Marttila HJ, Marjamäki M, Vyshnevskaya E et al.: *pncA* mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from northwestern Russia. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43(7): 1764-1766.
6. Lee KW, Lee JM, Jung KS: Characterization of *pncA* mutations of pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Korea. *J Korean Med Sci* 2001; 16(5): 537-543.
7. Portugal I, Barreiro L, Moniz-Pereira J et al.: *pncA* mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Portugal. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48(7): 2736-2738.
8. Muthaiah M, Jagadeesan S, Ayalasamy N et al.: Molecular Epidemiological Study of Pyrazinamide-Resistance in Clinical Isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from South India. *Int J Mol Sci* 2010; 11(7): 2670-2680.
9. Somoskovi A, Dormandy J, Parsons LM et al.: Sequencing of the *pncA* gene in members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex has important diagnostic applications: Identification of a species-specific *pncA* mutation in "*Mycobacterium canettii*" and the reliable and rapid predictor of pyrazinamide resistance. *J Clin Microbiol* 2007; 45(2): 595-599.
10. Napiórkowska A, Rüsç-Gerdes S, Hillemann D et al.: Characterisation of pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Poland and Germany. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 2014; 18(4): 454-460.
11. Sreevatsan S, Pan X, Zhang Y et al.: Mutations associated with pyrazinamide resistance in *pncA* of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41(3): 636-640.
12. Rodrigues VF, Telles MA, Ribeiro MO et al.: Characterization of *pncA* mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49(1): 444-446.
13. Clemente WT, Soares Lima SS, Palaci M et al.: Phenotypic and genotypic characterization of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008; 62(2): 199-204.
14. Pandey S, Newton S, Upton A et al.: Characterisation of *pncA* mutations in clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates in New Zealand. *Pathology* 2009; 41(6): 582-584.
15. Scorpio A, Lindholm-Levy P, Heifets L et al.: Characterization of *pncA* mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41(3): 540-543.
16. Lemaitre N, Sougakoff W, Truffot-Pernot C et al.: Characterization of new mutations in pyrazinamide-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* and identification of conserved regions important for the catalytic activity of the pyrazinamidase PncA. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43(7): 1761-1763.
17. Barco P, Cardoso RF, Hirata RD et al.: *pncA* mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from the southeast region of Brazil. *J Antimicrob Chemother* 2006; 58(5): 930-935.
18. Stoffels K, Mathys V, Fauville-Dufaux M et al.: Systematic analysis of pyrazinamide-resistant spontaneous mutants and clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56(10): 5186-5193.
19. Cheng SJ, Thibert L, Sanchez T et al.: *pncA* mutations as a major mechanism of pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: spread of a monoresistant strain in Quebec, Canada. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44(3): 528-532.
20. Escalante P, Ramaswamy S, Sanabria H et al.: Genotypic characterization of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Peru. *Tuber Lung Dis* 1998; 79(2): 111-118.
21. Park SK, Lee JY, Chang CL et al.: *pncA* mutations in clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Korea. *BMC Infect Dis* 2001; 1: 4.
22. Doustdar F, Khosravi AD, Farnia P: *Mycobacterium tuberculosis* genotypic diversity in pyrazinamide-resistant isolates of Iran. *Microb Drug Resist* 2009; 15(4): 251-256.

23. Juréen P, Werngren J, Toro JC et al.: Pyrazinamide resistance and *pncA* gene mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52(5): 1852-1854.
24. Yüksel P, Tansel O: Characterization of *pncA* mutations of pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Turkey. *New Microbiol* 2009; 32(2): 153-158.
25. Mestdagh M, Fonteyne PA, Realini L et al.: Relationship between pyrazinamide resistance, loss of pyrazinamidase activity, and mutations in the *pncA* locus in multidrug-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43(9): 2317-2319.
26. Chan RC, Hui M, Chan EW et al.: Genetic and phenotypic characterization of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Hong Kong. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59(5): 866-873.
27. Sheen P, Méndez M, Gilman RH et al.: Sputum PCR-single-strand conformational polymorphism test for same-day detection of pyrazinamide resistance in tuberculosis patients. *J Clin Microbiol* 2009; 47(9): 2937-2943.
28. Morlock GP, Crawford JT, Butler WR et al.: Phenotypic characterization of *pncA* mutants of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44(9): 2291-2295.
29. Sandgren A, Strong M, Muthukrishnan P et al.: Tuberculosis drug resistance mutation database. *PLoS Med* 2009; 6(2): e2.
30. Zhang Y, Scorpio A, Nikaido H et al.: Role of acid pH and deficient efflux of pyrazinoic acid in unique susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide. *J Bacteriol* 1999; 181(7): 2044-2049.
31. Shi W, Zhang X, Jiang X et al.: Pyrazinamide inhibits trans-translation in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* 2011; 333(6049): 1630-1632.
32. Alexander DC, Ma JH, Guthrie JL et al.: Gene sequencing for routine verification of pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a role for *pncA* but not *rpsA*. *J Clin Microb* 2012; 50(11): 3726-3728.
33. Simons SO, Mulder A, van Ingen J et al.: Role of *rpsA* gene sequencing in diagnosis of pyrazinamide resistance. *J Clin Microb* 2013; 51(1): 382.
34. Simons SO, van Ingen J, van der Laan T et al.: Validation of *pncA* gene sequencing in combination with the Mycobacterial Growth Indicator Tube method to test susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide. *J Clin Microbiol* 2012; 50(2): 428-434.
35. Alexander DC, Ma JH, Guthrie JL et al.: Reply to "Role of *rpsA* gene sequencing in diagnosis of pyrazinamide resistance". *J Clin Microb* 2013; 51(1): 383.

otrzymano/received: 30.01.2015  
zaakceptowano/accepted: 05.03.2015