

# Patogeenisten bakteerien evoluutio isännän sisällä

Ida Holmberg

Oulun yliopisto

750376A LuK-tutkielma

Kevät 2017

Avainsanat: antibioottiresistenssi, luonnonvalinta, mutaatio, virulenssi

## Sisällysluettelo

1. Johdanto.....	3
2. Tutkimusmenetelmistä.....	6
2.1. Sekvensointi ja sekvenssidatan analysointi.....	6
2.2. Molekyyltikello.....	8
2.3. Tartuntaverkostot.....	9
3. Mutaatio- ja evoluutionopeudet.....	10
4. Antibioottiresistenssi.....	11
4.1. Antibioottiresistenssin evoluutio <i>Mycobacterium tuberculosis</i> -bakteerilla.....	12
4.2. Monikantainen infektio lisää <i>Helicobacter pylori</i> n geneettistä monimuotoisuutta.....	14
4.3. <i>Burkholderia dolosa</i> -bakteerin paralleeli evoluutio.....	15
5. Vaihtelut virulenssissa.....	16
5.1. Kommensalistisen <i>Haemophilus influenzae</i> -bakteerin aiheuttama invasiivinen infektio.....	17
5.2. Patogeenisen <i>Burkholderia pseudomallei</i> -bakteerin aiheuttama krooninen infektio.....	17
5.3. <i>H. pylori</i> -bakteerin koevoluutio isännän kanssa vähentää sen virulenssia.....	19
6. Yhteenveto.....	20
7. Lähteet.....	21

## 1. Johdanto

Tämän LuK-tutkielman tavoite on ollut koota yhteen viimeisintä tutkimustietoa ihmisten sisällä tapahtuvasta patogeenisten bakteerien evoluutiosta. Koko genomien sekvensointi (whole genome sequencing, WGS) on mahdollistanut aivan uudenlaisen lähestymistavan näiden patogeenien evoluution tutkimiseen ihmisten sisällä. WGS:n yleistymisen myötä on saatu paljon uutta ja tärkeää tutkimustietoa. WGS on esimerkiksi mahdollistanut koko genomilaajuiset luotettavat evoluutionopeuksien määrittäykset. Luotettava nopeuksien arviointi puolestaan on mahdollistanut muun muassa kokonaisvaltaisemman ymmärryksen patogeenisten bakteerien evolutiivisista ja ekologisista prosesseista. Esimerkiksi isännän ja patogeenin välisten vuorovaikutusten, taudin kehittymisen ja leviämisverkostojen ymmärtämiseksi ja arvioimiseksi on oleellista pystyä määrittämään bakteerien evoluutionopeuksia luotettavasti. Tulevaisuudessa näitä tutkimustietoja ja tuloksia voidaan soveltaa monella eri alalla. Tietoja tarvitaan muun muassa taisteluissa patogeenien aiheuttamia infektioita vastaan, esimerkiksi kehiteltäessä uusia lääkkeitä ja hoitokeinoja. Patogeeniset bakteerit ovat uhka ihmisten terveydelle. Niiden aiheuttamat taudit sairastuttavat ihmisiä ja saavat aikaan runsaasti kuolemia ympäri maailmaa. Monilla bakteereilla yleistynyt antibioottiresistenssi tuo omat lisähaasteensa tautien hoitamiseen. Sairastuneiden potilaiden entistä paremman hoidon saavuttamiseksi ja tartuntatautien leviämisen estämiseksi patogeenisten bakteerien toimintamekanismeja täytyy ymmärtää yhä syvällisemmin.

Patogeenisilla bakteereilla on tiettyjä toimintamekanismeja, jotka on liitetty niiden taudinaiheuttamiskykyyn eli virulenssiin. Nämä virulenssitekijät aiheuttavat isännän sairastumisen. Adhesiinien avulla bakteerit tarttuvat isännän solujen pintaan. Seuraavaksi alkaa sarja biokemiallisia prosesseja, joista seuraa isännän immuunipuolustuksen aktivoituminen ja lopulta sairastuminen. Invasiivit ovat bakteerien tuottamia entsyymeitä, joiden avulla ne tunkeutuvat isännän solujen ja kudosten sisälle. Kapseli suojaa bakteereita niin isännän immuunipuolustukselta kuin antibiooteiltakin. Bakteerit tuottavat myös monia erilaisia toksineja, jotka aiheuttavat tuhoa isännän soluissa. Lisäksi joidenkin bakteerien soluseinät sisältävät toksineja, jotka bakteerin kuoltua vapautuvat isäntään aiheuttaen sille hengenvaarallista septistä shokkia. Kaikille lajeille yhteisten konservoituneiden mekanismien lisäksi joillakin lajeilla on vain niille spesifisiä keinoja isännän infektointiin (Wilson *et al.* 2002).

Bakteereilla on tavallisesti yksi kromosomi, joka muodostuu nukleoidi-rakenteeseen pakatusta DNA-molekyylistä, joka on superkierteinen, kaksijuosteinen ja sirkulaarinen (Klug *et al.* 2016). Poikkeuksellisesti joillakin bakteereilla on tavattu myös useampi kromosomi ja muodoltaan lineaarisia kromosomeja (Donkor 2013). Bakteerien genomien koot vaihtelevat runsaasti, usein ne ovat 0,5-10 miljoonaa emäsparia (mega base pairs, Mbp) (Casjens 1998). Bakteereilla voi olla DNA:ta myös kromosomin ulkopuolella rakenteissa,

joita kutsutaan plasmideiksi. Plasmidien koot vaihtelevat ja usein ne sisältävät geenejä, joista on bakteerille valintaetua (Krawiec & Riley 1990). Yleensä plasmidit ovat sirkulaarisia ja kaksijuosteisia (Donkor 2013).

Bakteerien genomi on jatkuvan muutoksen alla ja niiden evoluutio onkin hyvin dynaamista. Näitä muutoksia aiheuttavat pistemutaatiot ja erilaiset genomien uudelleenjärjestelyt, kuten rekombinaatio, inversiot, deletiot ja kahdentumiset. Horisontaalinen geeninsiirto on osoittautunut erittäin tärkeäksi mekanismiksi, jolla bakteerit muokkaavat genomiaan (Juhas *et al.* 2009). Bakteereilla on myös monia muita mekanismeja genomien nopeaan muokkaamiseen. Hypermutaatiolla tarkoitetaan tilaa, jossa pistemutaatioiden nopeus kasvaa huomattavasti DNA:n korjausmekanismien tehokkuuden alentuessa häiriön seurauksena. Bakteri voi muuttaa fenotyyppiään tietyn ominaisuuden suhteen hyvinkin nopeasti geeniekspression säätelyyn vaikuttavien palautuvien mutaatioiden (phase variation) avulla. Valinnan pyyhkäisy (selective sweep) on ilmiö, jossa positiivinen valinta saa aikaan hyödyllisen alleelin frekvenssin nopean yleistymisen ja fiksoitumisen populaatiossa. Bakteeripopulaatiossa yksilöiden resistenssin voimakkuus voi vaihdella alhaisesta voimakkaaseen, ilmiötä kutsutaan heteroresistenssiksi. Kun populaatio altistuu antibiootille, korkea resistenssi leviää nopeasti koko populaatioon ja nopeuttaa adaptoitumista ympäristön muutoksiin (Didelot *et al.* 2016). Muutokset bakteerien genomissa voivat auttaa niitä sopeutumaan muuttuviin tai kokonaan uusiin ympäristöihin.

Patogeenin menestyminen isännässä riippuu sen kyvystä selviytyä, lisääntyä ja levittäytyä uuteen ympäristöön tai isäntään. Monet eri tekijät, kuten isännän luontainen ja hankittu immuunipuolustus, lääkehoidot ja patogeenin kilpailu muiden mikrobien kanssa, sekä bakteerien keskinäiset vuorovaikutukset muokkaavat isännän sisäisiä valintapaineita, jotka johtavat patogeenisten bakteerien evoluutioon. Isännän evolutiivinen kelpoisuus puolestaan riippuu sen kyvystä selviytyä ja lisääntyä samalla estäen taudin kehittymistä ja etenemistä (Bliven ja Maurelli 2016). Jatkuvat konfliktit patogeenien ja isännän välillä johtavat evolutiiviseen kilpavarusteluun (Dawkins & Krebs 1979). Tämä tarkoittaa jatkuvaa ”hyökkäyspuolusta” -kierrettä. Kun isäntä kehittää uuden, paremman puolustusmekanismin estääkseen patogeenin hyökkäyksen, täytyy patogeenin puolestaan kehittää entistä parempi hyökkäysmekanismi, jolla se pystyy välttämään tai voittamaan isännän puolustuksen (Bliven & Maurelli 2016).

Parhaiten hyökkäysmekanismejaan kehittävät bakteerit saavat muita todennäköisemmin siirrettyä geeninsä seuraaville sukupolville. Luonnollisesti, myös isännän genotyyppi säilyy todennäköisemmin populaatiossa, jos kyseiset yksilöt pystyvät paremmin kontrolloimaan ja vastustamaan patogeenien aiheuttamia infektoita. Kilpavarustelumallissa evoluutiota johtaa positiivinen suuntaava valinta ja lopulta hyödylliset alleelit fiksoituvat populaatiossa (Bliven & Maurelli 2016). Toisessa mallissa evoluutiota johtaa frekvenssistä riippuva tasapainottava valinta, tämä ilmenee polymorfismina populaatioissa (Woolhouse *et al.* 2002).

Polymorfismista on etua erilaisissa ympäristöissä. Bakteri voi hyötyä eri alleelista eri puolilla isännän elimistöä tai kolonisoidessaan uutta, eri alleeleita ilmentävää isäntää (Bliven & Maurelli 2016).

Klonaalinen interferenssi on tyypillinen ilmiö suurissa aseksuaalisissa populaatioissa. Se muodostuu, kun useampi hyödyllinen mutaatio tapahtuu rinnakkain elävissä yksilöissä ja nämä linjat kilpailevat keskenään estäen toistensa fiksoitumisen (Fogle *et al.* 2008). Myös isännän sisäisen ympäristön monimuotoisuus saattaa suosia erilaisia rinnakkain eläviä linjoja johtaen polymorfismiin fiksoitumisten sijaan (Lieberman *et al.* 2014). Ihmisen sisällä elävissä populaatioissa esiintyy sekä suuntaavaa että tasapainottavaa valintaa. Lieberman *et al.* (2014) tutkivat *Burkholderia dolosa* -bakteerin monimuotoisuutta kystistä fibroosia sairastavilla potilailla. *B. dolosa* -bakteerin monimuotoisuus paljastaa, että mutaatiot fiksoituvat harvoin isännän sisäisissä populaatioissa. Sen sijaan erilaistuneet linjat voivat elää rinnakkain vuosien ajan. Positiivisen valinnan seurauksena yleistyneet mutaatiot eivät siis fiksoitu, vaan säilyvät kohtalaisilla frekvensseillä rinnakkain populaatiossa. Etenkin pitkissä kroonisissa infektioiden polymorfismi on yleistä.

Luonnonvalinta säilyttää hyödyllisiä ominaisuuksia ja karsii huonoja ominaisuuksia. Tätä kuvioita mutkistaa kuitenkin geneettinen ajautuminen ja antagonistinen pleiotropia. Antagonistinen pleiotropia tarkoittaa tilannetta, jossa yksi geeni vaikuttaa useampaan kuin yhteen fenotyyppiin, joista osa voi olla hyödyllisiä ja osa puolestaan haitallisia (Williams 1957). Tällaisen geenin säilyminen populaatiossa riippuu pitkälti sen tuoman edun välttämättömyydestä eliön kelpoisuuden kannalta. Patogeeniset bakteerit voivat kehittää mekanismeja neutraloidakseen antagonistisesta pleiotropiasta aiheutuvia haitallisia vaikutuksia ja voidakseen säilyttää kyseisten geenien tuomat edut. Näitä mekanismeja ovat geeniekspression ajallinen säätely ja geenin inaktivaatio. Lisäksi bakteri voi yksinkertaisesti vain sietää haittoja, mikäli edut ovat riittävän suuret (Bliven & Maurelli 2016).

Tarkasteltaessa patogeenisten bakteerien ja isännän koevoluutiota on bakteereilla monia etuja isäntään nähden. Bakteerien sukupolven pituus on huomattavasti lyhyempi kuin ihmisellä, mikä puolestaan johtaa hyödyllisten alleelien nopeampaan valintaan ja fiksaatioon populaatiossa. Bakteerien populaatiokoko on usein myös isompi ja sallii siten suuremman geneettisen monimuotoisuuden, johon valinta voi kohdistua. Monet bakteerit hyödyntävät lisäksi horisontaalista geeninsiirtoa, mikä mahdollistaa hyödyllisten alleelien nopean leviämisen kantojen tai jopa lajien välillä. Myös patogeenisten bakteerien kilpailu muiden mikrobien kanssa vaikuttaa väistämättä niiden evoluutioon. Bakteereilla on mekanismeja, joilla ne eliminoivat mahdollisia kilpailijoihinsa (Bliven & Maurelli 2016).

## 2. Tutkimusmenetelmistä

### 2.1. Sekvensointi ja sekvenssidatan analysointi

Ensimmäiset sekvensointimenetelmät kehiteltiin jo 1970-luvulla (Sanger *et al.* 1977). Vuonna 2005 tuli markkinoille ensimmäiset uuden sukupolven sekvensointilaitteet ja tästä alkoi huima sekvensointimenetelmien kehittyminen, joka on tehnyt sekvensoinnista edullisempaa ja nopeampaa. Nämä uudistukset ovat mahdollistaneet myös bakteerien koko genomien sekvensoinnit. *Haemophilus influenzae* on ensimmäinen bakteeri, jonka genomi sekvensoitiin kokonaan (Fleischmann *et al.* 1995). Sekvensoinnin jälkeen vuorossa on genomien annotaatio. Bakteereilla tässä prosessissa sekvenssiä verrataan tietokantojen sisältämään sekvenssidataan ja päätellään aiemman tiedon avulla genomien eri osien vaikutuksia bakteerin erilaisiin rakenteisiin ja toimintoihin (Donkor 2013). Koko genomien sekvensointi on tuonut aivan uudenlaisen lähestymistavan patogeenisten bakteerien tutkimiselle. Sen avulla saadaan tietää bakteerien geneettinen koostumus. Tätä tietoa puolestaan voidaan käyttää virulenssia aiheuttavien geenien etsimiseen, lääkeaineiden vaikutusten tutkimiseen molekyylitasolla ja edelleen entistä parempien lääkkeiden ja hoitomuotojen suunnitteluun (Weinstock 2000).

Tutkittaessa ihmisen sisällä eläviä populaatioita tarvitaan näitä mikrobeja sisältäviä näytteitä. Näytteitä voidaan kerätä yhdestä tai useammasta paikasta elimistöä ja niitä voidaan kerätä joko useampi rinnakkain (poikittaistutkimus) tai pidemmän ajan kuluessa (pitkittäistutkimus) (Didelot *et al.* 2016). Näyte voidaan sekvensoida sellaisenaan monen bakteerikannan poolina tai siitä voidaan erotella eri kannat viljelemällä isolaatteja, jolloin sekvensoidaan useampi genomi. Sekvensoitaessa DNA-poolia, tarkastellaan sekvenssilukemia (reads) variaation osalta ennen genomien koostamista. Toisessa lähestymistavassa näytteen sisältämiä mikrobeja kasvatetaan sopivilla alustoilla, joista voidaan myöhemmin kerätä yksittäisiä kolonioita ja edelleen kasvattaa niitä omissa puhdasviljelmissä. Tässä menetelmässä tavoite on sekvensoida useampi eri genomi (Didelot *et al.* 2016).

Tavallisesti sekvensoituja genomipätkiä koostetaan aiemmin sekvensoidun viitegenomin avulla. Kun viite- ja kohdegenomi ovat riittävän samanlaisia, voidaan hyvälaatuiset sekvenssilukemat linjata viitegenomiin. Peittävyys kertoo, kuinka kattavasti koko genomi on saatu sekvensoitua. Syvyys tarkoittaa samaan kohtaan tulevien samanlaisten sekvenssipätkien määrää. Peittävyydellä ja syvyydellä voidaan arvioida sekvensoinnin onnistumista ja luotettavuutta. Koostettuja sekvenssinpätkiä verrataan viitegenomiin, mitä kutsutaan varianttien etsinnäksi (variant calling). Mikäli viite- ja kohdegenomin pätkät eroavat runsaasti tai syvyys on alhainen, voidaan kyseinen alue jättää määrittelemättömäksi. On myös mahdollista koota genomi muilla menetelmillä, jos riittävän samanlaista viitegenomia ei löydy. Tällöin ei usein saada koottua koko genomia vaan ainoastaan osia siitä, kontiikeiksi kutsuttuja segmenttejä. Erityisen haasteellisia koostettavia ovat

toistoalueet (repetitive regions), joita sisältävät esimerkiksi pintaproteiineja koodaavat geenit (Didelot *et al.* 2016).

Yksinkertaisin menetelmä genomien vertailuun on laskea paikat, joissa kaksi genomia eroaa toisistaan. Mikäli genomit ovat samasta isännästä, kertoo erojen määrä isännän sisäisestä monimuotoisuudesta. Kun genomit ovat eri isännistä, erojen määrä heijastaa leviämisverkostoja. Vertailtaessa useampaa kuin kahta genomia rekonstruoidaan yleensä niiden sukupuu käyttäen fylogeneettisiä metodeja. Evoluutionopeutta voidaankin määrittellä samasta isännästä kerätyistä useista peräkkäisistä genomipareista. Peräkkäin kerätyistä näytesarjoista rakennetaan sekvensoinnin jälkeen fylogeneettinen puu ja sen sisältämälle informaatiolle voidaan suorittaa lineaarinen regressioanalyysi. Toiselle akselille sijoitetaan keräysajankohdat ja toiselle jokaisen haaran geneettinen etäisyys juuresta (root-to-tip genetic distance). Voimakas positiivinen lineaarinen riippuvuus näiden kahden muuttujan välillä paljastaa sekvenssien muuntelun kasvavan ajan kuluessa (temporal signal) ja siksi ne soveltuvat analysoitavaksi molekyylikellomalleilla. Lisäksi lineaarinen regressioanalyysi antaa suuntaavaa tietoa molekyylien evoluutionopeudesta ja viimeisestä yhteisestä kantaisästä (most recent common ancestor, MRCA). Luotettaviin evoluutionopeuksiin ja genealogisiin määrittelyihin regressioanalyysi ei kuitenkaan sovellu, koska siinä käytetyt datapisteet eivät ole itsenäisiä yhteisen kantaisän vuoksi ja ne pohjautuvat fylogenian piste-estimointiin (Biek *et al.* 2015). Bayesilaiset fylogeneettiset menetelmät (esim. BEAST) soveltuvat sekä evoluutionopeuksien että genealogian määrittelyihin. Nämä analyysit pohjautuvat molekyylikellomalliin. BEAST (bayesian evolutionary analysis by sampling trees) ohjelma on suosittu työkalu, kun halutaan selvittää sekä evoluutionopeutta että ajoitettua genealogiaa eri aikaan kerätyistä genominäytteistä (Drummond & Rambaut 2007). Bayesilaisten menetelmien heikkoutena on rekombinaation huomiotta jättäminen (Biek *et al.* 2015). On olemassa menetelmiä, joissa huomioidaan rekombinaatio fylogeneettisissä rekonstruktioissa (Croucher *et al.* 2015; Didelot & Wilson 2015).

Populaatio määritellään ajassa kehittyväksi, mikäli MRCA:sta eronneen linjan erilaistuminen on riippuvainen ajasta siten, että pidemmän ajan kuluessa erot kasvavat. Lisäksi sekvenssierojen täytyy olla tilastollisesti merkitseviä. Sovitettaessa evolutiivisia analyyskejä tällaisiin ajassa kehittyviin populaatioihin on tärkeää huomioida millaisella aikaskaalalla näytteet on kerätty. Fylogeneettisissä molekyylikellomalleissa puun jokaisen haaran pituus korreloi kuluneen ajan kanssa. Monilla bakteereilla uudenlaisen geneettisen muuntelun syntymiseen kuluva aika on samaa luokkaa tai jopa hitaampaa kuin isännästä toiseen isäntään siirtymiseen tarvittava aika. Tästä johtuen tartuntaverkkojen selvittäminen ei voi perustua pelkästään sekvensseissä havaittaviin muutoksiin. Yhdistämällä geneettiseen dataan epidemiologista informaatiota voidaan lisätä analyysiin tarkkuutta. Epidemiologinen data voi olla esimerkiksi maantieteellistä (Biek *et al.* 2015).

## 2.2. Molekyyltikello

Molekyylitikellon avulla voidaan määrittää sekä evoluutionopeuksia että aikaskaaloja genomisesta datasta. Nykyisin molekyylitikellon avulla tehtävät genominlaajuiset määrytykset voivat paljastaa oleellisia asioita evolutiivisista prosesseista ja mekanismeista ja siten luovat datakehikon muille biologisille analyyseille (Ho & Duchêne 2014; Ho 2014). Evoluutionopeuksien vaihtelun niin linjojen välillä kuin saman genomin sisälläkin tiedetään nykyään kuuluvan luontaisena osana evoluutioprosessiin (Ho 2014). Molekyylitikellomalleja onkin monia erilaisia ja ne soveltuvat kaikki erilaisen datan käsittelyyn (Ho & Duchêne 2014). Molekyylitikellomalleilla määritetään fylogeneettisten haarojen evoluutionopeuksia, mikä mahdollistaa eri linjojen haarautumiskohtien ajoittamisen arvioinnin. Molekyylitikello pitää kalibroida, jotta voidaan asettaa oikeanlainen aikaskaala fylogeneettiseen puuhun. Kalibrointi suoritetaan usein paleontologisen tai geologisen informaation avulla (Ho 2014).

Ensimmäinen molekyylitikellohypoteesi esiteltiin jo 1960-luvulla (Zuckerlandl & Pauling 1962). Tämä alkuperäinen molekyylitikello oletti geneettisen muuntelun syntyvän tasaisella vauhdilla kaikissa linjoissa ja siten sen avulla voitiin päätellä linjojen välisiä evolutiivisia eroamisajankohtia (Ho & Duchêne 2014). Neutraaliteoria ja molekyylitikello ovat edelleen tärkeitä nollamalleja evolutiivisissa analyyseissä (Ho 2014). Alkuperäistä, nykyään nollamallina pidettyä molekyylitikelloa käytetään yhä ainakin testattaessa evoluutionopeuksien eroja linjojen välillä. Lisäksi sitä käytetään dataan, mikä sisältää vain vähän geneettistä muuntelua, esimerkiksi yhden populaation näytteistä koostuvan datan käsittelyssä (Brown & Yang 2011). Ensimmäinen molekyylitikellomalli tuomittiin pian puutteelliseksi, koska linjojen evoluutionopeuksissa havaittiin yhä useammin runsaasti muuntelua (Ho & Duchêne 2014). Tämän seurauksena alettiin kehittää tehokkaampia metodeja evolutiivisten aikaskaalojen määrittämiseksi. Näihin metodeihin kuuluvat mallit, jotka huomioivat evoluutiovaudin heterogeenisyyden eri linjoissa ja linjojen sisällä (Welch & Bromham 2005). Nämä relaxoituneet kellomallit sallivat nopeuden vaihtelut linjojen välillä ja siten jokaisella fylogenian haaralla voi olla oma nopeutensa (Ho 2014). Molekyylitikellon evoluutionopeuksia ymmärretään paremmin yleistyneen sekvenssidatan vuoksi. Suurien datasettien myötä tilastollisten menetelmien tehokkuus ja merkitys korostuu molekyylievoluution hypoteesien testauksissa. Kerralla käsiteltävän datamäärän kasvun seurauksena onkin kehitetty parametrisia molekyylievoluutiomalleja. Tärkeä edistysaskel kehittyneempien menetelmien myötä on se, että voidaan tarkastella paremmin fylogenioiden haarojen välisiä vaihteluita nopeuksissa. Näissä menetelmissä huomioidaan niin erilaisten biologisten kuin ympäristökijöidenkin vaikutukset evoluutionopeuksiin (Ho 2014). Aineistolle sopivan mallin valitseminen on tärkeä vaihe kaikissa fylogeneettisissä ajoittamisen analyyseissä.

### 2.3. Tartuntaverkostot

Koko genomien sekvensointia hyödynnetään rekonstruoidessa patogeenisten bakteerien tartuntaverkkoja isäntien välillä. Genomien sekvenssien käyttö tartuntaverkoston selvittämisessä perustuu ajatukseen, että luovuttajan ja vastaanottajan näytteiden genomien sekvenssit ovat identtisiä tai ainakin hyvin samankaltaisia toistensa kanssa (Didelot *et al.* 2016). Suuri osa tähän asti tehdyistä tutkimuksista on perustunut ainoastaan yhdestä isolaatista sekvensoituaan genomiin per isäntä ja yksinkertaistettuihin oletuksiin, kuten geneettisesti homogeenisiin kantajiin ja tartuntatapahtumiin (Didelot *et al.* 2016; Worby *et al.* 2014). Näissä tutkimuksissa ei ole huomioitu lainkaan isännän sisäistä monimuotoisuutta (Didelot *et al.* 2016). Isännän sisäiset bakteeripopulaatiot ovat kuitenkin usein heterogeenisiä ja siten oletus homogeenisestä populaatiosta ja tarttumisreittien selvittäminen yhden isolaatin genomien perusteella johtavat virheellisiin tuloksiin (Worby *et al.* 2014). Sekvensoimalla kustakin isännästä joko pitkittäin tai poikittain kerättyjä useampia genomeja voidaan tarkastella isännän sisäistä monimuotoisuutta ja siten lisätä tarkkuutta verkostojen selvittämiseen. Kuitenkin, vaikka saataisiin kaikki mahdolliset genomit sekvensoitua ja siten tieto isännän sisäisestä monimuotoisuudesta, jää tartuntakuvioiden edelleen vielä paljon epävarmuutta. Sekvenssidatan käyttö yksinään tartuntaverkkojen selvittämisessä ei anna luotettavia tuloksia. Vaikka yksittäiset tapaukset jäävätkin epäselviksi, voidaan useita näytteitä keräämällä kuitenkin selvittää ryhmiä, joiden yksilöt kantavat hyvin samankaltaisia bakteeripopulaatioita ja siten sijaitsevat lähellä toisiaan tartuntaverkossa. Tämä paljastaa tartuntaverkon ja taudin puhkeamisen suurempia kehityslinjoja ja yleisiä trendejä, kuten leviämistä eri yhteisöjen tai maiden välillä (Worby *et al.* 2014).

Monet tartuntaverkkoja selvittävät menetelmät sisältävät vaiheen, jossa rekonstruoidaan bakteerien fylogeneettiset suhteet. Geneettisten varianttien avulla rakennettu fylogeneettinen puu ei kuitenkaan heijasta suoraan tartuntaverkkojen järjestystä ja aikaa. Fylogeneettinen puu ja tartuntaverkkoja kuvaava puu siis eroavat toisistaan (Worby *et al.* 2014; Didelot *et al.* 2016). Isännän pitkä kantoaika ja patogeenin genomisen evoluution nopeus saattavat hankaloittaa suorien tartuntakuvioiden selvittämistä yhden ainoan isolaatin genomien perusteella (Balloux 2010). Joissakin tapauksissa käytetään molekyylikelloa arvioimaan tartuntatapahtuman uskottavuutta. Tämä lähestymistapa vaatii homogeenisen tartuntatapahtuman ja robustin arvion mutaationopeuksista (Didelot *et al.* 2013). Tartuntaverkkoja selvitetään myös painotetuilla graafien optimoinneilla (weighted graph optimization) (Jombart *et al.* 2011). Esimerkiksi Markov chain Monte Carlo (MCMC) algoritmeilla selvitetään kaikki mahdolliset tartuntakuviot (Morelli *et al.* 2012; Ypma *et al.* 2012).

Tarttumistapahtuma edellyttää bakteerin sisältävän näytteen siirtymisen kantajasta alttiiseen yksilöön. Siirrossa populaatio käy läpi pullonkaulan ja vain pieni osa alkuperäisestä populaatiosta siirtyy, pystyy kasvamaan ja mutatoitumaan uudessa ympäristössä (Worby *et al.* 2014). Monimuotoinen

bakteeripopulaatio isännän sisällä on peräisin monikantaisesta tartunnasta, populaation monimuotoisuuden kasvamisesta mutaation tai muun geneettisen muutoksen seurauksena infektion aikana tai useasta eri infektion lähteestä. Infektioereittien selvittämisestä voi olla monia hyötyjä. Reittien avulla voidaan ymmärtää paremmin infektioiden dynamiikkaa, riskipopulaatioita ja niiden tartuntakontakteja sekä ylipäättään kontrolloida infektoita paremmin (Robinson *et al.* 2013). Tartuntaverkkojen selvittämiseen liittyy monia ongelmia. Isännän sisäinen monimuotoisuus itsessään ja siitä johtuva geneettisesti heterogeeninen tartuntatapahtuma hankaloittavat tartuntaverkkojen selvittämistä, sillä yhden isännän isolaattien genomit voivat linkittyä useaan toiseen kantajaan. Toinen ongelma ilmenee uusiutuvien infektioiden aiheuttajissa, uusiutuva tauti voi johtua uudelleen sairastumisesta (relapse) tai kokonaan uudesta infektiosta (reinfection). Myös oireettomat kantajat hankaloittavat tartuntakuvioiden selvittämistä, sillä ne saattavat jäädä kokonaan huomaamatta tai ne voidaan huomata hyvin pitkän ajan jälkeen (Didelot *et al.* 2016). Pullonkaulan ankaruus on merkittävä tekijä uuden isännän sisäiselle monimuotoisuudelle. Lisäksi infektion pituus isännässä vaikuttaa siihen, miten paljon patogeenien genomeihin ehtii kertyä muutoksia. Mitä kauemmin bakteeripopulaatio ehtii elää isännän sisällä, sitä enemmän siihen ehtii kertyä muutoksia ja siten bakteeripopulaation monimuotoisuus kasvaa. Kun luovuttajan bakteeripopulaatio on monimuotoinen, muodostuu alttiille vastaanottajallekin hyvin todennäköisesti heterogeeninen infektio (Worby *et al.* 2014).

### 3. Mutaatio- ja evoluutionopeudet

Tautia aiheuttavien bakteerien evolutiivisten ja ekologisten prosessien kokonaisvaltaisemman ymmärryksen ja taudin kehittymisen, leviämisverkostojen sekä isännän ja patogeenin välisten vuorovaikutussuhteiden arvioimiseksi on tärkeää pystyä määrittämään niiden koko genomilaajuinen evoluutionopeus luotettavasti. Sekvensointimenetelmien kehittymisen myötä saatavilla on runsaasti ja koko ajan kasvavissa määrin bakteerien koko genomilaajuista sekvenssidataa. Rinnakkaisten ja pidemmän ajan kuluessa kerätyt näytesarjat lisäävät tarkkuutta määrittämiseen (Duchène *et al.* 2016). Evoluutionopeuden määrittämisen on havaittu korreloivan negatiivisesti näytteiden keruuajan pituuden mukaan (Ho *et al.* 2011). Lyhyemmän aikaa kerätyistä näytesarjoista arvioidaan korkeampia evoluutionopeuksia, koska puhdistava valinta ei ole vielä ehtinyt karsimaan niitä lievästi haitallisia mutaatioita, jotka pidemmällä aikavälillä häviäisivät (Duchène *et al.* 2016). Myös sukupolven pituuden sekä populaatiokoon on havaittu korreloivan negatiivisesti evoluutionopeuden kanssa (Bromham 2009). Adaptiivisen evoluution on havaittu lisäävän evoluutionopeutta verrattaessa puhdistavaan valintaan (Eyre-Walker & Keightley 2007). Evoluutionopeuteen vaikuttavia tekijöitä ovat esimerkiksi taustamutaatioiden nopeus (background mutation rate), luonnonvalinnan suunta ja voimakkuus, sukupolven pituus ja populaatiokoko (Duchène *et al.* 2016).

Patogeenisten bakteerien mutaationopeudet vaihtelevat runsaasti niin yksilöiden välillä kuin saman yksilön genomien sisällä. Mutaationopeuksien erot johtuvat monista eri tekijöistä, joita ovat erilaisten valintapaineiden lisäksi adaptaatioon vaadittavien mutaatioiden lukumäärä, populaatiokoko, kilpailu muiden kantojen kanssa sekä ympäristön heterogeenisuus (Denamur & Matic 2006). Myös genomien koko aiheuttaa eroja mutaationopeuksiin (Didelot *et al.* 2016). Fenotyyppi muodostuu geenien ja ympäristön yhteisvaikutusten lopputuloksena. Kun bakteerin täytyy sopeutua uusin olosuhteisiin, voi luonnonvalinta suosia mutaattori-fenotyyppiä siitä huolimatta, että myös haitallisten mutaatioiden määrä kasvaa tällöin. Kasvanut mutaationopeus tuo nimittäin merkittävän valintaedun sopeutumiselle. Kun korkeasta mutaationopeudesta ei ole enää evolutiivista hyötyä, luonnonvalinta suosii vähemmän mutaatioita tuottavaa fenotyyppiä. Mutaattori-fenotyypit johtuvat yleensä muutoksista geeneissä, jotka koodaavat replikaatioon ja DNA:n korjaukseen liittyviä entsyymeitä ja muita proteiineja. Sekä kokeelliset että teoreettiset tutkimukset osoittavat, että luonnossa esiintyy mutaattoreita enemmän kuin mutaatio-valinta tasapainon mukaan odotettaisiin. Tämä viittaa siihen, että mutaattoreilla on todellista valintaetua sopeutumisessa (Denamur & Matic 2006).

Geneettinen ajautuminen sekä puhdistava ja hajottava valinta muokkaavat populaation monimuotoisuutta isännän sisällä. Bakteerien populaatiokoko isännän sisällä voi olla todella suuri. Suuren populaatiokoon tiedetään heikentävän geneettisen ajautumisen vaikutusta, mutta bakteerit ovat kuitenkin yleensä jakautuneet isännän elimistön eri osiin. Tämä isoituunut kolonisointi ja populaatiokoon heilahtelut korostavat geneettisen ajautumisen merkitystä isännän sisäisissä populaatioissa. Pidemmällä aikavälillä hallitseva evolutiivinen voima on puhdistava valinta, joka nähdään ei-synonyymisten ja synonyymisten korvautumisten suhteesta (dN/dS ratio) (Didelot *et al.* 2016). Vahva geneettinen ajautuminen ja vain vähän haitallisten mutaatioiden karsimiseen tarvittavan ajan puutteen takia puhdistava valinta vaikuttaa isännän sisäisissä populaatioissa vähemmän kuin muissa populaatioissa (Rocha *et al.* 2006). Hajottava valinta suosii uusia variantteja, jotka auttavat patogeenejä välttämään isännän immuunipuolustusta ja lääkkeitä (Didelot *et al.* 2016).

#### 4. Antibioottiresistenssi

Patogeenisten bakteerien aiheuttamien infektioiden hoitamisessa yleinen tapa on ollut käyttää antibiootteja. Antibioottiresistenssin yleistyminen bakteereilla on maailmanlaajuinen ongelma. Resistenssin yleistymisen myötä hoitokeinot vaikeutuvat ja jopa loppuvat, minkä seurauksena tavallisetkin taudit saattavat johtaa kuolemiin (WHO 2014). Antibiootit vaikuttavat patogeeneihin pääasiassa joko estämällä niiden kasvun tai tappamalla ne. Antibiooteilla on useita erilaisia mekanismeja, joilla ne parantavat infektiota. Ne voivat estää bakteerin soluseinän, proteiinien tai nukleinihappojen synteesiä sekä myös häiritä metabolisia reittejä

estämällä niiden tuotteiden syntyä tai vaurioittamalla soluseinää (Donkor 2013). Bakteereilla puolestaan on monia mekanismeja, joilla ne estävät antibioottien vaikutukset. Näitä adaptiivisen resistenssin mekanismeja ovat solukalvon muutokset, jotka vähentävät bakteerien läpäisevyyttä tai solukalvon ulosvirtauspumput (efflux), jotka poistavat nopeasti lääkkeitä, mutaatiot antibioottien kohteissa, jolloin kiinnittyminen estyy tai entsyymit, jotka inaktivoivat antimikrobisia aineita (Blair *et al.* 2015). Bakteerit voivat myös hankkia geenejä toisilta lajeilta horisontaalisen geeninsiirron avulla, näiden geenien tuottamat kohdeproteiinit voivat olla vähemmän alttiita antibioottien vaikutuksille (Donkor 2013). Moniresistenssi voi syntyä kahdella eri mekanismilla, bakteeri voi koota useita eri resistenssigeenejä plasmideihin tai kiihdyttää lääkkeiden poistopumppuja koodaavien geenien ekspressiota (Vandenesch *et al.* 2012).

#### 4.1. Antibioottiresistenssin evoluutio *Mycobacterium tuberculosis* -bakteerilla

*M. tuberculosis* aiheuttaa ihmisille tuberkuloosia. Bakteeri on infektoinut noin kolmasosan maailman väestöstä. Vuonna 2015 yli 10 miljoonaa ihmistä sairastui tuberkuloosiin ja heistä 1,8 miljoonaa kuoli. Moniresistentti tuberkuloosi (multidrug-resistance, MDR) määritellään bakteeriksi, jolla on resistenssi isoniatsidille tai rifampisiinille. Erittäin resistentillä (extensively drug-resistant, XDR) kannalla on edellä mainittujen lisäksi resistenssi myös fluorokinolonille ja vähintään yhdelle seuraavista lääkkeistä: kapreomysiini, kanamysiini tai amikasiini (WHO 2016). *M. tuberculosis* tunnetaan alhaisesta mutaationopeudestaan ja geneettisen rekombinaation puuttumisesta. Eldholm *et al.* (2014) tutkivat antibioottiresistenssin evoluutiota isännän sisällä ja keräsivät yhdestä potilaasta yhdeksän peräkkäisen näytteen sarjan kolmen ja puolen vuoden aikana. Altis kanta kehittyi moniresistenssiksi patogeeniksi vain yhden isännän sisällä. Geneettinen monimuotoisuus ja suuret erot isolaattien genomien välillä viittaavat useiden kloonien rinnakkaiseen evoluutioon ja niiden frekvenssien nopeisiin heilahteluihin. Tutkimuksessa sekvensoidut kloonit hankkivat resistenssin toisistaan riippumattomasti itsenäisten mutaatioiden avulla. Mutanttikantojen parempi kelpoisuus antibioottialtistuksessa johtaa niiden klonalisiin ekspansioihin muiden kantojen kustannuksella. Lopulta joku kannoista fiksoitui ja syrjäytti muut. Yksittäisten mutaatioiden lisäksi kelpoisuus parantui asteittain geeniekspression uudelleen ohjelmoinnilla (Eldholm *et al.* 2014).

Kolmen ja puolen vuoden aikana altis kanta kehitti resistenssin seitsemälle eri antibiootille. Näytesarjassa havaittiin eriasteista resistenssiä alttiista kannasta erittäin resistenssiin kantaan. Kaiken kaikkiaan havaittiin 35 muuntelevaa nukleotidipaikkaa, jotka esiintyivät ainakin yhdessä isolaatissa vähintään 25 % frekvenssillä. Kaksikymmentäviisi muuntelevista nukleotidipaikoista esiintyi vähintään 70 % frekvenssillä. Kaksikymmentä mutaatioista oli ajan myötä häviäviä ja 15 fiksoitui. Näistä mutaatioista 12 liitettiin resistenssin syntyyn. Suurin osa kaikista havaituista mutaatioista olivat joko resistenssin tarjoavia muuntelevia nukleotidipaikkoja tai niihin fyysisesti linkittyneitä neutraaleja mutaatioita (hitchiking mutations). Koska

*M. tuberculosis* -bakteerilla ei tapahdu geneettistä rekombinaatiota, taustalla matkustavien neutraalien mutaatioiden frekvenssit heilahtelevat resistenssimutaatioiden frekvenssien mukana (Eldholm *et al.* 2014).

Kaikki *M. tuberculosis* -bakteerin yleisimmät kannat sisältävä tutkimus määritti bakteerin keskimääräiseksi substituutionopeudeksi 0,5 mutaatiota per genomi per vuosi (Walker *et al.* 2013). Toisessa tutkimuksessa bakteerin keskimääräiseksi substituutionopeudeksi määritettiin 0,4 mutaatiota per genomi per vuosi (Roetzer *et al.* 2013). Sen sijaan yhden potilaan sisäiseksi nopeudeksi yhdeksän peräkkäisen näytteen mukaan määritetty keskimääräinen mutaationopeus oli seitsemän mutaatiota per genomi per vuosi (Eldholm *et al.* 2014). Kun siitä jätetään pois ajan myötä hävinneet mutaatiot, on keskimääräinen substituutionopeus 4,3 mutaatiota per genomi per vuosi. Edelleen jätettäessä pois resistenssimutaatiot keskimääräinen substituutionopeus laskee 2,3 mutaatioon per genomi per vuosi. Kun laskuissa ei huomioida ajan myötä häviäviä, resistenssi- tai taustalla matkustavia neutraaleja mutaatiota, substituutionopeudeksi määriteltiin 1,1 neutraalia mutaatiota per genomi per vuosi. Antibiootit kiihdyttävät evoluutiota luomalla valintapaineita, joiden seurauksena resistenssimutaatioihin kohdistuu positiivista valintaa. Positiivinen valinta kiihdyttää substituutionopeuksia ja oman lisänsä niihin tuo vielä resistenssimutaatioihin linkittyneet neutraalit mutaatiot (Eldholm *et al.* 2014).

Mykolihappo on *M. tuberculosis* -bakteerin ulkopinnalla esiintyvä lipidiyhdiste. Se on tärkeä osa kyseiselle bakteerille tyypillisen kestävä ja läpäisemättömän soluseinäkompleksin rakenteessa (Marrakchi *et al.* 2014). Antibiootille altistaminen aiheutti muutoksia etenkin lääkkeiden poistopumppujen ja mykolihapon synteesiin liittyvien geenien transkriptionaalisessa säätelyssä. Nämä säätelytasojen muutokset ovat oleellisia resistenssin synnyssä usean eri antibiootin kohdalla ja ne voidaan havaita selkeästi ja yhdenmukaisina peräkkäin kerätyistä näytteistä. Erittäin merkittäväksi mekanismiksi isännän sisällä syntyvään resistenssiin on osoittautunut lääkkeiden poistoon liittyvien geenien ekspression tehostaminen. RNA-sekvensoinnit paljastivat kaiken kaikkiaan 139 geenissä säätelyeroja ainakin yhdessä myöhemmässä isolaatissa verrattaessa ensimmäiseen, altista kantaa edustavaan isolaattiin. Yksikään ajan kuluessa syntyneistä mutaatioista ei ollut niiden geenien promoottoreissa tai geneeissä, joissa merkittävät erot transkriptionaalisessa säätelyssä havaittiin. Tämä osoittaa, etteivät erot geeniekspressioissa johdu suoraan mutaatioista kyseisten geenien alueilla. Antibiooteille altistumisen myötä havaitut vaimennetut geenit liittyivät kaikki sekundääristen metaboliatuotteiden biosynteesiin, kuljetuksiin tai kataboliaan (Eldholm *et al.* 2014).

Resistentillä bakteerilla vaimennetut geenit *pkx13* ja *fadD32* kuuluvat *pkx13-fadD32-accD* -operoniin, joka koodaa mykolihapon synteesin viimeisiin vaiheisiin osallistuvia entsyymejä. Sekä isoniatsidi- että etionamidi-antibiootit kohdistuvat mykolihapon synteesiin ja edellä mainittujen geenien vaimennus onkin liitetty resistenssin muodostumiseen kyseisille antibiooteille. *IniA*-geeni kuuluu *iniBAC*-operoniin, joka liittyy lääkkeiden poistopumppuihin (efflux) (Eldholm *et al.* 2014). Tämän operonin transkription tehostamisen

tiedetään liittyvän sekä isoniatsidin että etambutolin resistenssin syntyyn (Colangeli *et al.* 2005). *IniB* on *iniBAC*-operoniin liittyvä toinen geeni, myös sen säätelyssä havaittiin tehostumista antibiootille altistumisen jälkeen. *iniBAC* transkription tehostamisen lisäksi havaittiin kevyt vaimennus *sr2* transkriptiossa (Eldholm *et al.* 2014). *Sr2* on *iniBAC*-operonin ekspresion negatiivinen säätelijä (Colangeli *et al.* 2007).

Farhat *et al.* (2013) etsivät *M. tuberculosis* -bakteerin genomeista merkkejä positiivisen valinnan aiheuttamasta konvergentista evoluutiosta. Itsenäiset mutaatioiden fiksoitumiset samassa nukleotidissa tai geenissä viittaavat konvergenttiin evoluutioon. Aineisto koostui 123 sekvensoidusta *M. tuberculosis* genomista, joista 47 oli peräisin resistenteistä kannoista. Löydettiin 39 genomialuetta, joissa havaittiin merkkejä positiivisesta valinnasta. Nämä alueet liitettiin resistenssiin. Näistä 11 funktionaalinen rooli tiedetään, 16 kuuluu *PE/PPE*-geeniperheeseen ja 12 funktiot ovat tuntemattomia. Suurin osa *PE/PPE*-geeniperheen geeneistä koodaa soluseinän proteiineja, joista toiset vaikuttavat seinän rakenteeseen ja läpäisevyyteen ja toiset puolestaan ovat antigenejä (Soldini *et al.* 2011). Lisäksi osa havaituista mutaatioista liittyi DNA:n korjausmekanismeihin tai sijaitti lähellä tiedettyjä resistenssigeenejä. Mutaatiot voivat sekä tarjota suoraan resistenssiä että kompensoida resistenssistä johtuvia kelpoisuuskustannuksia (Farhat *et al.* 2013).

#### 4.2. Monikantainen infektio lisää *Helicobacter pylori*n geneettistä monimuotoisuutta

*H. pylori* on infektoinut yli puolet ihmispopulaatiosta aiheuttaen kroonista vatsatulehdusta, josta voi seurata esimerkiksi vatsahaava. *H. pylori* on tyypillisesti geneettisesti hyvin monimuotoinen. Korkea mutaationopeus ja runsas geneettisen materiaalin vaihto muiden kantojen kanssa muuntelee genomia jatkuvasti (Kennemann *et al.* 2011). Kennemann *et al.* (2011) tutkivat viiden eri potilaan *H. pylori* -kantoja. Neljällä potilaista oli krooninen monikantainen infektio ja yksi potilaista oli kokeellisesti infektoitu. Kroonisesti infektoituneiden yksilöiden näytteistä määritettiin keskimääräiseksi genomilaajuiseksi mutaationopeudeksi  $2,5 \times 10^{-5}$  mutaatiota per nukleotidi per vuosi. Mutaationopeus on 18-kertainen verrattaessa aiempaan, 78 ylläpitogeenin (house keeping) mukaan määritettyyn nopeuteen (Morelli *et al.* 2010). Rekombinaationopeus  $5,5 \times 10^{-5}$  tapausta per paikka per vuosi on jopa 122-kertainen verrattaessa ylläpitogeenistä laskettuun nopeuteen. Ylläpitogeenit ovat alttiita voimakkaalle puhdistavalle valinnalle, mikä yksinään jo vähentää niiden muuntelevuutta. Lisäksi genomilaajuinen data sisältää ei-koodaavia alueita ja hajottavan valinnan kohteina olevia geenejä. Nämä molemmat kiihdyttävät mutaationopeutta. *H. pylori*n mutaationopeudet vaihtelevat runsaasti eri potilaiden välillä. Eri kantojen ominaisuudet vaihtelevat ja useamman kannan aiheuttamissa infektioissa runsas geneettisen materiaalin vaihto sekä yksilöiden erilaiset valintapaineet saavat aikaan potilaiden välisiä eroja mutaationopeuksissa (Kennemann *et al.* 2011).

Yksittäisten mutaatioiden aiheuttamina *H. pylori*n genomissa ilmenee muuntelevia nukleotidipaikkoja (single nucleotide polymorphisms) ja lisäksi rekombinaation seurauksena saatuja DNA-fragmentteja, joissa on

useampi muunteleva nukleotidikohta (clusters of nucleotide polymorphisms). Rekombinaation avulla hankitut DNA-fragmentit eli importit (imports) selittävät yksittäisiä pistemutaatioita suuremman osan nukleotidikorvautumisista. Yksittäiset importit ovat ryhmittyneet genomissa ja merkittävä osa niistä vaikuttaa solukalvon pintaproteiineja koodaavissa *hop*-perheen geeneissä. Osa *hop*-perheen geeneistä liittyy bakteerien adheesioon. Positiivinen ja hajottava valinta suosii rekombinanttiklooneja, joilla on tapahtunut muutoksia aminohapposekvensseissä. Kokeellisesti infektoidun yksilön näytteistä ei näkynyt jälkeäkään rekombinaatiosta ja mutaatioitakin oli vain muutama. Tämä korostaa monikantaisen infektion ja rekombinaation merkitystä *H. pylori*n monimuotoisuuden synnyssä, sillä ilman monikantaista infektiota genomi on suhteellisen vakaa (Kennemann *et al.* 2011).

#### 4.3. *Burkholderia dolosa* -bakteerin paralleeli evoluutio

*B. dolosa* -bakteeri aiheuttaa kystistä fibroosia sairastavilla potilailla hengenvaarallisia kroonisia infektiota. *B. dolosa* on yhdistetty keuhkojen toiminnan heikentymiseen kiihdyttävänä tekijänä ja siten lisää kuoleman riskiä potilailla (Kalish *et al.* 2006). Lieberman *et al.* (2011) löysivät 17 kandidaattigeeniä patogeenisyydelle tutkiessaan *B. dolosa* -bakteerin paralleelia evoluutiota. Tutkittaessa saman kannan kehitystä eri yksilöissä paljastavat yhteiset ja toistuvat mutaatiot tapahtuneen paralleelin evoluution. Tutkimuksessa sekvensointiin kaiken kaikkiaan 112 isolaatin genomit. Näytteet kerättiin 16 vuoden aikana 14 yksilöstä. Mutaationopeudeksi määritettiin keskimäärin kaksi mutaatiota per vuosi ja eri yksilöiden välillä ei havaittu nopeuksissa merkittäviä eroja. Seitsemällätoista geenillä havaittiin moninkertainen määrä ei-synonyymisiä mutaatioita verrattuna siihen mitä odotettaisiin neutraalin geneettisen ajautumisen tuloksena, joten nämä geenit olivat voimakkaan positiivisen valinnan kohteina. Nämä kandidaattigeenit ovat tyypillisesti konservoituneita *Burkholderia* -suvussa, mutta luonnonvalinnan seurauksena niissä tapahtui adaptiivista evoluutiota (Lieberman *et al.* 2011).

Yleisesti kystistä fibroosia sairastavilla potilailla käytetylle lääkkeelle, siprofloksasiinille, muodostuva resistenssi yhdistettiin yhteen geeniin, *BDAG\_02180*. Kaikkien resistenssifenotyyppien genotyypit sisälsivät ei-synonyymisen mutaation, joka aiheutti muutoksia resistenssiin liittyviin aminohappoihin *T83* ja *D87*. Yksi nukleotidipaikka glykosyylitransferaasi-geenissä *BDAG\_02317* korreloi O-antigeenitoistojen kanssa. O-antigeenitoistot lipopolysakkaridissa (lipopolysaccharide, LPS) bakteerin ulkokalvolla liittyvät virulenssiin. Kaksi eri mutaatiota tässä nukleotidipaikassa vaikuttavat samaan aminohappoon ja molemmat palauttavat täysipitkän proteiinin ja assosioituvat O-antigeenitoistojen kanssa. Alkuperäisessä genotyypissä lokus koodaa stop-kodonia, jonka vuoksi O-antigeenitoistoja ei esiinny. Kaiken kaikkiaan 11 näistä 17 kandidaattigeeneistä koodaa proteiineja, joiden toiminta liittyy patogeenisyyteen. Nämä proteiinit liittyvät solukalvon synteisiin, erityiseen ja resistenssiin (Lieberman *et al.* 2011).

## 5. Vaihtelut virulenssissa

Moni patogeeninen bakteeri, kuten *Staphylococcus aureus*, *H. pylori*, *Escherichia coli* ja *H. influenzae*, elää usein kommensalismissa isäntänsä kanssa. Taudin aiheuttaminen ei ole välttämätöntä näiden patogeenien elinkierrossa ja niinpä isäntä voi olla oireeton kantaja. Toisinaan oireettomana kannettu patogeeni voi infektoida isäntänsä myöhemmin pitkänkin ajan kuluttua tartunnasta. Nämä bakteerit ovat luonnostaan geneettisesti hyvin monimuotoisia ja tyypillisesti isäntää kolonisoivat useampi kanta kerrallaan. Harvinaisissa tapauksissa nämä tavallisesti kommensalismissa elävät bakteerit voivat aiheuttaa isännälleen invasiivisia infektioita ja jopa hengenvaarallisia taudin oireita (Margolis & Levin 2007; Didelot *et al.* 2016). Mielenkiintoista on se, että harvinaisia invasiivisia infektiota aiheuttavat bakteerit ovat lähes poikkeuksetta monoklonaalisia ja lisäksi kannat vaihtelevat eri potilailla (Sandgren *et al.* 2004).

Isännän omaa alttiutta on pidetty tavanomaisimpana syynä näihin normaalisti kommensalististen bakteerien satunnaisiin ja harvinaisiin invasiivisiin infektiioihin. Immuunipuolustuksessa esiintyy pieniä aukkoja ja jossain tilanteissa se ei pysty estämään invasiivista bakteeria tunkeutumasta paikkaan, jossa se aiheuttaa isännälle sairautta. Moni eri tekijä vaikuttaa isännän alttiuteen sairastua. Fysiologiset tekijät, kuten ikä, muut infektiot, krooniset sairaudet sekä geneettiset tekijät muovaavat kaikki isännän alttiutta omalla tavallaan. Myös pelkästään isännän ja patogeenien vuorovaikutuksen stokastisuus voi mahdollistaa sen, että bakteeri läpäisee puolustusmekanismit ja kolonisoivat paikan, jossa se aiheuttaa sairautta. Isännän sisäinen evoluutio luo bakteeripopulaatiolle uudenlaisia valintapaineita. Yksilöillä, joilla on muita parempi kyky tunkeutua isännän puolustuksen läpi ja replikoitua uusissa paikoissa, voi olla valintaetua isännän sisällä (Margolis & Levin 2007).

Patogeeni voi evolutiivisena strategianaan myös heikentää virulenssiaan ihmisen sisällä sen sijaan, että lisäisi sitä. Onkin todisteita juuri siitä, että patogeenin evoluutio isännän sisällä johtaa virulenssin heikkenemiseen. Adaptiivisen trade-off hypoteesin mukaan isännän ja patogeenin koevoluutio voi johtaa heikentyneeseen virulenssiin ja vähemmän ankaraan tautiin. Trade-off hypoteesin mukaan pitkän ajan evolutiivinen menestyminen pakottaa bakteerin tasapainoilemaan virulenssin voimakkuuden ja infektion keston välillä. Tasapainoilu perustuu ajatukseen, että lisääntynyt virulenssi vähentää infektion pituutta. Se, onko tauti syy vai seuraus bakteerin evoluutiosta isännän sisällä, on edelleen selvittämättä (Didelot *et al.* 2016).

Redusoiva evoluutio (reductive evolution) on tavanomaista kroonista infektiota aiheuttaville patogeeneille (Price *et al.* 2013). Tämä tarkoittaa genomien puhdistamista niistä geeneistä, jotka ovat tarpeettomia ja epäolennaisia patogeenin elämään isännän sisällä (Wixon 2001). Nämä geenit liittyvät sekundaarimetaboliaan, isännän ulkopuolisessa ympäristössä selviytymiseen ja patogeenisiin (Holden *et al.* 2004). Bakteerin ei myöskään kannata valmistaa isännän kanssa analogisia geenituotteita, vaan se voi säästää kustannuksissa ja hyödyntää isännältä saatavia valmiita tuotteita (Wixon 2001). Toistuvat konvergentista evoluutiosta kertovat muutokset bakteerien genomeissa niiden siirtyessä akuuttia tautia aiheuttavasta

patogeenistä tai isännän ulkopuolisessa ympäristössä pärjäävästä organismista pitkäaikaista kroonista infektiota aiheuttavaan muotoon paljastavat tyypilliset ja oleelliset piirteet patogeenin pitkän tähtäimen adaptaatiosta isäntään. Näitä piirteitä ovat virulenssin heikentyminen, lisääntynyt resistenssi antimikrobisia aineita vastaan ja runsaat muutokset metaboliassa (Price *et al.* 2013).

#### 5.1. Kommensalistisen *Haemophilus influenzae* -bakteerin aiheuttama invasiivinen infektio

Margolis & Lewin (2007) suorittivat kokeellisen tutkimuksen selvittääkseen isännän sisällä tapahtuvan evoluution merkityksen kommensalististen bakteerien aiheuttamissa harvinaisissa invasiivisissa infektioissa. Kokeessa rottiin istutettiin nasaalisesti kahta erilaista ja merkittyä *H. influenzae* -bakteerin kantaa ja seurattiin bakteremian muodostumista. Kokeellisen tutkimuksen tulokset osoittivat bakteremian aiheutuvan lähes poikkeuksetta vain yhdestä organismista. Kolonisoiva bakteeri voi hyödyntää isännän puolustuksessa olevia satunnaisia aukkoja tai invasiivisen mutaation muodostuminen ja yleistyminen kolonisoivassa populaatioissa ovat mahdollisia harvinaisia tapahtumia bakteeripopulaatioissa, mistä seuraa isännälle sairauksia.

Koetulokset vahvistavat isännän sisällä tapahtuvan evoluution merkityksen kommensalististen bakteerien aiheuttamissa harvinaisissa ja monoklonalisissa infektioissa. Isännän sisäinen evoluutiokaan ei kuitenkaan selitä kaikkia tapauksia. Ainoastaan yhdessä tutkituista isolaateista havaittiin muita voimakkaampi taipumus invasiivisuuteen. Loput isolaateista puolestaan eivät osoittaneet minkäänlaisia merkkejä voimakkaammasta invasiivisuudesta. Se, ettei invasiivisuus ollut normaalia suurempaa suurimassa osassa isolaateista, viittaa muiden stokastisten tekijöiden kuin yksittäisen mutaation olevan merkittäviä harvinaisten ja monoklonaalisten tautien synnyssä. Tulkittaessa kokeen tuloksia ei suljettu pois isännän oman alttiuden ja immuunipuolustuksen aukkojen merkitystä selittävänä tekijänä näille satunnaisille vakaville infektioille. Selvää on kuitenkin se, ettei isännän alttius selitä infektioiden monoklonalisuutta (Margolis & Levin 2007).

#### 5.2. Patogeenisen *Burkholderia pseudomallei* -bakteerin aiheuttama krooninen infektio

*B. pseudomallei* on patogeeni, josta on luultu, ettei se esiinny koskaan kommensalismissa ihmisen kanssa. Sen tartunnan on luultu aiheuttavan aina vakavaa infektiota ja vaativan välitöntä hoitoa. Tämä hengenvaarallinen patogeeni aiheuttaa melioidoosia, jonka oireita ovat mm. keuhkokuume ja septinen shokki (Price *et al.* 2013). Mikäli tautia ei havaita ja hoitoa aloiteta ajoissa kasvaa kuolleisuusaste jopa 90 % niillä, joilla tauti pääsee aiheuttamaan septistä shokkia (Wiersinga *et al.* 2012). Kaksikymmentäkolme vuotta kestäneen tutkimuksen aikana 707 *B. pseudomallei* -bakteerin infektioista selvinneestä potilaasta yhdelle kehittyi krooninen infektio ja potilaasta tuli oireeton kantaja. Kyseiseltä potilaalta sekvensointiin 11,5 vuoden välein eristettyjen isolaattien genomit. *B. pseudomallei* -bakteerin genomissa havaittiin signaaleja voimakkaasta positiivisesta valinnasta ja sen myötä tapahtuneista merkittävistä muutoksista sen adaptoituessa isäntään ja siirtyessä kroonista infektiota aiheuttavaan muotoon (Price *et al.* 2013).

Yhdessätoista ja puolessa vuodessa patogeenin genomiin kertyi 23 pistemutaatiota, joista suurin osa oli ei-synonyymisiä. Ylimäärä ei-synonyymisiä mutaatioita viittaa positiiviseen valintaan. Nonsense-mutaatio sigmatekijää *RpoS* koodaavassa geenissä *D512\_11298* aiheuttaa polypeptidiketjun ennen aikaisen katkeamisen ja siten toimimattoman proteiinin. Tämän universaalista stressivasteesta vastaavan proteiinin inaktivoitumisella on pleiotropiset seuraukset. Sigmatekijöillä on tärkeä rooli transkription säätelijänä vasteena ympäristön signaaleihin. Tämä yksi pistemutaatio aiheuttaa monia muutoksia bakteerin metaboliassa. *RpoS*-sigmatekijän menettäminen voi aiheuttaa bakteerille haittaa sen altistuessa erilaisille ympäristötekijöille, mutta se voi tuoda myös valintaetua bakteerille isännän sisällä sen metabolisten kustannusten vähentyessä. Monen ei-synonyymisen pistemutaation kohdegeenin funktio *B. pseudomallei* -bakteerilla on edelleen epäselvä. Niiden epäillään olevan turhia kroonisessa infektiossa ja niiden menettämisestä voi olla hyötyä. Ne voivat aiheuttaa voimakasta immuunivastetta tai evolutiiviset kustannukset saattavat olla niin suuret, että valinta suosii niiden inaktivoitua (Price *et al.* 2013).

Myöhemmässä isolaatissa havaittiin myös neljä iso deletiota kromosomissa kaksi. Nämä deletiot johtivat 221 geenin menetykseen ja genomien koon merkittävään pienenemiseen. Poistetut geenit liittyivät sekundaarimetaboliaan, ympäristöolosuhteisiin ja patogeenisiin (Price *et al.* 2013). Lisäksi havaittiin 14 indeliä, joista 11 esiintyi koodaavalla alueella ja yhdeksän johti haitallisiin lukukehyksen muuttaviin (frameshift) mutaatioihin, joista seuraa peptidiketjujen pituuksien muuttuminen. Koodavilla alueilla esiintyvä runsas indeli määrä viittaa positiiviseen valintaan. Neljä indeliä vaikutti lipopolysakkaridien (LPS) biosynteesiin ja muokkaukseen (Price *et al.* 2013). LPS on olennainen osa gram-negatiivisten bakteerien ulkokalvoa ja *B. pseudomallei* -bakteerilla se tiedetään tärkeäksi virulenssitekijäksi. LPS tarjoaa resistenssiä ihmisen seerumissa olevia bakterisidisia tekijöitä vastaan (Deshazer *et al.* 1998) ja on olennainen tekijä akuutin infektion synnyssä (Arjcharoen *et al.* 2007). Siitä huolimatta, että LPS on tärkeä virulenssitekijä, sen immunogeenisyys (O-antigeenit) on haitallinen bakteerille pidemmällä aikavälillä, sillä pitkään altistuessaan isäntä voi immunisoitua ja alkaa tuottaa vasta-aineita (Price *et al.* 2013). *Pseudomonas aeruginosa* -bakteerilla O-antigeenien biosynteesin loppuminen on tyypillinen piirre kroonisissa infektioiden (Smith *et al.* 2006) ja siten se saattaa olla myös tärkeä strategia *B. pseudomallei* -bakteerille välttää isännän immuunipuolustus (Price *et al.* 2013).

Jo ensimmäisen isolaatin genomissa havaittiin lukukehyksen muuttavan mutaation aiheuttava indeli *wcbR:ssä*, joka on tärkeä virulenssitekijä ja osa kapselin polysakkaridi-1 -operonin (*capsular polysaccharide 1 cluster, CPS-1*). Tämä mutaatio esiintyi myös myöhemmässä isolaatissa. Toimiva *CPS-1* suojaaa patogeenejä joutumasta isännän immuunipuolustuksen kohteeksi ja solusyödyksi. *In vitro* kokeissa vaimennettu *wcbR* on vähentänyt *CPS-1*:n tuottoa ja ekspressiota. Koska indeli *wcbR:ssä* havaittiin jo ensimmäisessä isolaatissa, on se täytynyt syntyä jo ennen ensimmäistä näytteen keruuta. Sama indeli havaittiin 11,5 vuoden jälkeen kerätyssä isolaatissa ja säilymisen vuoksi sillä näyttäisi olleen valintaetua. *CPS-1* -mutaatio on siis aiheuttanut

virulenssin heikentymistä infektion alussa ja on merkittävä tekijä kroonisen infektion synnyssä (Price *et al.* 2013).

Näiden kahden isolaatin genomien vertailu paljasti voimakkaita signaaleja patogeenin adaptaatiosta isäntään. Tähän liittyy virulenssin heikentyminen ja immunogeenien inaktivointi. Ilmiö on havaittu myös muiden patogeenien aiheuttamissa kroonisissa infektioissa. Useita aminohappoihin liittyviä metaboliareittejä koodaavia geenejä havaittiin poistettavan bakteerista. Isäntä valmistaa analogisia tuotteita, joita bakteeri voi hyödyntää *in vivo* tai sitten reitit ovat tarpeettomia isännän sisällä (Price *et al.* 2013). *B. pseudomallei* on karistanut geenejä, jotka liittyvät lipoproteiinikapselin biosynteesiin ja muokkaukseen, kemotaksiaan, liikkuvuuteen, quorum sensing -ilmiöön, rasvahappojen biosynteesiin, DNA-metylaatioon, tiamiinin synteesiin, antibioottiresistenssiin ja virulenssitekijöiden biosynteesiin. Geenien menettäminen tuo valintaetua, koska kustannukset vähenevät ja bakteeri voi käyttää energiansa muihin oleellisiin toimintoihin, kuten replikaatioon, transkriptioon ja translaatioon (Andersson & Kurland 1998).

### 5.3. *H. pylori* -bakteerin koevoluutio isännän kanssa vähentää sen virulenssia

*H. pylori* kolonisoi noin puolta maailman väestöstä. Se on yleisin syy mahasyövälle ja aiheuttaa toiseksi eniten syöpäkuolemia ympäri maailman. Bakteerin esiintymistiheys ei kuitenkaan korreloi syövän yleisyyden kanssa ja suuri osa infektioista saakin vain lieviä oireita (Kodaman *et al.* 2014). Selvittääkseen ihmisen ja *H. pylori* koevoluution vaikutuksia tautien kehityskaareen ja ilmentymisriskiin tutkivat Kodaman *et al.* (2014) vatsaan liittyvien sairauksien ankaruuden assosiaatioita isännän ja patogeenin genomipareihin, joita oli kaikkiaan 233. Näytteitä kerättiin potilailta kahdelta eri maantieteelliseltä alueelta. *H. pylori* -infektiot näillä alueilla olivat yhtä yleisiä, mutta patogeenin aiheuttaman mahasyövän esiintymistiheydet erosivat merkittävästi.

Kaikkien *H. pylori* isolaattien genomeissa havaittiin merkkejä alkuperältään useista eri kannoista. Pienemmän riskin alueella vallitsi alkuperältään afrikkalainen *H. pylori* -kanta ja korkeamman riskin alueella puolestaan vallitsi alkuperältään eurooppalainen kanta. Myös potilaat jakautuivat etnisen taustansa mukaan maantieteellisesti eri paikkoihin, toisella paikalla esiintyi afrikkalaisia ja toisessa Amerikan intiaaneja (Kodaman *et al.* 2014). Sekä ihmisten että patogeenien alkuperä oli merkittävä tekijä niiden välisissä vuorovaikutuksissa ja nämä vuorovaikutukset selittävät sairastavuuden yleisyyttä eri alueilla. Alkuperältään afrikkalainen *H. pylori* -kanta ei aiheuta afrikkalaiselle ihmisille suurta tulehdusvastetta, sen sijaan Amerikan intiaaneilla se sai aikaan suuremman vasteen ja aiheutti monia vakavia sairauksia. Havainnot viittaavat ihmisen ja patogeenin koevoluution muokkaavan patogeenia vähemmän virulentiksi. Kun patogeeni infektoi etniseltä taustaltaan sille tyypillisen isännän, se ei välttämättä aiheuta laisinkaan tautia. Koevoluutio onkin merkittävä tekijä sairastumisen riskin alentamiseksi. Krooniset patogeenit muuttuvat tyypillisesti vähemmän virulenteiksi ajan kuluessa koevoluution johdosta (Kodaman *et al.* 2014). Ihmisen ja *H. pylori* koevoluutio

Afrikassa on johtanut patogeenin virulenssin heikkenemiseen ja tämän seurauksena huolimatta *H. pylori* aiheuttamien infektioiden yleisyydestä Afrikassa, siellä ei esiinny runsaasti patogeenin aiheuttamia vakavia tauteja (Campbell *et al.* 2001).

*H. pylori* on levinnyt ja kehittynyt yhdessä Afrikan ulkopuolelle vaeltavien ihmisten kanssa. Ihmiset ja siten myös *H. pylori* levisivät maantieteellisesti eri alueille ja näillä alueilla tapahtui patogeenin ja isännän välistä koevoluutiota, mistä seurasi erilaistumista eri alueiden populaatioiden välille (Moodley *et al.* 2012). Sekä evoluutioteoria että empiiriset kokeet todistavat, että vertikaalisesti tai familiaalisesti tarttuvat krooniset patogeenit, kuten *H. pylori*, muuttuvat vähemmän virulenteiksi ajan kuluessa (Agnew & Koella 1997; Bull *et al.* 1991; Messenger *et al.* 1999). Näiden patogeenien pitkän ajan selviytyminen on kiinni isännän selviytymisestä ja siksi virulenssin voimakkuuden optimi on alhainen (Agnew & Koella 1997). Monikantaiset infektiot voivat johtaa kantojen väliseen geneettisen materiaalin vaihtoon. Horisontaalisen geeninsiirron seurauksena segmentit vaihtuvat, mikä hankaloittaa isännän ja patogeenin koadaptaatiota ja valintaa kohti heikompa virulenssia. Patogeeni ja isäntä eivät ole välttämättä koadaptoituneet alueilla, joilla esiintyy ihmisiä monista eri paikoista ja tämän seurauksena taudin oireet voivat ilmetä vakavampina (Kodaman *et al.* 2014).

## 6. Yhteenveto

Patogeenisten bakteerien evoluutiosta ihmisten sisällä on saatu runsaasti uutta tutkimustietoa koko genomien sekvensoinnin yleistymisen ja sen tuomien uusien mahdollisuuksien myötä. Isännän sisällä tapahtuvista evolutiivisista prosesseista on paljastunut niin odotettuja kuin ennalta arvaamattomiakin kuvioita. Geneettinen ajautuminen sekä puhdistava ja hajottava valinta muokkaavat populaation monimuotoisuutta isännän sisällä. Bakteerien populaatiokoko isännän sisällä voi olla todella suuri, minkä tiedetään heikentävän geneettisen ajautumisen vaikutusta. Bakteerit ovat kuitenkin yleensä jakautuneet isännän elimistön eri osiin. Tämä isoiloitunut kolonisointi ja populaatiokoon heilahtelut korostavat geneettisen ajautumisen merkitystä isännän sisäisissä populaatioissa. Puhdistava valinta vaikuttaa isännän sisäisissä populaatioissa vähemmän kuin muissa populaatioissa vahvan geneettisen ajautumisen ja vain vähän haitallisten mutaatioiden karsimiseen tarvittavan ajan puutteen takia.

Patogeenien ja isännän väliset jatkuvat konfliktit johtavat evolutiiviseen kilpavarusteluun ja kiihtyneeseen evoluutioon. Adaptiivinen evoluutio lisää evoluutionopeutta verrattaessa neutraaliin evoluutioon. Patogeeniset bakteerit eivät kuitenkaan aina aiheuta isännälleen tautia. Ne voivat evolutiivisena strategianaan myös vähentää virulenssia isännän sisällä. Ihmisen ja patogeenin koevoluutio on merkittävä tekijä bakteerin virulenssin vähenemiseksi. Hyvin usein isännän sisäiset bakteeripopulaatiot ovat heterogeenisiä. Etenkin pitkissä kroonisissa infektioiden polymorfismi on yleistä. Redusoiva evoluutio on

myös tavanomaista kroonista infektiota aiheuttaville patogeeneille. Tällöin genomi puhdistetaan niistä geeneistä, jotka ovat tarpeettomia ja epäolennaisia patogeenin elämään isännän sisällä. Lisäksi virulenssin heikentyminen on tyypillistä kroonista infektiota aiheuttavalle bakteerille. Sekvensoimalla useampi näyte samasta isännästä saadaan tietoa bakteeripopulaation geneettisestä monimuotoisuudesta. Vertailtaessa eri isännistä kerättyjen näytteiden DNA-sekvenssejä voidaan päätellä tartuntareittejä.

Patogeenisilla bakteereilla yleistynyt antibioottiresistenssi on maailmanlaajuinen ongelma. Uusien toimivien hoitokeinojen kehittäminen on välttämätöntä potilaiden onnistuneen hoidon saavuttamiseksi ja tartuntatautien leviämisten estämiseksi ja kontrolloimiseksi. Toimivien hoitokeinojen kehittämiseksi täytyy näiden bakteerien toimintamekanismeja ymmärtää yhä syvällisemmin. Kehittyneiden DNA:n sekvensointimenetelmien mahdollistamien tekniikoiden ja menetelmien ansiosta saadaan entistä tarkempaa ja yksityiskohtaisempaa tietoa patogeenien toiminnasta molekyylitasolla. Näitä tietoja voidaan soveltaa muun muassa uusia lääkkeitä ja hoitokeinoja suunniteltaessa. Lääkkeiden vaikutuksia voidaan kohdistaa aiempaa tarkemmin esimerkiksi tiettyihin molekyyleihin. Patogeenin ja isännän välillä tapahtuvan jatkuvan evolutiivisen kilpavarustelun vuoksi myös hoitokeinojen on kehityttävä alati. Tässä lieneekin tulevaisuuden suurin haaste. Avoimeksi kysymykseksi jää edelleen se, onko tauti syy vai seuraus bakteerin evoluutiosta isännän sisällä.

## 7. Lähteet

Agnew P, Koella JC (1997) Virulence, Parasite Mode of Transmission, and Host Fluctuating Asymmetry. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, **264**, 9-15.

Andersson SG, Kurland CG (1998) Reductive Evolution of Resident Genomes. *Trends in Microbiology*, **6**, 263-268.

Arjcharoen S, Wikraiphat C, Pudla M, *et al* (2007) Fate of a *Burkholderia pseudomallei* Lipopolysaccharide Mutant in the Mouse Macrophage Cell Line RAW 264.7: Possible Role for the O-Antigenic Polysaccharide Moiety of Lipopolysaccharide in Internalization and Intracellular Survival. *Infection and Immunity*, **75**, 4298-4304.

Balloux F (2010) Demographic Influences on Bacterial Population Structure. In: *Bacterial Population Genetics in Infectious Disease* (ed. D A Robinson, D Falush and E J Feil) pp. 103-120 John Wiley & Sons, Inc., NJ, USA.

Biek R, Pybus OG, Lloyd-Smith JO, Didelot X (2015) Measurably Evolving Pathogens in the Genomic Era. *Trends in Ecology & Evolution*, **30**, 306-313.

Blair JM, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJ (2015) Molecular Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Nature Reviews Microbiology*, **13**, 42-51.

Bliven KA, Maurelli AT (2016) Evolution of Bacterial Pathogens within the Human Host. *Microbiology Spectrum*, **4**.

- Bromham L (2009) Why Do Species Vary in Their Rate of Molecular Evolution? *Biology Letters*, **5**, 401-404.
- Brown RP, Yang Z (2011) Rate Variation and Estimation of Divergence Times Using Strict and Relaxed Clocks. *BMC Evolutionary Biology*, **11**, 271.
- Bull JJ, Molineux IJ, Rice WR (1991) Selection of Benevolence in a Host-Parasite System. *Evolution*, **45**, 875-882.
- Campbell DI, Warren BF, Thomas JE, Figura N, Telford JL, Sullivan PB (2001) The African Enigma: Low Prevalence of Gastric Atrophy, High Prevalence of Chronic Inflammation in West African Adults and Children. *Helicobacter*, **6**, 263-267.
- Casjens S (1998) The Diverse and Dynamic Structure of Bacterial Genomes, *Annual Review of Genetics*, **32**, 339-377.
- Colangeli R, Helb D, Sridharan S, *et al* (2005) The *Mycobacterium tuberculosis* *IniA* Gene is Essential for Activity of an Efflux Pump that Confers Drug Tolerance to Both Isoniazid and Ethambutol. *Molecular Microbiology*, **55**, 1829-1840.
- Colangeli R, Helb D, Vilchèze C, *et al* (2007) Transcriptional Regulation of Multi-Drug Tolerance and Antibiotic-Induced Responses by the Histone-Like Protein *Lsr2* in *M. tuberculosis*. *PLoS Pathogens*, **3**, e87.
- Croucher NJ, Page AJ, Connor TR, *et al* (2015) Rapid Phylogenetic Analysis of Large Samples of Recombinant Bacterial Whole Genome Sequences Using Gubbins. *Nucleic Acids Research*, **43**, e15.
- Dawkins R, Krebs JR (1979) Arms Races between and within Species. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, **205**, 489-511.
- Denamur E, Matic I (2006) Evolution of Mutation Rates in Bacteria. *Molecular Microbiology*, **60**, 820-827.
- Deshazer D, Brett PJ, Woods DE (1998) The Type II O-Antigenic Polysaccharide Moiety of *Burkholderia pseudomallei* Lipopolysaccharide is Required for Serum Resistance and Virulence. *Molecular Microbiology*, **30**, 1081-1100.
- Didelot X, Nell S, Yang I, Woltemate S, Van der Merwe S, Suerbaum S (2013) Genomic Evolution and Transmission of *Helicobacter pylori* in Two South African Families. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **110**, 13880-13885.
- Didelot X, Walker AS, Peto TE, Crook DW, Wilson DJ (2016) Within-Host Evolution of Bacterial Pathogens. *Nature Reviews Microbiology*, **14**, 150-162.
- Didelot X, Wilson DJ (2015) ClonalFrameML: Efficient Inference of Recombination in Whole Bacterial Genomes. *PLoS Computational Biology*, **11**, e1004041.
- Donkor ES (2013) Sequencing of Bacterial Genomes: Principles and Insights into Pathogenesis and Development of Antibiotics. *Genes*, **4**, 556-572.
- Drummond AJ, Rambaut A (2007) BEAST: Bayesian Evolutionary Analysis by Sampling Trees. *BMC Evolutionary Biology*, **7**, 214-221.

- Duchêne S, Holt KE, Weill FX, *et al* (2016) Genome-Scale Rates of Evolutionary Change in Bacteria. *Microbial Genomics*, **2**.
- Eldholm V, Norheim G, von der Lippe B, *et al* (2014) Evolution of Extensively Drug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* from a Susceptible Ancestor in a Single Patient. *Genome Biology*, **15**, 490.
- Eyre-Walker A, Keightley PD (2007) The Distribution of Fitness Effects of New Mutations. *Nature Reviews Genetics*, **8**, 610-618.
- Farhat MR, Shapiro BJ, Kieser KJ, *et al* (2013) Genomic Analysis Identifies Targets of Convergent Positive Selection in Drug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature Genetics*, **45**, 1183-1189.
- Fleischmann RD, Adams MD, White O, *et al* (1995) Whole-Genome Random Sequencing and Assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science*, **269**, 496-512.
- Fogle CA, Nagle JL, Desai MM (2008) Clonal Interference, Multiple Mutations and Adaptation in Large Asexual Populations. *Genetics*, **180**, 2163-2173.
- Ho SY (2014) The Changing Face of the Molecular Evolutionary Clock. *Trends in Ecology & Evolution*, **29**, 496-503.
- Ho SY, Duchêne S (2014) Molecular-Clock Methods for Estimating Evolutionary Rates and Timescales. *Molecular Ecology*, **23**, 5947-5965.
- Ho SY, Lanfear R, Bromham L, *et al* (2011) Time-Dependent Rates of Molecular Evolution. *Molecular Ecology*, **20**, 3087-3101.
- Holden MT, Titball RW, Peacock SJ, *et al* (2004) Genomic Plasticity of the Causative Agent of Melioidosis, *Burkholderia pseudomallei*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**, 14240-14245.
- Jombart T, Eggo RM, Dodd PJ, Balloux F (2011) Reconstructing Disease Outbreaks from Genetic Data: a Graph Approach. *Heredity*, **106**, 383-390.
- Juhas M, van der Meer, Jan Roelof, *et al* (2009) Genomic Islands: Tools of Bacterial Horizontal Gene Transfer and Evolution. *FEMS Microbiology Reviews*, **33**, 376-393.
- Kalish LA, Waltz DA, Dovey M, *et al* (2006) Impact of *Burkholderia dolosa* on Lung Function and Survival in Cystic Fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, **173**, 421-425.
- Kennemann L, Didelot X, Aebischer T, *et al* (2011) *Helicobacter pylori* Genome Evolution during Human Infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **108**, 5033-5038.
- Klug WS, Cummings MR, Spencer CA, Palladino MA (2016) *Concepts of Genetics*, 11th edn. Pearson.
- Kodaman N, Pazos A, Schneider BG, *et al* (2014) Human and *Helicobacter pylori* Coevolution Shapes the Risk of Gastric Disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **111**, 1455-1460.
- Krawiec S, Riley M (1990) Organization of the Bacterial Chromosome. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **54**, 502-539.

- Lieberman TD, Flett KB, Yelin I, *et al* (2014) Genetic Variation of a Bacterial Pathogen within Individuals with Cystic Fibrosis Provides a Record of Selective Pressures. *Nature Genetics*, **46**, 82-87.
- Lieberman TD, Michel JB, Aingaran M, *et al* (2011) Parallel Bacterial Evolution within Multiple Patients Identifies Candidate Pathogenicity Genes. *Nature Genetics*, **43**, 1275-1280.
- Margolis E, Levin BR (2007) Within-Host Evolution for the Invasiveness of Commensal Bacteria: an Experimental Study of Bacteremias Resulting from *Haemophilus influenzae* Nasal Carriage. *The Journal of Infectious Diseases*, **196**, 1068-1075.
- Marrakchi H, Lan  elle M-A, Daff   M (2014) Mycolic Acids: Structures, Biosynthesis, and Beyond. *Chemistry & Biology*, **21**, 67-85.
- Messenger SL, Molineux IJ, Bull JJ (1999) Virulence Evolution in a Virus Obeys a Trade Off. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, **266**, 397-404.
- Moodley Y, Linz B, Bond RP, *et al* (2012) Age of the Association between *Helicobacter pylori* and Man. *PLoS Pathogens*, **8**, e1002693.
- Morelli G, Didelot X, Kusecek B, *et al* (2010) Microevolution of *Helicobacter pylori* during Prolonged Infection of Single Hosts and within Families. *PLoS Genetics*, **6**, e1001036.
- Morelli MJ, Th  baud G, Chad  uf J, King DP, Haydon DT, Soubeyrand S (2012) A Bayesian Inference Framework to Reconstruct Transmission Trees Using Epidemiological and Genetic Data. *PLoS Computational Biology*, **8**, e1002768.
- Price EP, Sarovich DS, Mayo M, *et al* (2013) Within-Host Evolution of *Burkholderia pseudomallei* over a Twelve-Year Chronic Carriage Infection. *MBio*, **4**, e00388-13.
- Robinson K, Fyson N, Cohen T, Fraser C, Colijn C (2013) How the Dynamics and Structure of Sexual Contact Networks Shape Pathogen Phylogenies. *PLoS Computational Biology*, **9**, e1003105.
- Rocha EP, Smith JM, Hurst LD, *et al* (2006) Comparisons of dN/dS are Time Dependent for Closely Related Bacterial Genomes. *Journal of Theoretical Biology*, **239**, 226-235.
- Roetzer A, Diel R, Kohl TA, *et al* (2013) Whole Genome Sequencing Versus Traditional Genotyping for Investigation of a *Mycobacterium tuberculosis* Outbreak: a Longitudinal Molecular Epidemiological Study. *PLoS Medicine*, **10**, e1001387.
- Sandgren A, Sj  str  m K, Liljequist BO, *et al* (2004) Effect of Clonal and Serotype-Specific Properties on the Invasive Capacity of *Streptococcus pneumoniae*. *The Journal of Infectious Diseases*, **189**, 785-796.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **74**, 5463-5467.
- Smith EE, Buckley DG, Wu Z, *et al* (2006) Genetic Adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the Airways of Cystic Fibrosis Patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 8487-8492.
- Soldini S, Palucci I, Zumbo A, *et al* (2011) *PPE\_MPTR* Genes are Differentially Expressed by *Mycobacterium tuberculosis in vivo*. *Tuberculosis*, **91**, 563-568.

Vandenesch F, Lina G, Henry T (2012) *Staphylococcus aureus* Hemolysins, Bi-Component Leukocidins, and Cytolytic Peptides: a Redundant Arsenal of Membrane-Damaging Virulence Factors? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, **2**, 12.

Walker TM, Ip CL, Harrell RH, *et al* (2013) Whole-Genome Sequencing to Delineate *Mycobacterium tuberculosis* Outbreaks: a Retrospective Observational Study. *The Lancet Infectious Diseases*, **13**, 137-146.

Weinstock GM (2000) Genomics and Bacterial Pathogenesis. *Emerging Infectious Diseases*, **6**, 496-504.

Welch JJ, Bromham L (2005) Molecular Dating When Rates Vary. *Trends in Ecology & Evolution*, **20**, 320-327.

Wiersinga WJ, Currie BJ, Peacock SJ (2012) Melioidosis. *The New England Journal of Medicine*, **367**, 1035-1044.

Williams GC (1957) Pleiotropy, Natural Selection, and the Evolution of Senescence. *Evolution*, **11**, 398-411.

Wilson J, Schurr M, LeBlanc C, Ramamurthy R, Buchanan K, Nickerson C (2002) Mechanisms of Bacterial Pathogenicity. *Postgraduate Medical Journal*, **78**, 216-224.

Wixon J (2001) Featured Organism: Reductive Evolution in Bacteria: *Buchnera sp.*, *Rickettsia prowazekii* and *Mycobacterium leprae*. *Comparative and Functional Genomics*, **2**, 44-48.

Woolhouse ME, Webster JP, Domingo E, Charlesworth B, Levin BR (2002) Biological and Biomedical Implications of the Co-Evolution of Pathogens and Their Hosts. *Nature Genetics*, **32**, 569-577.

Worby CJ, Lipsitch M, Hanage WP (2014) Within-Host Bacterial Diversity Hinders Accurate Reconstruction of Transmission Networks from Genomic Distance Data. *PLoS Computational Biology*, **10**, e1003549.

WHO: Media centre: Tuberculosis. October 2016: World Health Organization; [accessed 2017 Mar 3]. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/>.

WHO (2014) *Antimicrobial resistance: Global Report on Surveillance Summary*. Retrieved from [World Health Organization: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112647/1/WHO\\_HSE\\_PED\\_AIP\\_2014.2\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112647/1/WHO_HSE_PED_AIP_2014.2_eng.pdf)].

Ypma RJ, Bataille A, Stegeman A, Koch G, Wallinga J, van Ballegooijen WM (2012) Unravelling Transmission Trees of Infectious Diseases by Combining Genetic and Epidemiological Data. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, **279**, 444-450.

Zuckerandl E, Pauling L (1962) Molecular Disease, Evolution and Genetic Heterogeneity. In: *Horizons in Biochemistry* (ed. M Kasha and B Pullman) pp. 189-225 Academic Press, Inc., NY, USA.

