

# Penicillinresistenz in Pneumokokken

## Evolution im Zeitraffer

### Projektbericht

Wir mögen keine Bakterien. Sie machen krank. Es ist gut, dass es Antibiotika gibt, die sie umbringen und uns dann wieder gesund machen. Denkt man. Antibiotikaresistente Bakterien stehen in letzter Zeit immer wieder in den Schlagzeilen und haben es sogar in die Tageschau des Fernsehens gebracht. Tatsächlich haben sich seit der Verwendung von Antibiotika zunehmend resistente Erreger ausgebreitet – einige davon sind inzwischen gegen alle Antibiotika resistent, die bei den jeweiligen Krankheiten eingesetzt werden können, die sie verursachen.

### *Streptococcus pneumoniae* – Freund oder Feind?

Das Haustier meines Labors ist ein Bakterium, das als Paradigma der Entwicklung von antibiotikaresistenten Bakterien gilt: *Streptococcus pneumoniae*, auch Pneumokokkus genannt. Es bewohnt alle Menschen immer mal wieder, aber verursacht nur manchmal Krankheiten – es ist pathogen. Es führt zu Mittelohrentzündung (wer kennt das nicht bei Kindern?), Lungenentzündung und Nasennebenhöhlenentzündung (Sinusitis). Vor allem im Fall von Hirnhautentzündung (Meningitis) stellen antibiotikaresistente Stämme ein Problem dar, da durch die Bluthirnschranke Medikamente schlechter an den Ort gelangen, wo sie wirken

sollen – nämlich in das Gehirn. Vor der Verwendung von Penicillin, dem ersten Antibiotikum, das seit den 40er Jahren des letzten Jahrhunderts auf dem Markt ist, galten Pneumokokken bis Ende der 70er Jahre als perfekt penicillin-sensitiv. Seit dieser Zeit ist weltweit ein enormer Anstieg von penicillin-resistenten Stämmen zu beobachten, wobei sowohl der Anteil resistenter Stämme steigt, als auch das Resistenzniveau. Resistenz wird definiert über die Konzentration eines Antibiotikums, die das Wachstum der Bakterien hemmt und die als minimale Hemmkonzentration (MHK) bezeichnet wird. Mein Projekt befasst sich mit der Ausbreitung resistenter Pneumokokken und dem Mechanismus der Penicillinresistenz. Ein Anliegen war darüber hinaus die Mikrobiologie möglichst vielen verständlich zu machen – was ich auch hier versuchen will. Den Fellows des Krupp-Kollegs, von denen die meisten nicht-naturwissenschaftliche Projekte bearbeiteten und keiner ein biologisches, sei an dieser Stelle gedankt für ihr Interesse und viele anregende Diskussionen.

Im Folgenden werde ich zunächst das Bakterium *Streptococcus pneumoniae* vorstellen und auf die Ausbreitung resistenter Stämme eingehen. Der übliche Resistenzmechanismus wird dann erläutert und die Komponenten, die



Professor em. Dr. Regine Hakenbeck war von Oktober 2013 bis September 2014 Alfred Krupp Senior Fellow. Sie war Professorin für Mikrobiologie an der Technischen Universität Kaiserslautern.

Regine Hakenbeck studierte Mikrobiologie, Biochemie, Organische Chemie und Genetik an der Universität Tübingen, bevor sie 1976 an der Freien Universität Berlin promovierte und sich dort auch 1985 habilitierte. Von 1997 bis 2013 war sie Professor für Mikrobiologie an der Technischen Universität Kaiserslautern. Sie ist Gründungsdirektorin des Nano+Bio Centers (2002) und Mitglied

des Wissenschaftlichen Beirats des Robert-Koch-Instituts Berlin sowie der Zentralen Kommission für Biologische Sicherheit. Ihre Forschungsinteressen konzentrieren sich auf die Evolution und Mechanismen der Penicillinresistenz bei *Streptococcus pneumoniae* sowie auf die Genomforschung von Streptokokken.

### Kurzvita

### » Evolution von *Streptococcus pneumoniae*

Das Bakterium *Streptococcus pneumoniae* gilt als Paradigma für die rasante Evolution von Antibiotikaresistenzen in human-pathogenen Bakterien während der letzten Jahrzehnte weltweit. Um möglicherweise neue Strategien zu entwickeln, wie wir resistente Bakterien bekämpfen können, müssen wir verstehen welche Mechanismen der Resistenz zu Grunde liegen. In dem speziellen Fall der Penicillinresistenz wird diese in *S. pneumoniae* vor allem durch Modifikation der Penicillin-bindenden Proteine vermittelt, den Targetenzymen für diese Antibiotika. Diese Veränderungen sind das Resultat von Gentransfer zwischen verschiedenen Bakterienarten, die Fähigkeit DNA aufzunehmen und

in das Genom zu integrieren ist somit ausschlaggebend. Wesentliche Partner für diese genetische Kommunikation sind nahe verwandte Streptokokken, die harmlose Besiedler der Mundschleimhäute sind. Die Proteine, die für die Penicillinresistenz verantwortlich sind, spielen eine wichtige Rolle für die Morphogenese eines Bakteriums, sie sind an der Synthese der Bakterienzellwand beteiligt und sind wesentlicher Bestandteil des Zellteilungsapparates. Ein Vergleich der Genome von *S. pneumoniae* mit einem harmlosen Verwandten gibt erste Aufschlüsse über die Komponenten, die für die Pathogenität von Pneumokokken verantwortlich sind.

### Fellow-Projekt

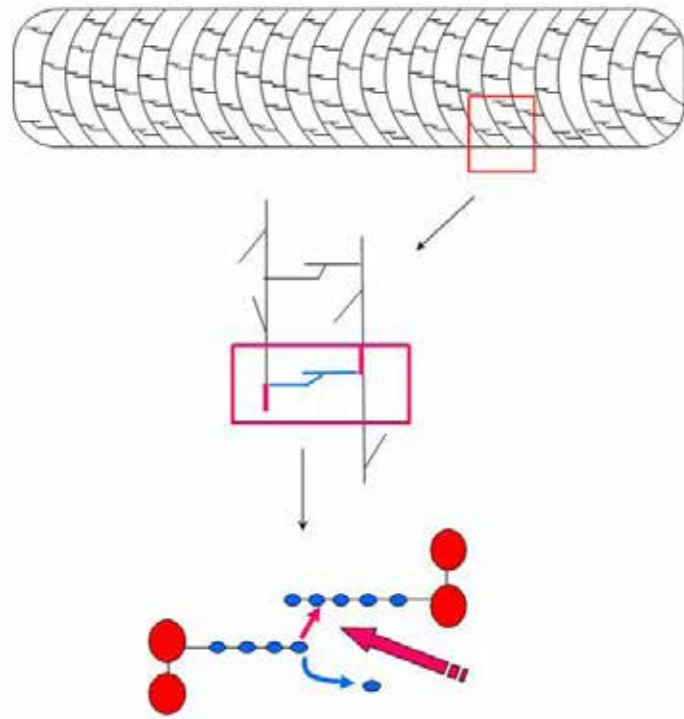


Abb. 1: Die Bakterienzellwand enthält ein riesiges Molekül, das die gesamte Zelle umhüllt: das Murein (oben). Es wird aus Untereinheiten geknüpft, die aus zwei Zuckern bestehen (rote Ovale), an denen ein Peptid angehängt ist; das Peptid besteht aus Aminosäuren (blaue Kreise). Die Verbindung zweier Peptide wird durch ein Enzym katalysiert, das durch Penicillin gehemmt werden kann. Dieses ist die entscheidende penicillin-empfindliche Reaktion in Bakterien.

daran beteiligt sind, werden vorgestellt. Auch wenn wir resistente Pneumokokken im Labor züchten können, sieht die Welt außerhalb des Labors anders aus. Dort stehen Pneumokokken die Resistenz von anderen Bakterien – sie sind genetische Diebe und hervorragend ausgestattet, um dies zu bewerkstelligen. Diese anderen Bakterien sind die nächsten Verwandten der Pneumokokken, die in der Regel keine Krankheiten verursachen, sondern friedlich mit dem Menschen koexistieren. Bei einer so engen Verwandtschaft stellt sich die Frage, warum der eine pathogen ist, der andere aber

nicht. Dafür sind Analysen des Genoms der Bakterien notwendig, auf die ich zum Schluss eingehen werde.

### Die Ausbreitung resistenter Pneumokokken

Wie am Anfang erwähnt breiten sich seit Ende der 70er Jahre des letzten Jahrhunderts penicillin-resistente Pneumokokken weltweit aus. Die ersten resistenten Stämme wurden nicht in den Industrieländern beobachtet, sondern es waren Berichte über Isolate aus Papua-Neuguinea und Südafrika, die dieses Phänomen zuerst beschrieben. Seit den 80er Jahren folgten europäische Länder wie Spanien und Frankreich und inzwischen haben sich resistente Stämme über alle Kontinente und über alle Länder ausgebreitet, in denen solche Analysen erhoben werden. Zahlen von über 80% sind dabei keine Seltenheit. Wie kam es dazu? Der einzige sichere Parameter, den man in Zusammenhang mit der Resistenzrate identifizieren konnte, ist die falsche Einnahme von Antibiotika z.B. bei Viruserkrankungen, bei denen sie nicht helfen, sowie der insgesamt zu häufige Verbrauch inklusive den gewaltigen Mengen, die bei der Tierhaltung eingesetzt werden. Man versucht inzwischen, über Impfstoffe gegen Pneumokokken die Krankheiten zu bekämpfen. Das Problem ist allerdings, dass Pneumokokken in vielen Varianten vorkommen, und die Impfstoffe nur einen Teil davon abdecken, nämlich die, die am häufigsten vorkommen. Das bedeutet, dass neue Varianten häufiger werden, wird der Impfstoff flächendeckend eingesetzt, wie es inzwischen in vielen Ländern üblich ist.

### Der Mechanismus der Penicillinresistenz

Penicillin und verwandte Antibiotika, die als Beta-Lactame eine eigene Substanzklasse darstellen, wirken ausschließlich auf Prozesse, die in Bakterien vorkommen. Sie inhibieren spezielle Proteine, die an der Bildung eines

besonderen Moleküls der Bakterienzellwand beteiligt sind, dem Murein. Eine schematische Ansicht des Mureins ist in Abb. 1 zu sehen. Man kann sich vorstellen, dass das Murein wie ein Strickstrumpf die Zelle umgibt und ihre Form widerspiegelt.

Die Enzyme, die an dem Stricken des Mureins beteiligt sind, können durch Penicillin gehemmt werden. Werden Bakterien also mit Penicillin behandelt, funktionieren diese Proteine nicht mehr und so entstehen ‚Löcher‘ im Murein. Das Bakterium löst sich auf und stirbt. Diese Enzyme binden das Penicillin in dem Bereich, der für ihre Funktion verantwortlich ist, und sind somit blockiert. Sie werden daher auch als Penicillin-bindende Proteine (PBP) bezeichnet.

Das allmähliche Ansteigen dieser Resistenz, also der MHK, von wenigen Mikrogramm pro Milliliter ( $\mu\text{g/ml}$ ) bis auf über 20 Milligramm pro Milliliter ( $\text{mg/ml}$ ), also auf über das Tausendfache, lässt auf einen komplizierten Mechanismus schließen. Bei resistenten Bakterien sind PBP so verändert, dass sie von Penicillin nicht mehr gehemmt werden, und mindestens drei PBP sind an der Resistenz beteiligt. Sie arbeiten also weiter auch in Gegenwart des Antibiotikums, das Murein in der Zellwand bleibt ausreichend intakt. Wie können sich PBP verändern, damit diese Blockade, diese Hemmung nicht mehr stattfinden kann?

Veränderungen in Proteinen werden durch Mutationen verursacht, also Veränderungen in dem Gen, das für das entsprechende Protein kodiert. Um die Proteinveränderungen zu identifizieren, ist es das Einfachste, das entsprechende Gen zu analysieren, es zu sequenzieren. Die Gensequenz ist vergleichbar mit einer Buchstabenfolge in einem Wort, wobei ein Gen nur aus vier verschiedenen ‚Buchstaben‘ besteht; Moleküle, die als Nukleotide

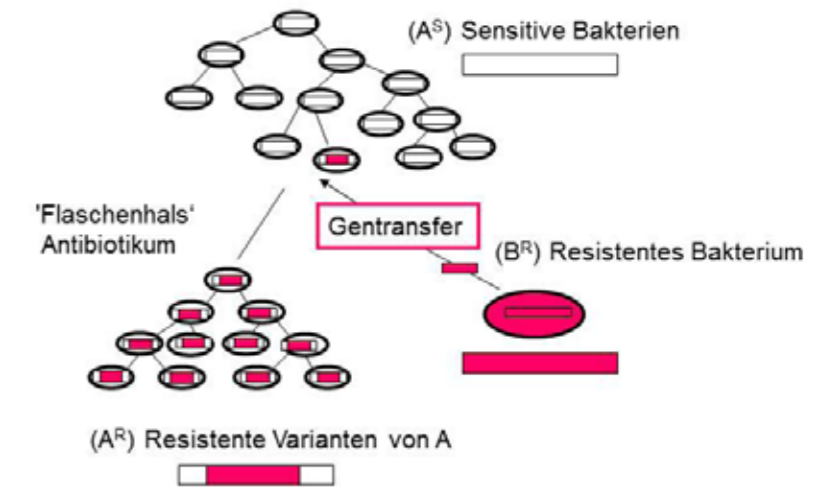


Abb. 2: Gentransfer ist verantwortlich für die Evolution neuer Bakterienvarianten. Bakterien teilen sich (Ovale); ihr Genom ist schematisch durch einen Block dargestellt. *Streptococcus pneumoniae* (A; weiß) kann Gene von anderen Bakterien (B; rot) aufnehmen über Gentransfer, was zu einem ‚gemischten‘ Gen von weißen und roten Bestandteilen führt – man spricht dann von einem Mosaikgen. Sind diese Gene zufällig für Penicillinresistenz verantwortlich, können in Gegenwart von Antibiotikum nur die Bakterien überleben, die dieses Gen aufgenommen haben ( $A^R$ ).

(nt) bezeichnet und mit A, T, G und C abgekürzt werden. Ein durchschnittliches Gen ist ungefähr 1000 nt lang, kann aber auch deutlich kürzer oder länger sein. Die Gene, die an der Penicillinresistenz beteiligt sind, bestehen aus ungefähr 2000 nt – der Gensequenz. Lesen kann man diese Sequenzen mittels relativ aufwändiger biochemischer Verfahren. Sie können dann mit einer Reihe von Computerprogrammen analysiert und mit anderen Genen verglichen werden, um die Mutationen zu entdecken.

Vergleicht man nun die Gene, die für die Penicillinresistenz verantwortlich sind, in resistenten Stämmen mit denen sensitiver Stämme sieht man Erstaunliches. Gene resistenter

Stämme enthalten Bereiche, die in ihrer Sequenz sehr verändert sind, so sehr, dass man das nicht durch die Ansammlung einzelner Mutationen erklären kann. Man geht daher davon aus, dass diese Genbereiche von anderen Bakterienarten stammen. Diese fremden Gene sind nicht zusätzlich da, sondern werden gegen einen entsprechenden Teil ausgetauscht – man spricht von einem ‚Mosaikgen‘. Die Verwandtschaft der Bakterien, die mit ihren Genen kommunizieren können, ist so nahe, dass dieser Austausch im Wesentlichen zu keinen Beeinträchtigungen bezüglich der Funktion der Genprodukte führt. Diese Hypothese konnte inzwischen durch mehrere Befunde bestätigt werden. Zuerst konnten wir solche ‚Fremdbereiche‘, die in Abb. 2 rot dargestellt sind, in nahe verwandten Streptokokken auffinden. Ein Problem war allerdings, dass auch diese Streptokokken genauso wie Pneumokokken sehr penicillin-sensitiv sind. Also musste man annehmen, dass die Resistenz sich zuerst in den Streptokokken entwickelt hat. Das hat wohl damit zu tun, dass sie uns das Leben lang begleiten: sie gehören zu einer gesunden Mundflora und wir sind tatsächlich auf sie angewiesen. Diese Bakterien haben sich ihrem Wirt angepasst, man braucht sich gegenseitig. Allerdings bekommen sie alle Antibiotikatherapien ab, die wir durchmachen, was dazu führt, dass zufällig entstandene resistente Varianten immer häufiger vorzufinden sind. Im Gegensatz dazu bleiben Pneumokokken nur einige Woche in einem Menschen, und haben keine Zeit, selber solche hohen Resistenzen zu entwickeln. Für sie ist es einfacher, auf das zurückzugreifen, was ihnen durch ihre Verwandten bereitgestellt wird: Gene, die Resistenz vermitteln. Es spricht einiges für diese Vorstellung. Erstens ist in Ländern, die einen hohen Anteil resistenter Pneumokokken haben, das Resistenzniveau bei den Streptokokken noch höher als bei den Pneumokokken. Zweitens sind die Mosaikblöcke, die wir in den

Genen resistenter Pneumokokken finden, immer nur ein Teil der Gene, die auch in den resistenten Streptokokken vorkommen.

Natürlich wollen wir mehr über diese PBP erfahren, die an der Penicillinresistenz beteiligt sind: welche Veränderungen sind wirklich relevant für die Resistenz? Können wir Substanzen entwickeln, die die Funktion solcher veränderter Proteine hemmen, und damit neue Wirkstoffe entwickeln? Haben resistente Stämme Nachteile durch ihre veränderten Proteine? Was machen PBP in dem Bakterium – sie sind ja sicher nicht dafür entwickelt worden mit Penicillin zu reagieren? Diese Fragen machen deutlich, dass wir die sogenannte angewandte Forschung nie ohne Grundlagenforschung betreiben können. Besonders die letzte Frage – Was machen PBP in den Bakterien? – bringt uns auf ein grundlegendes Problem in der Biologie: wie können Bakterien, Zellen, die sich verdoppeln, dann teilen, sodass beide Hälften wieder eine neue Zelle ergeben?

Wie oben beschrieben sind PBP an der Synthese des Mureins beteiligt, das der Bakterienzelle ihre Form und ihre Stabilität verleiht. Ein Bakterium teilt sich in der Regel, nachdem es länger geworden ist und sich alles Notwendige für das Überleben verdoppelt hat. Dann schnürt es sich in der Mitte ein, so dass zwei Zellen entstehen. Das Murein muss also in dieser ‚Teilungsphase‘ so synthetisiert werden, dass in der Mitte etwas Besonderes passiert, was sich unterscheidet von dem, was beim Längenwachstum passiert. Welche Proteine sind an der Zellteilung beteiligt? Tatsächlich kann man Proteine mit fluoreszierenden Farbstoffen markieren und ihre Lokalisation mikroskopisch sichtbar machen. Wir haben das mit einem der PBP gemacht, das besonders wichtig für die Resistenzentwicklung ist, das PBP2x. Es ist ausschließlich an der Teilungszone zu sehen (Abb. 3), ist also Bestand-

teil der Maschinerie, die für die Zellteilung verantwortlich ist. Wir haben ein Puzzlestück in der Beschreibung des Lebens eines Bakteriums hinzugefügt. Wann wir verstehen, wie ein so komplexer Ablauf wie die Zellteilung funktioniert, bleibt abzuwarten.

Wir wissen inzwischen, dass veränderte PBP, die in resistenten Stämmen vorkommen, nicht optimal funktionieren. Um dennoch Zellwachstum und -teilung zu garantieren, müssen in resistenten Stämmen Kontrollmechanismen induziert werden. Wir haben in unserem Labor einige solcher ‚Kontrollgene‘ identifizieren können. Um zu verstehen, wie diese Kontrollmechanismen funktionieren, wollen wir herausfinden, welche Proteine in resistenten gegenüber sensiblen Stämmen in unterschiedlichen Mengen vorhanden sind. Solche Analysen, in denen alle Proteine einer Bakterienzelle erfasst werden, können in der Abteilung Mikrobiologie der Universität Greifswald realisiert werden. Erste Versuche dazu wurden in einem Kooperationsprojekt durchgeführt und wir hoffen im nächsten Jahr weitere Ergebnisse erhalten zu können.

**Pathogen oder nicht pathogen: was aus Genomen gelesen werden kann**

Wenn verschiedene Bakterien ihre Gene austauschen, wie kommt es dann, dass sie immer noch als eine Art beschrieben werden können und sich nicht vollständig durchmischen? Und was macht das Besondere der einen Art aus, was die andere nicht hat? Im Vergleich zu den nächsten Verwandten des potentiell pathogenen Bakteriums *S. pneumoniae* und seinem Verwandten *S. mitis*, der in der Regel keine Krankheiten verursacht, haben wir versucht das durch einen Vergleich ihrer Genome, also ihrer gesamten Gene, herauszufinden. Beide Arten sind etwas über zwei Millionen Nukleotide groß, was etwas über zweitausend Genen entspricht. Im Vergleich dazu ist das

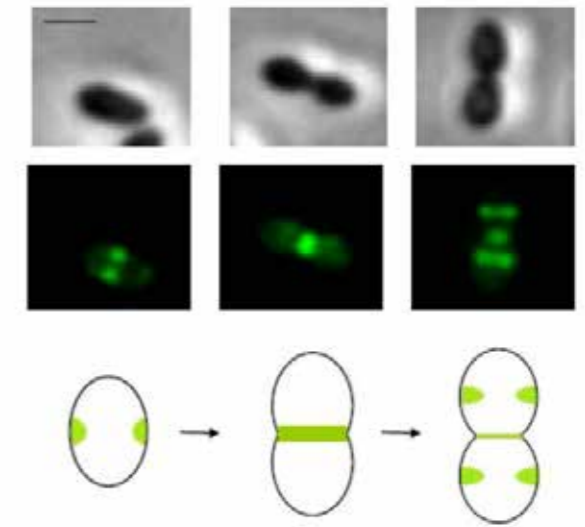


Abb. 3: Das Protein PBP2x ist an der Teilungszone eines Bakteriums lokalisiert. In einer wachsenden Kultur von Pneumokokken kann man Zellen in verschiedenen Stadien beobachten: kleine Zellen, solche die länger werden, und solche die sich teilen (obere Reihe). Das PBP2x ist mit einem grünen Fluoreszenzfarbstoff markiert, das man mit einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar machen kann (zweite Reihe). Unten ist die Lokalisierung schematisch vereinfacht dargestellt. Während der Teilung ist alles Protein im Zentrum der Zelle, am Teilungsseptum, vorhanden. Sobald die Zelle sich geteilt hat beginnt das Protein an die zukünftige Teilungszone zu wandern.

Genom des Menschen, also alle Chromosomen zusammen, etwas über drei Milliarden nt groß und umfasst ca. 23.000 Gene. Anfang und Ende von Genen sind durch bestimmte Sequenzen definiert; sie können somit über verschiedene Programme über den Computer identifiziert und mit denen anderer Organismen verglichen werden. Für mich sind die Methoden, die dabei verwendet werden, immer noch faszinierend. Als ich studierte, existierte das Wort ‚DNA-Sequenzieren‘ noch nicht, die Möglichkeit das zu tun, war eine phantastische Utopie. Wir haben Anfang dieses Jahrhunderts im Rahmen von BMBF-Projekten das erste Genom von *S. mitis* sequenziert, ein

ungeheuer kostenaufwändiges Unterfangen, das sich über Jahre erstreckte. Heute können Genome von Bakterien für unter 1000 € in wenigen Stunden sequenziert werden. Neue Technologien werden derzeit entwickelt, mit denen ein einziger DNA-Strang kontinuierlich ‚gelesen‘ werden kann, das Genom eines Bakteriums also mühelos entziffert werden kann. Schon jetzt werden enorme Datenmengen produziert und das Entscheidende, um biologisch relevante Details daraus zu extrahieren, ist vor allem die bioinformatische Aufarbeitung der Sequenzdaten.

Bei einem Vergleich von *S. pneumoniae* und *S. mitis* fällt auf, dass in ihren Genomen trotz ihrer nahen Verwandtschaft nur ein Teil der Gene, etwas über 50 %, bei beiden Arten vorkommt. Der Rest setzt sich aus Genen zusammen, die in manchen Bakterien einer Art, oder auch in beiden, vorkommen, aber eben nicht in allen (bei höheren Organismen sieht das völlig anders aus: das menschliche Genom unterscheidet sich von dem des Schimpansen nur in bis zu 5 %!). Diese Variabilität bei den Bakterien ist ein Zeichen dafür, dass Gene und ganze Gengruppen übertragen werden können, so wie es bei den Genen passiert ist, die

für die Penicillinresistenz wichtig sind. Zum anderen gibt es Gene, die nur in einer Art vorkommen, in der anderen aber nicht. Bisher finden wir bei Pneumokokken ca. 150 Gene, die nicht in *S. mitis* vorhanden sind. Diese Zahlen beruhen auf dem Vergleich von nur wenigen Genomen und mit steigender Zahl der Daten wird sich diese Zahl natürlich noch verringern. Unter diesen Genen sind solche, die als ‚Virulenzfaktor‘ schon lange bekannt sind, die also wichtig sind, um den Wirt krank zu machen. Warum sich diese nur in den Pneumokokken gehalten haben, wird derzeit heftig diskutiert. Es ist möglich, dass die besondere Nische – der hintere Nasen-Rachenraum –, in der Pneumokokken vorkommen, einen wesentlichen Faktor für die Evolution dieses Bakteriums darstellt. Wahrscheinlich ist es, dass erst mit der Evolution des Menschen sich die Variabilität dieses Bakteriums so entwickelt hat, wie sie uns heute bekannt ist. Immerhin hat das Bakterium es geschafft, sich so mit uns zu arrangieren, dass wir in der Regel gut mit ihm leben können, wobei seine genetische Kommunikationsfähigkeit einen wichtigen Beitrag dafür geleistet hat. Halten wir fest: Kommunikation ist Evolution.

Hakenbeck, R.: Discovery of  $\beta$ -lactam-resistant variants in diverse pneumococcal populations. *Genome Medicine* 6:72. 2014.

Schweizer, I.; Peters, K.; Stahlmann, C.; Hakenbeck, R.; Denapaité, D.: Penicillin-binding protein 2x of *Streptococcus pneumoniae*: The mutation Ala707Asp within the C-terminal PASTA2 domain leads to destabilization. *Microb. Drug Resist.* 20:250–257. 2014.

Engel, H.; Mika, M.; Denapaité, D.; Hakenbeck, R.; Mühlemann, K.; Heller, M.; Hathaway, L. J.; Hilty, M.: A low-affinity penicillin-binding protein 2x variant is required for heteroresistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58:3934–3941. 2014.

Peters, K.; Schweizer, I.; Beilharz, K.; Stahlmann, C.; Veening, J. W.; Hakenbeck, R.; Denapaité, D.: *Streptococcus pneumoniae* PBP2x mid-cell localization requires the C-terminal PASTA domains and is essential for cell shape maintenance. *Mol Microbiol.* 92:733–755. 2014.

Hakenbeck, R.; Mitchell, T.; Tettelin, H.; Denapaité, D.; Schähle, Y.; Chancey, S.: Genomics, genetic variation and regions of differences. In: *Streptococcus pneumoniae: Molecular mechanisms of host-pathogen interactions*. Eds.: Orihuela, C., Hammerschmidt, S. and Brown, J.. In press.