

Induktion des MAR-Phänotyps als mögliche Ursache für die Entwicklung der Fluorchinolon-Resistenz bei *E. coli*

Volker Hüllen, Peter Heisig und Bernd Wiedemann, Bonn

Die Entwicklung der Fluorchinolon-Resistenz in *E. coli* ist ein schrittweiser Prozess. Klinische Isolate mit hoher Fluorchinolon-Resistenz tragen überwiegend Mutationen in den Topoisomerase-Genen II (*gyrA*) und IV (*parC*). Zusätzlich können Mutationen auftreten, die durch Veränderung der intrazellulären Akkumulation (Uptake) und/oder des Exports (Efflux) der Substanzen einen multiplen Antibiotika-Resistenz(MAR)-Phänotyp auslösen. Obwohl die einzelnen Faktoren weitgehend bekannt sind, bleibt die Entstehung der Fluorchinolon-Resistenz ein Paradoxon, da keine der bekannten Mutationen allein zu einer klinischen Resistenz führt und die Kombination zweier Mutationen in einem Schritt mindestens 10^{15} Zellen benötigen würde. In Anwesenheit von Salicylsäure, einem Induktor des MAR-Phänotyps, konnten Fluorchinolon-resistente *E.-coli*-Mutanten unter klinisch relevanten Konditionen in einem Schritt selektiert werden. Abhängig von den weiteren Selektionsbedingungen können diese Mutanten weitere Mutationen, wie *parC* und/oder solche, die den Uptake/Efflux-Komplex betreffen, adaptieren. Neben Salicylsäure existieren andere Induktoren des MAR-Phänotyps wie Vitamin K, andere Naphthochinone, Ethanol oder Gallensalze. Diese könnten als natürlich vorkommende Induktoren im Darm wirken und so bei der Entstehung der Fluorchinolon-Resistenz eine entscheidende Rolle spielen.

Schlüsselwörter: Fluorchinolon-Resistenz, Induktion des MAR-Phänotyps

*It is evident that the development of fluoroquinolone resistance (FQ^r) in *E. coli* is a stepwise process. Clinical isolates with high level FQ^r predominantly carry mutations in subunits A of topoisomerase II (*gyrA*) and IV (*parC*), respectively. In addition, mutations causing a multiple antibiotic resistance (*mar*) phenotype by altering the intracellular accumulation (uptake) and/or the active export (efflux) of quinolones can occur. Despite these known factors the origin of FQ^r still remains a paradox because (i) none of the mutations alone confer clinical resistance and (ii) a combination of two mutations (summarized mutation frequencies) requires at least 10^{15} cells. In the presence of salicylic acid known as an inducer of the *mar*-phenotype it was possible to select *E. coli* mutants with FQ^r in one selection step under clinically relevant conditions. Depending on the subsequent selection such mutants will be able to accumulate additional mutations like *parC* and/or those concerning the uptake/efflux complex. Besides salicylic acid other inducers of the *mar*-phenotype like vitamin K, other naphthoquinones, ethanol or bilesalts exist. These could act as naturally occurring inducers in the intestines and, thus, help selecting fluoroquinolone resistant *E. coli*.*

Keywords: Fluoroquinolone resistance, induction of *mar*-phenotype

Resistenz gegenüber Fluorchinolonen war bei *E. coli* zunächst sehr selten [12] und erschien aufgrund der hohen MHK-Differenz zwischen Wildtyp-Niveau und klinischer Resistenz, die etwa das 200fache beträgt, auch nicht wahrschein-

lich. Diese Situation hat sich allerdings entscheidend geändert, so dass bereits 1995 rund 5 % aller klinischen *E.-coli*-Isolate in Deutschland resistent gegenüber Ciprofloxacin waren [8]. Hauptursache der Resistenz sind Veränderungen

der Zielstrukturen der Fluorchinolone: Topoisomerase II (Gyrase) und Topoisomerase IV. Hoch resistente klinische *E.-coli*-Isolate besitzen nahezu alle eine Kombination aus Gyrase- und Topoisomerase-IV-Mutationen [9]. Da die Mutationsfrequenz jeder einzelnen dieser Mutationen bei mindestens 10^{-9} liegt [6], ergibt sich bei der Kombination aus zwei bis drei Topoisomerase-Mutationen, die zum Erreichen hoher klinischer Resistenz notwendig sind, ein Paradoxon: Theoretisch ist es möglich, zu einer hohen Resistenz zu gelangen, praktisch jedoch benötigt man bereits zur Überwindung des klinischen Grenzwerts in einem Schritt mindestens 10^{18} KBE und zum Erlangen hoher klinischer Resistenz weitaus höhere Zellzahlen. Da bei der Therapie mit Fluorchinolonen, zum Beispiel Ciprofloxacin, die Serum-Konzentrationen über mehrere Stunden oberhalb der MHK einer *GyrA*-Serin-83-Mutante, der Ein-Schritt-Mutante mit der geringstmöglichen Sensibilität gegenüber Fluorchinolonen, liegt [1], erscheint es unmöglich, dass solche Mutanten unter der Therapie entstehen können. Daher ist die Existenz eines *Basal-Mechanismus* wahrscheinlich, der die Entstehung resistenter Mutanten durch die Verminderung der natürlichen Empfindlichkeit ermöglicht.

Hohe Fluorchinolon-Resistenz basiert neben Kombinationen von Mutationen in den Topoisomerase-Genen auf Veränderungen des Eintritts und des Austransports von Antibiotika. In diesen Fällen liegt häufig ebenfalls gleichzeitige Resistenz gegenüber einer Reihe nicht verwandter Substanzen vor [15]. Man spricht von einem multiplen Antibiotika-Resistenz(MAR)-Phänotyp.

Veränderungen verschiedener MAR-assoziiierter Gen-Loci treten bei etwa 25 % der klinischen *E.-coli*-Isolate mit

Für die Verfasser:

Volker Hüllen, Institut für Medizinische Mikrobiologie für Pharmazeuten, Meckenheimer Allee 168, 53115 Bonn

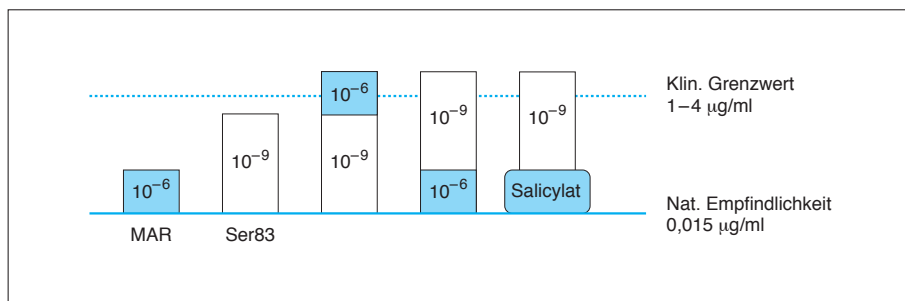


Abb. 1. Grafische Darstellung der Differenz zwischen natürlicher Empfindlichkeit und klinischer Resistenz gegenüber Ciprofloxacin bei *E. coli*. Die Balken verkörpern die „Höhe“ der Resistenz und geben die jeweilige Mutationsfrequenz wieder. Die Differenz zwischen natürlicher Empfindlichkeit und klinischer Resistenz ist sowohl für MAR-assoziierte Mutationen (grauer Balken) als auch für Einzelmutationen in *gyrA*, hier Serin-83 (weißer Balken) zu hoch. Erst eine Kombination beider Mutationen ermöglicht das Überschreiten des klinischen Grenzwerts, jedoch ist die erforderliche Zellzahl mit mindestens 10^{15} KBE unter natürlichen Bedingungen nicht gegeben. Anders liegt der Zusammenhang, wenn durch Induktion (grauer Kasten), hier durch Salicylsäure dargestellt, ein Basis-Niveau geschaffen werden. In diesem Fall kann der klinische Grenzwert mit nur einer Mutation überschritten werden.

Resistenz gegenüber Fluorchinolonen auf und betreffen sowohl die Aufnahme als auch den Export der Substanzen. Die maximale Ausprägung dieses als „Uptake/Efflux-Komplex“ zu bezeichnenden Sachverhalts bewirkt eine Verminderung der Antibiotika-Empfindlichkeit um das Achtfache, so dass eine partielle Ausprägung des Komplexes als Ursache für die unterschiedlichen Empfindlichkeiten klinischer Isolate mit gleichen Topoisomerase-Mutationen angesehen werden kann. Als Basal-Mechanismus in der Entwicklung der Fluorchinolone-Resistenz kann der Uptake/Efflux-Komplex jedoch nicht gesehen werden, da er sich aus einer Vielzahl von diversen Mutationen zusammensetzt, nicht alle klinischen Isolate betrifft und unterschiedlich ausgeprägt vorliegt. Dies spricht dafür, dass Veränderungen des Uptake/Efflux-Komplexes erst nach dem Erreichen der klinischen Resistenz, abhängig von Ort und Selektionsbedingungen, erworben werden.

Es bleibt das Paradoxon, dass bei *E. coli* die Differenz zwischen natürlicher Empfindlichkeit und klinischer Resistenz mit einer Mutation nicht überwunden werden kann und dass das Auftreten zweier Mutationen gleichzeitig eine zu hohe Zellzahl erfordert.

Der MAR-Phänotyp wurde ursprünglich im Zusammenhang mit der Induktion durch Tetracyclin beschrieben [3]. SoxRS, ein dem *mar*-Operon verwandtes System, trägt seinen Namen „superoxidresponse“ aufgrund der Reaktion auf Substanzen, die einen oxidativen Stress auslösen können [10]. Hieraus folgt,

dass die natürliche Empfindlichkeit von *E. coli* in Anwesenheit bestimmter, im Folgenden als *Induktoren* bezeichneter Substanzen, verringert ist. Unter Berücksichtigung der Erkenntnisse über den Uptake/Efflux-Komplex sollte diese Induktion eine Verminderung der Empfindlichkeit um das Achtfache bewirken.

Es ist eine große Anzahl von Induktoren beschrieben. Einige sind spezifisch für das *Mar*-Regulon, zum Beispiel Salicylsäure, die direkt mit *MarR* interagiert [2], andere Induktoren aktivieren das *Sox*-Regulon [10]. Die Expression von Efflux-Pumpen ist ebenfalls induzierbar. Die Ausprägung der *EmrAB*-Pumpe wird beispielsweise durch CCCP bewirkt [11], während die *AcrAB*-Pumpe durch Substanzen wie Ethanol oder Gallensalze induziert wird [13, 17]. Unter den Induktoren befinden sich darüber hinaus viele natürlich vorkommende Substanzen, wie beispielsweise pflanzliche Naphthochinone [16].

Die Empfindlichkeitsbestimmung einer *GyrA*-Serin-83-Mutante unter Zugabe diverser Induktoren gegenüber einer Reihe von Fluorchinolonen, Tetracyclin, Chloramphenicol und Co-trimoxazol ergab eine relative Übereinstimmung in den MHK-Werten im Vergleich zu einem klinisch resistenten *In-vitro*-Isolat, das neben der *GyrA*-Serin-83-Mutation eine Mutation im *mar*-Operon besitzt. Dies bedeutet, dass eine *GyrA*-Serin-83-Mutante unter induktiven Bedingungen eine klinische Resistenz ausprägt (Abb. 1).

Folglich wurde versucht, unter Zugabe des meist verwendeten Induktors Salicylsäure [15] Einschnitt-Mutanten unter

klinisch relevanten Bedingungen zu selektieren. Es wurde eine Ciprofloxacin-Konzentration von 1 µg/ml, d.h. vierfach über der MHK einer Serin-83-Mutante, verwendet. Die Ausgangszellzahl lag mit rund 5×10^{10} KBE in einem realistischen Bereich.

Während in den Ansätzen ohne Induktor, wie unter diesen Bedingungen zu erwarten, kein Wachstum stattgefunden hat, zeigten die induzierten Ansätze die normale Zellzahl einer Übernachtskultur. Es hatten sich vermutlich *GyrA*-Serin-83-Mutanten durchgesetzt, was in der RFLP-Analyse mit *HinfI* [5] bestätigt wurde. Die Mutanten zeigten keinen genetisch determinierten MAR-Phänotyp.

Diese Befunde ergeben, dass sich in Anwesenheit eines Induktors *GyrA*-Serin-83-Mutanten unter klinisch relevanten Bedingungen selektieren lassen. Diese können in der Folge, abhängig von den weiteren Selektionsbedingungen, zusätzliche Mutationen adaptieren.

Es stellt sich nun die Frage, ob unter *In-vivo*-Bedingungen während einer Therapie Umgebungsparameter herrschen, die den simulierten Bedingungen ähneln. Weiterhin stellt sich die Frage nach natürlichen Induktoren, die eine Induktion des MAR-Phänotyps permanent gewährleisten.

Als Ort der Entstehung der Fluorchinolone-Resistenz scheint das Enteron die günstigsten Bedingungen zu bieten, da hier eine genügend große Zellzahl vorhanden ist. Ferner werden mit der Nahrung potentielle Induktoren aufgenommen und gelangen so in Kontakt mit den Bakterien. Die *E.-coli*-Flora im Darm lässt sich generell in zwei Gruppen aufteilen, die transiente und die permanente Flora. Während die transiente Flora möglicherweise mit dem Darminhalt transportiert wird, liegt die permanente Flora an den Darmwänden vor. Hier findet üblicherweise nur ein geringes Wachstum statt, so dass die Zellen gegenüber Antibiotika verhältnismäßig unempfindlich sind. Eine Ausnahme bilden die Bereiche der Darmwand, die mit dem das Enteron umgebenden Netzwerk aus Blutgefäßen in Kontakt stehen. Dort befindet sich *E. coli*, als sauerstoffzehrender Keim für die Anaerobier-Flora unverzichtbar, unter aeroben Bedingungen in Abhängigkeit von den Serumkonzentrationen der Chemotherapeutika. In diesem Falle wären die klinischen Grenzwerte für Fluorchinolone bei der Resistenzentwicklung maßgeblich. Der Gehalt an Fluorchino-

lonen, speziell in den Fäzes, ist jedoch extrem hoch, so dass die Keime abgetötet werden müssten. Allerdings zeigen Untersuchungen, dass Fluorchinolone unter diesen Bedingungen gebunden vorliegen und nur zu einem Bruchteil bioverfügbar sind [14].

Salicylsäure, Ethanol oder Gallensäure stellen potentielle Induktoren dar, können jedoch nicht die alleinige Ursache der Induktion sein, da ihr Auftreten und ihre Konzentration sehr stark schwanken. Primär sind stattdessen pflanzliche Naphthochinone zu nennen, die mit der Nahrung aufgenommen werden oder, wie im Falle des Vitamins K₃, von der Bakterienflora selbst produziert werden [4, 7]. In Kombination mit den oben genannten und anderen, potentiellen, aber bisher nicht untersuchten Induktoren würde sich auf diese Weise eine permanente induktive Atmosphäre für die E.-coli-Flora ergeben.

Im Falle einer Therapie mit Fluorchinolonen könnten folglich, wie experimentell gezeigt, statistisch auftretende GyrA-Serin-83-Mutanten überleben und sich aufgrund der guten bakteriziden Wirksamkeit der Fluorchinolone gegenüber anderen Enterobakterien durchsetzen. Da diese Mutanten gegenüber den sensiblen Stämmen keinen Wachstumsnachteil haben, verbleiben sie entweder

im Darm oder gelangen durch Verschleppung in andere Gewebe, wo sie möglicherweise höheren Antibiotika-Konzentrationen ausgesetzt sind und weitere Mutationen adaptieren können.

Literatur

1. Borner K, Höffken G, Lode H, Koeppel P, et al. Pharmacokinetics of ciprofloxacin in healthy volunteers after oral and intravenous administration. *Eur J Clin Microbiol* 1986;5:179-86.
2. Cohen SP, Levy SB, Foulds J, Rosner JL. Salicylate induction of antibiotic resistance in *Escherichia coli*: activation of the *mar* operon and a *mar*-independent pathway. *J Bacteriol* 1993;175:7856-62.
3. Cohen SP, McMurry LM, Hooper DC, Wolfson JS, et al. Cross-resistance to fluoroquinolones in multiple-antibiotic-resistant (*Mar*) *Escherichia coli* selected by tetracycline or chloramphenicol: decreased drug accumulation associated with membrane changes in addition to *OmpF* reduction. *Antimicrob Agents Chemother* 1989;33:1318-25.
4. Conly JM. Assay of menaquinones in bacterial cultures, stool samples, and intestinal contents. *Methods Enzymol* 1997;282:457-66.
5. Fisher LM, Lawrence JM, Josty IC, Hopewell R, et al. Ciprofloxacin and the fluoroquinolones. New concepts on the mechanism of action and resistance. *Am J Med* 1989;87:2S-8S.
6. Heisig P, Tschorny R. Characterization of fluoroquinolone-resistant mutants of *Escherichia coli* selected in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38:1284-91.
7. Hill MJ. Intestinal flora and endogenous vitamin synthesis. *Eur J Cancer Prev* 1997;6(Suppl 1):S43-5.
8. Kresken M, Hafner D. Prävalenz der Antibiotikaresistenz bei klinisch wichtigen Infektionserregern in Mitteleuropa. *Chemother J* 1996;5:225-30.
9. Lehn N, Stower-Hoffmann J, Kott T, Strassner C, et al. Characterization of clinical isolates of *Escherichia coli* showing high levels of fluoroquinolone resistance. *J Clin Microbiol* 1996;34:597-602.
10. Li Z, Dimple B. SoxS, an activator of superoxide stress genes in *Escherichia coli*. Purification and interaction with DNA. *J Biol Chem* 1994;269:18371-7.
11. Lomovskaya O, Lewis K, Matin A. EmrR is a negative regulator of the *Escherichia coli* multidrug resistance pump *EmrAB*. *J Bacteriol* 1995;177:2328-34.
12. Lopez-Brea M, Alarcon T. Isolation of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from an infected Hickman catheter. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1990;9:345-7.
13. Ma D, Cook DN, Alberti M, Pon NG, et al. Genes *acrA* and *acrB* encode a stress-induced efflux system of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 1995;16:45-55.
14. McConville MJ, Dijkstra JW, Stamm JM, van Saene JJM. Effects of sarafloxacin hydrochloride on human and enteric bacteria under simulated human gut conditions. *Vet Q* 1995;17:5.
15. Miller PF, Sulavik MC. Overlaps and parallels in the regulation of intrinsic multiple-antibiotic resistance in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 1996;21:441-8.
16. Seoane AS, Levy SB. Characterization of *MarR*, the repressor of the multiple antibiotic resistance (*mar*) operon in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1995;177:3414-9.
17. Thanassi DG, Cheng LW, Nikaido H. Active efflux of bile salts by *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1997;179:2512-8.