

Bakterier deler gener i kampen mod antibiotika

Evolutionen har udrustet bakterierne med et bredt arsenal af mobile resistensgener. Ny forskning tyder dog på, at der er grænser for spredningen af resistens.

Af Andreas Porse og Morten O.A. Sommer, DTU, The Novo Nordisk Foundation Center for Biosustainability

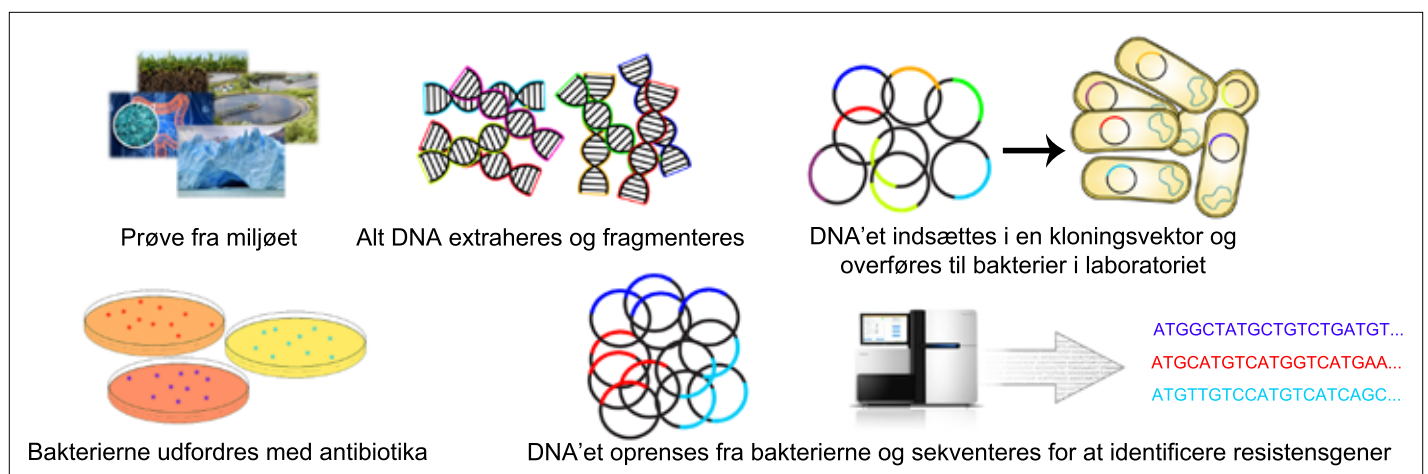
Antibiotikaresistens er et stigende problem i behandlingen af infektionssygdomme. Imens vi desperat leder efter nye antibiotika, opruster bakterierne. Selvom bakterierne er hurtige til at udvikle og dele deres resistensgrænser, er der heldigvis genetiske barrierer for, hvor meget generne kan sprede sig. En bedre forståelse af disse barrierer kan benyttes til vores fordel. Antibiotika er uden tvivl et af medicinalindustriens største bedrifter. Banale infektioner, som før var fatale, kan nu behandles nemt og billigt uden de store bivirkninger. Siden Alexander Flemmings opdagelse af penicillin i 1929, er mere end 150 forskellige antibiotika blevet introduceret, og forbruget af antibiotika er fortsat stigende [1]. Størstedelen af de antibiotika vi bruger i dag, blev udviklet i de første årtier efter Alexander Flemmings opdagelse, men introduktionen af nye antibiotika er faldet drastisk siden. Denne stilstand i opdagelsen af nye antibiotika begyndte omkring 1970, hvor mange var overbeviste om, at vi havde vundet kampen imod bakterierne. Man brugte antibiotika rundhåndet til både mennesker og dyr, fordi man på daværende tidspunkt ikke kunne forestille sig, at resistensevolution hastigt ville gøre disse stoffer virkningsløse [2].

I dag ved vi, at vores forbrug af antibiotika har bevirket en hastig berigelse af antibiotikaresistente bakterier, som truer med at bringe vores sundhedssystem tilbage til før Alexan-

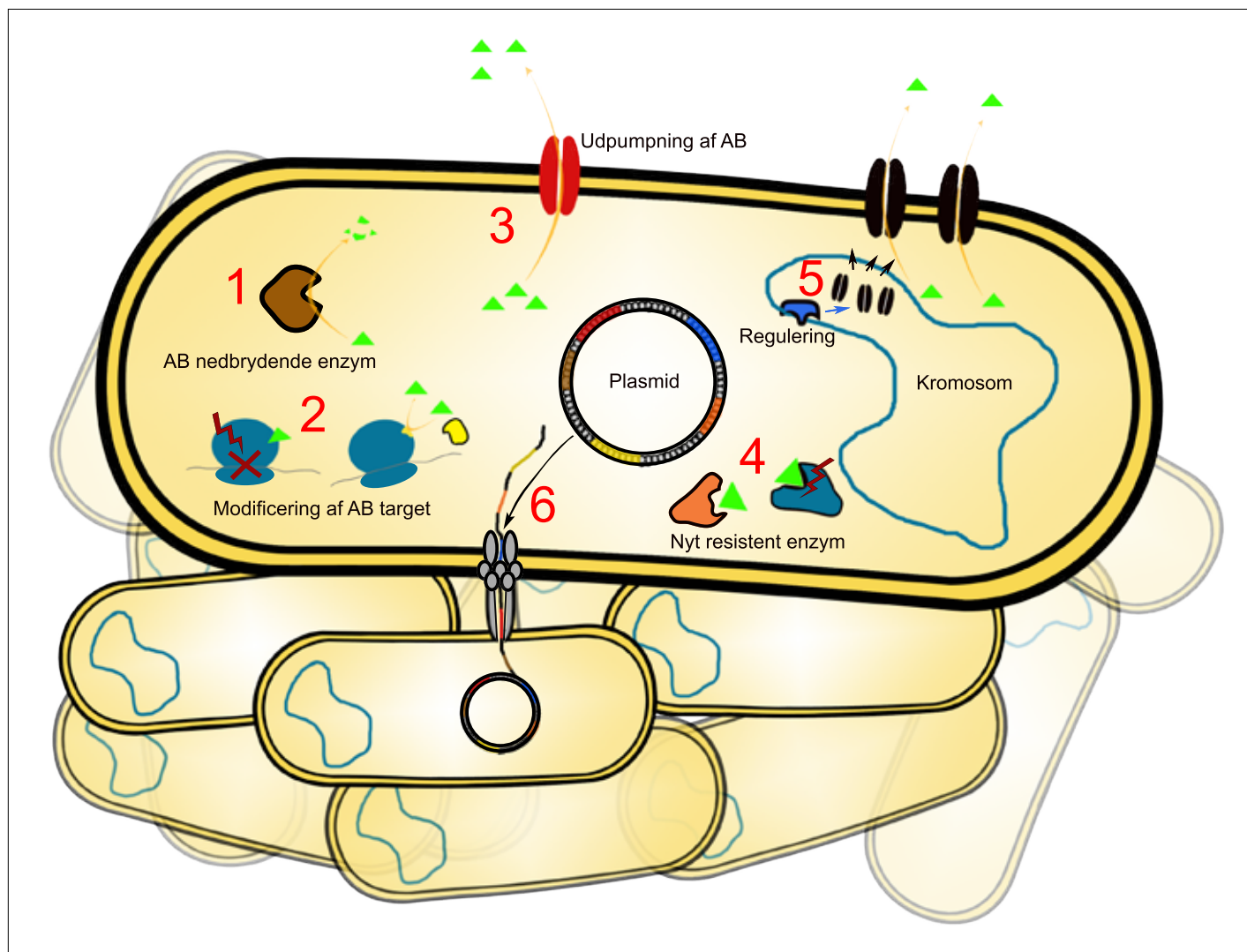
der Flemmings tid. Vi oplever et stigende antal tilfælde af infektioner forårsaget af multiresistente bakterier, hvor mulighederne for effektiv behandling er stærkt begrænsede. I en nylig rapport fra den britiske regering vurderes det, at antibiotikaresistens vil koste 10 millioner menneskeliv årligt i 2050, hvis ikke vi gør noget ved problemet. Dette er flere dødsfald end kræft og diabetes forårsager tilsammen i dag [3].

Antibiotikaresistens er oldgammelt og findes overalt

Langt de fleste antibiotika oprinder fra naturprodukter, som produceres af bakterier eller skimmelsvampe. Derfor har bakterier sandsynligvis været eksponeret til antibiotika i naturen, længe før mennesket tog det i brug til behandling af sygdomme [4]. I den tid har bakterierne opbygget et bredt arsenal af forsvarsmekanismer. Man har f.eks. fundet gener, som koder for antibiotikaresistens i 30.000 år gammel permafrost og i klippehuler, som aldrig før har været i kontakt med mennesker [4,5]. Vi og andre forskningsgrupper har ved hjælp af moderne DNA-sekventeringsteknikker, dokumenteret den rige udbredelse af resistensgener i jord, spildevand og vores egen tarmflora [6-8]. Dette sætter os i stand til at identificere resistensgener uden nødvendigvis at dyrke bakterierne i laboratoriet først. Tilmed er DNA-sekventering ved at blive så billig og lettilgængelig, at det snart vil kunne anvendes direkte af læger til at opnå hurtig viden om hyppigheden af resistensgener i for eksempel tarmflo-



Figur 1. Funktional selektion og sekventering af antibiotikaresistensgener fra miljøet. Først ekstraheres DNA fra det miljø, som ønskes undersøgt. Herefter fragmenteres DNA'et til mindre stykker, som indsættes i en kloningsvektor og overføres til bakterier i laboratoriet. Disse bakterier kan nu udfordres med forskellige antibiotika og kun dem som tilfældigvis har modtaget et resistensgen, vil overleve. På den måde kan man selekttere og efterfølgende sekventere den fraktion af den samlede mængde DNA fra et givent miljø, som potentielt kan give antibiotikaresistens i sygdomsfremkaldende bakterier.



Figur 2. Plasmider kan bære på flere forskellige resistensgener og sprede sig mellem bakterier. Den hyppigste måde, hvorpå bakterier kan opnå multiresistens, er ved at modtage et plasmid fra andre bakterier i nærheden. Denne overførsel sker igennem en proteinkanal, som plasmidet selv koder for (1). Plasmidet kan udtrykke gener, som giver bakterien resistens via forskellige mekanismer. Enzymatisk modifikation af den struktur, eksempelvis ribosomet, som antibiotikummet rammer i cellen, forhindrer stoffet i at binde og giver derved resistens (2). En af de hyppigste resistensmekanismer, som spredes af plasmider, er enzymer, som neutraliserer antibiotika ved enten at modificere eller nedbryde det (3). En anden udbredt mekanisme er aktiv udpumpning af antibiotikummet fra cellen, således at det aldrig når at binde til sit mål (4). Dette kan også opnås via regulatoriske proteiner, der f.eks. opregulerer cellens egne pumpesystemer (5). Hvis antibiotika rammer et vigtigt enzym, som bidrager til cellens metabolisme, kan plasmider også udtrykke "erstatningsgener", som varetager samme metaboliske funktion, men ikke inhiberes af antibiotikamolekylet (6).

raen hos patienter, for således at kunne individualisere antibiotikabehandlingen [9].

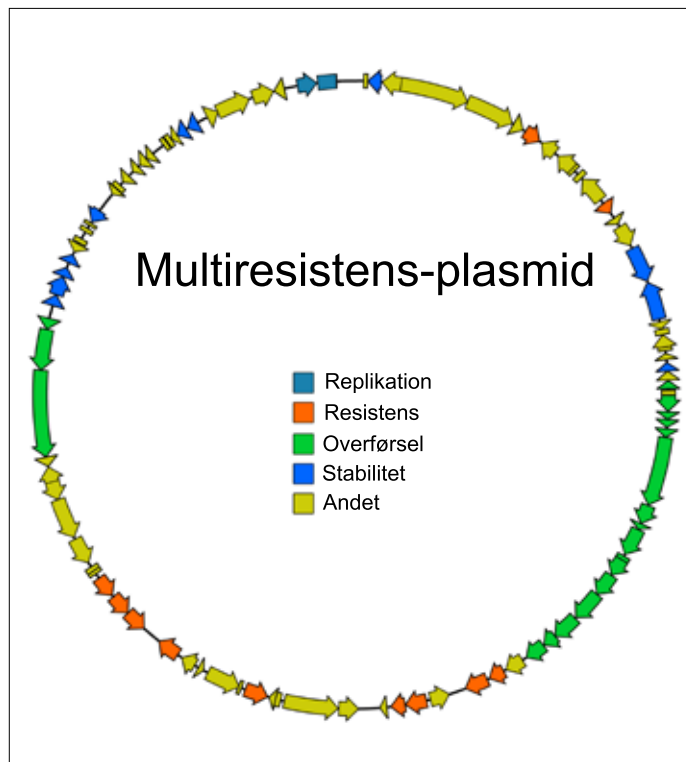
Kun en brøkdelen af resistensgener i miljøet skaber problemer hos mennesker

På trods af den store mangfoldighed af resistensgener i naturen er vores viden om miljøet, som et potentielt reservoir for resistensgener, stadig begrænset. Mange bakterier, som ikke normalt er associeret med mennesker eller hospitaler, har resistensgener, som ligner dem, vi kender fra de bakterier, der gør os syge. Heriblandt er for eksempel *Stafylokokker* (herunder MRSA), *Escherichia coli* og *Klebsiella pneumonia*. Det er dog langt fra alle resistensgener i miljøet, som skaber problemer på hospitalerne. En nyttig metode til at identificere de gener, som er i stand til at give resistens i klinisk relevante bakterier, er ved såkaldt funktionel genetisk selektion, figur 1. Her indsætter vi små bidder af DNA fra miljøet i en ny bakterie, som efterfølgende udfordres med forskellige antibiotika under kontrollerede laboratorieforhold. Disse undersøgelser har ført til opdagelsen

af talrige funktionelle resistensgener i miljøet [10]. Disse resistensgener kan overføres til sygdomsfremkaldende bakterier og gøre dem resistente, men ofte sker dette ikke. Derfor tyder det på, at der er andre barrierer end funktionalitet for spredningen og fiksering af resistensgener i de bakterier, man bekymrer sig om på hospitalerne.

Delbare DNA-molekyler er afgørende for spredningen af resistensgener

Hvordan flytter resistensgener sig fra miljøet til de bakterier, der gør os syge? Den mest udbredte mekanisme er via cirkulære DNA-molekyler kaldet plasmider - en slags delbare genetiske værktøjskasser. Plasmider eksisterer uafhængigt af bakteriens kromosom og kan ses som en slags parasitter, som typisk også bærer på gavnlige gener for bakterien; for eksempel antibiotikaresistens, figur 2. Herudover udnytter mange plasmider værtsbakteriens ressourcer til at lave en tunnel, som gør dem i stand til at sprede sig til andre bakterier i nærheden. Da plasmider kan have mange resistensgener på én gang, er de



Figur 3. Plasmid med 11 antibiotikaresistensgener. Det 73.152 basepar store multiresistensplasmid er isoleret fra en *Klebsiella pneumoniae* bakterie, fundet i en patient på Hvidovre Hospital. Udover resistensgener bærer plasmidet også på gener involveret i dets replikation, overførsel og stabilitet.

ofte skyld i multiresistens hos bakterier. For eksempel findes der plasmider hos nogle bakterier, der giver resistens over for så mange antibiotika, at bakterier med disse plasmider stort set ikke kan behandles længere [11]

Vi har arbejdet med et plasmid, der bærer på 11 forskellige resistensgener, figur 3, og som er i stand til at overføre sig til mange forskellige arter af sygdomsfremkaldende bakterier [11]. Her opdagede vi, at bakterier kan reagere vidt forskelligt på at modtage et nyt plasmid. Nogle bakterier bliver så hårdt belastede af det fremmede DNA, at de hurtigt smider det væk igen og derved også mister fordelene ved plasmidets resistensgener. En sådan tendens virker umiddelbart lovende, men desværre så vi også, at plasmidet kunne tilpasse sig til en ny vært og overleve i meget længere tid. Heldigvis var det ikke alle bakterier, plasmidet nemt kunne tilpasse sig til, og nogle bakterier var derfor mindre tilbøjelige til at beholde deres resistensgener, når antibiotika ikke var til stede. Den hyppigste måde plasmidet tilpassede sig på, var ved at fjerne de gener, som er involveret i plasmidets overførsel mellem bakterier. Det vil sige, at selvom plasmidet blev mere stabilt i én værtsbakterie, var det på bekostning af dets evne til at sprede sig til nye bakterier.

Vi må forstå spredningen af resistens, hvis vi vil forhindre den

Hvis vi vil resistens til livs, handler det i høj grad om at styre vores forbrug af antibiotika. Dog kan vi ikke regne med, at de gener, som allerede findes i mennesker, og f.eks. dyrehold i landbruget, forsvinder af sig selv, hvis vi mindsker brugen af antibiotika [12]. Hvor antibiotikaforbruget hos mennesker er af afgørende betydning, tyder nyere forskning på, at de miljøer som udsættes for antibiotika, f.eks. landbrugsdyr og spildevandsanlæg, kun er problematiske,

hvis resistensgenerne nemt kan spredes mellem miljø og mennesker [7,13].

Vores ultimative mål er at kunne forudsige risikoen for, at nuværende og nye resistensgener skaber problemer i fremtiden. I øjeblikket arbejder vi på at forstå de faktorer, som har betydning for spredningen og overlevelsen af resistens i miljø og mennesker. Selvom vores resultater tyder på, at bakterier foretrækker nogle typer af resistensgener frem for andre, så er specielt den genetiske kontekst generne befinder sig i vigtig for, om genet nogensinde finder vej til en bakterie, som gør os syge. Her spiller plasmider en stor rolle, fordi resistensgenets fremtid i høj grad afhænger af plasmidets evne til at tilpasse sig nye værtsbakterier.

Hvis vi vil forhindre spredningen af resistens, bliver vi nødt til at forstå de vigtigste evolutionære mekanismer, som kommer i spil, når bakterierne deler DNA som plasmider. Denne viden vil kunne inddrages, når nye antibiotika skal udvikles, fordi vi på den måde kan undvige de resistensmekanismer, som er nemmest for bakterierne at dele med hinanden. Et andet potentiale i at kende de afgørende mekanismer for spredningen af resistens er, at vi kan begynde at udvikle lægemidler, som rammer spredningen af resistensgenerne frem for bakterien selv. F.eks. vil de proteinstrukturer, som plasmider anvender til at replikere, stabilisere eller overføre sig selv med, kunne fungere som mål for nye lægemidler, der potentielt kan gøre gamle antibiotika anvendelige igen og forlænge levetiden af nye antibiotika.

E-mail:

Andreas Porse: anpor@biosustain.dtu.dk

Morten Sommer: msom@bio.dtu.dk

Referencer

1. T.P. Van Boeckel, S. Gandra, A. Ashok, Q. Caudron, B.T. Grenfell, S.A. Levin, and R. Laxminarayan, "Global antibiotic consumption 2000 to 2010: An analysis of national pharmaceutical sales data", *Lancet Infect. Dis.*, vol. 14, no. 8, pp. 742-750, 2014.
2. G. Dantas and M. Sommer, "How to Fight Back Against Antibiotic Resistance," *Am. Sci.*, vol. 102, 2014.
3. J.O'Neill, "Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations," *Rev. Antimicrob. Resist.*, no. May, p. 84, 2016.
4. V.M. D'Costa, C.E. King, L. Kalan, M. Morar, W.W.L. Sung, C. Schwarz, D. Froese, G. Zazula, F. Calmels, R. Debruyne, G.B. Golding, H.N. Poinar, and G.D. Wright, "Antibiotic resistance is ancient," *Nature*, vol. 477, no. 7365, pp. 457-61, Sep. 2011.
5. K. Bhullar, N. Waglechner, A. Pawlowski, K. Koteva, E.D. Banks, M.D. Johnston, H.A. Barton, and G.D. Wright, "Antibiotic resistance is prevalent in an isolated cave microbiome," *PLoS One*, vol. 7, no. 4, pp. 1-11, 2012.
6. M.O. A. Sommer, G. Dantas, and G.M. Church, "Functional characterization of the antibiotic resistance reservoir in the human microflora," *Science*, vol. 325, no. 5944, pp. 1128-1131, 2009.
7. C. Munck, M. Albertsen, A. Telke, M. Ellabaan, P.H. Nielsen, and M.O.A. Sommer, "Limited dissemination of the wastewater treatment plant core resistome," *Nat. Commun.*, vol. 6, p. 8452, 2015.
8. K.J. Forsberg, S. Patel, M.K. Gibson, C.L. Lauber, R. Knight, N. Fierer, and G. Dantas, "Bacterial phylogeny structures soil resistomes across habitats," *Nature*, vol. 509, no. 7502, pp. 612-6, 2014.
9. E. van der Helm, L. Imamovic, M.M. Hashim Ellabaan, W. van Schaik, A. Koza, and M.O.A. Sommer, "Rapid resistome mapping using nanopore sequencing," *Nucleic Acids Res.*, vol. 69, p. gkw1328, Jan. 2017.
10. K.J. Forsberg, A. Reyes, B. Wang, E.M. Selleck, M.O.A. Sommer, and G. Dantas, "The Shared Antibiotic Resistome of Soil Bacteria and Human Pathogens," *Science* (80-.), vol. 337, no. 6098, pp. 1107-1111, 2012.
11. A. Porse, K. Schønning, C. Munck, and M.O.A. Sommer, "Survival and Evolution of a Large Multidrug Resistance Plasmid in New Clinical Bacterial Hosts," *Mol. Biol. Evol.*, vol. 33, no. 11, pp. 2860-2873, 2016.
12. D.I. Andersson and D. Hughes, "Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance?," *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 8, no. 4, pp. 260-71, Apr. 2010.
13. B.A.D. Van Bunnik and M.E.J. Woolhouse, "Modelling the impact of curtailing antibiotic usage in food animals on antibiotic resistance in humans," *R. Soc. opensci.*, vol. 4, no. 161067, 2016.