

Antibakterielle Resistenz

Antimikrobielle Peptide – Inspiration aus der Natur

ALEXANDRO RODRÍGUEZ-ROJAS, JENS ROLFF
INSTITUT FÜR BIOLOGIE, FU BERLIN

Antimicrobial peptides (AMPs) are ancient immune effectors and are considered as new anti-infective drugs. AMPs differ from conventional antibiotics in their pharmacodynamics, speed of killing and they do not increase mutagenesis. This results in a much lower probability of bacterial resistance evolution against AMPs. AMPs are usually expressed as synergistic cocktails. If AMPs are to be used in the clinic to tackle the antibiotic crisis, understanding their natural biology will be pivotal to prevent resistance.

DOI: 10.1007/s12268-022-1728-3
© Die Autoren 2022

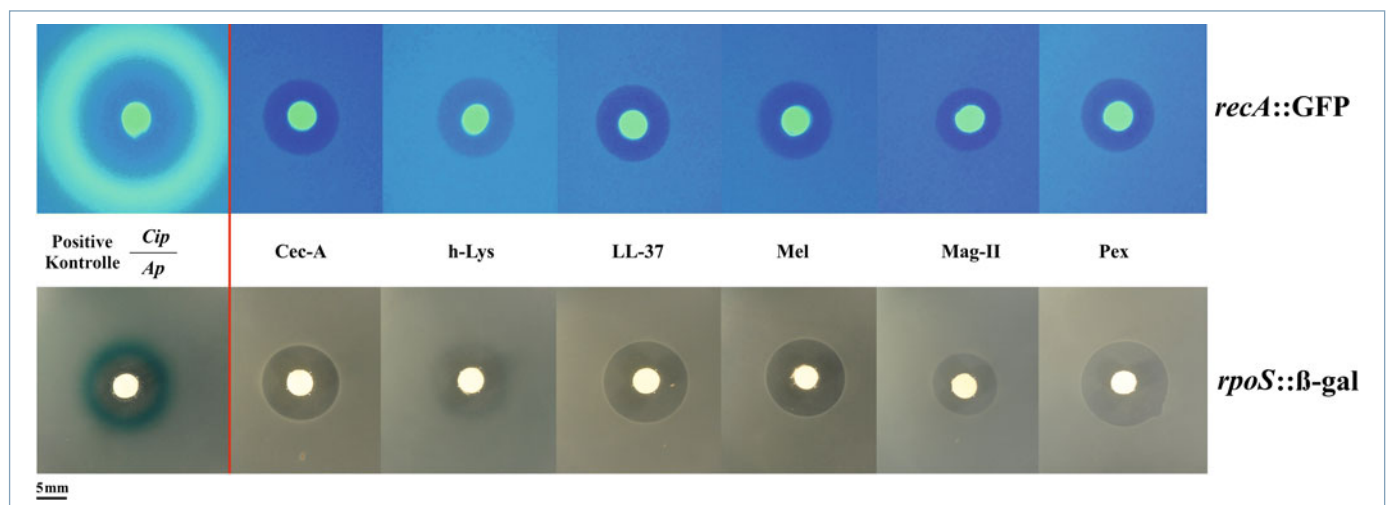
■ Antimikrobielle Peptide (AMPs) sind seit Anbeginn wichtige Verteidigungsmechanismen bei allen Formen des Lebens und besonders bei vielzelligen Organismen und spielen eine zentrale Rolle in der Abwehr und Kontrolle von Infektionen. Aufgrund dieses evolutiven Erfolgs werden AMPs auch zunehmend als alternative neuartige Antibiotika untersucht und entwickelt [1]. Da bisher

kaum AMP-Resistenzen in der Natur beobachtet wurden, wird oft angenommen, dass Resistenz gegen AMPs selten entstehen kann [1]. So hat es bei dem ersten AMP, das als Medikament eingesetzt wurde, Colistin (ein AMP bakteriellen Ursprungs), über 50 Jahre gedauert, bis Resistenzen beschrieben wurden [2], also 10- bis 20-mal länger als bei Antibiotika.

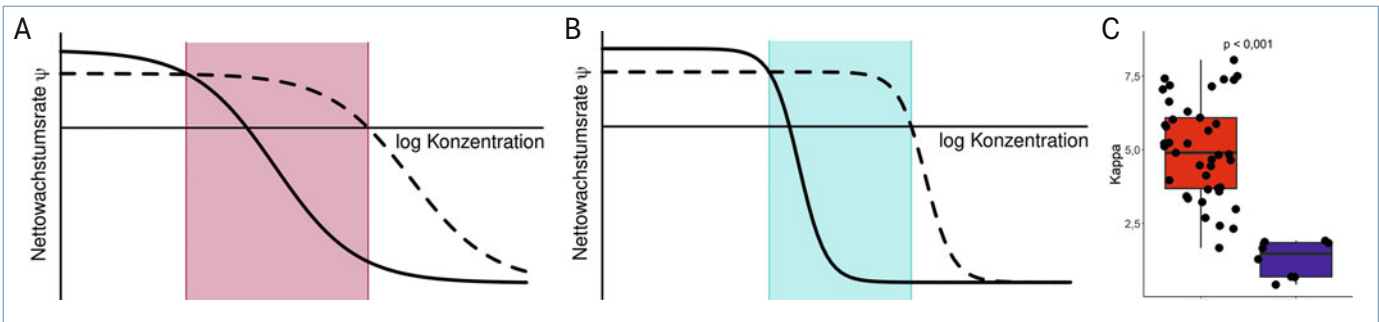
Wir untersuchen, ob es generelle Eigenschaften von AMPs gibt, die die Evolution bakterieller Resistenz gegen AMPs im Vergleich zu Antibiotika reduzieren. Darüber hinaus erforschen wir, wie AMPs im natürlichen Kontext wirken – einerseits, um die Evolution von Insektenimmunsystemen besser zu verstehen und andererseits, um die möglichen Anwendungen von AMPs bei bakteriellen Infektionen nachhaltiger zu gestalten, also die Problematik der Resistenzentwicklung gleich von Anfang an zu berücksichtigen.

Resistenzevolution

Resistenz gegen AMPs und auch gegen viele Antibiotika ist oftmals im Genom codiert. Von verschiedenen Antibiotika ist bekannt, dass sie die Mutationsrate von Bakterien erhöhen können. Dies beruht darauf, dass die Bakterien auf Antibiotikumstress mit der SOS-Antwort oder einer RpoS-vermittelten Stressantwort reagieren. Dies führt zur Reparatur der DNA über alternative Polymerasen, die hohe Fehlerraten haben. Im Gegensatz dazu induzieren AMPs weder den SOS- noch



▲ **Abb. 1:** Antimikrobielle Peptide (AMPs) attackieren meistens die Zelloberfläche und verursachen daher keine erhöhten Mutationsraten, im Gegensatz zu vielen Antibiotika. Dargestellt sind Hemmhöfe für *Escherichia coli* um eine Scheibe, die entweder mit Antibiotika (Positivkontrollen links, *Cip*: Ciprofloxacin, *AP*: Ampicillin) oder mit AMPs (von links: Cecropin, Lysozym, LL-37, Mellitin, Maignin, Pexiganan) getränkt ist. Die Bakterien sind mit einem Reporter ausgestattet, der entweder die Aktivierung des SOS-Systems (oben) oder des *rpoS*-Systems (unten) anzeigt. Nur die Antibiotika aktivieren diese Systeme; dies führt zur Reparatur geschädigter DNA durch alternative Polymerasen mit erhöhter Fehlerrate und erhöht daher die Mutationsrate (verändert nach [3]); AMPs hingegen erhöhen die Mutationsrate nicht.



▲ **Abb. 2:** Die Pharmakodynamik von AMPs und Antibiotika unterscheidet sich [12]. **A, B,** Dargestellt ist das bakterielle Populationswachstum im Verhältnis zur Konzentration der antimikrobiellen Substanzen für Antibiotika (rosa) und AMPs (türkis). Die farbigen Unterlegungen zeigen jeweils die Breite des MSW (*mutant selection window*), also den Konzentrationsbereich, in dem resistente Bakterien bei Antibiotika- bzw. AMP-Einsatz selektiert werden (verändert nach [12]). Der MSW ist bei AMPs deutlich schmaler (türkis). **C,** Die Weite des MSW ist bestimmt durch die Steilheit der pharmakodynamischen Kurve, beschrieben durch Kappa. Die experimentell gemessenen Kappa-Werte für AMPs (rechts, blau) und deren Kombinationen im Vergleich zu den Werten für Antibiotika (links, rot) resultieren in deutlich kleineren MSW für AMPs [7].

den *rpoS*-Pfad (**Abb. 1**, [3]) und dementsprechend erhöhen sich die Mutationsraten nicht.

Die Evolution von Resistenz hängt nicht nur von Mutationsraten, bereits vorhandenen Mutationen und horizontalem Gentransfer sowie der Populationsgröße ab, sondern auch wesentlich vom Selektionsdruck. Aus der Pharmakologie ist das Konzept des MSW (*mutant selection window*) bekannt, jener Konzentrationsbereich, in dem resistente Bakterien gegenüber nichtresistenten einen Überlebensvorteil haben (**Abb. 2**). Hierzu fanden wir, dass AMPs normalerweise wesentlich engere MSWs als Antibiotika haben [4]: Die pharmakodynamische Kurve, die den Zusammenhang von bakteriellem Wachstum (auch negatives Wachstum – wenn mehr Zellen sterben als sich teilen) und antimikrobieller Konzentration beschreibt, wird wesentlich steiler (**Abb. 2**), damit schließt sich das MSW. Das schmale MSW der AMPs hängt vermutlich mit den Mechanismen zusammen, wie AMPs Bakterien töten. Oftmals sind dies Poren, die in der Zellwand oder Zellmembran entstehen [1]. Diese führen auch dazu, dass AMPs wesentlich schneller töten als Antibiotika, nämlich innerhalb von Minuten anstatt Stunden.

In einem weiteren Schritt konnten wir kürzlich zeigen, dass sich auch die Pharmakodynamik selbst evolutiv ändern kann: Bakterien, die resistent werden, haben nicht nur eine erhöhte minimale Hemm-Konzentration (die MHK-Bestimmung ist die Standardmethode, um Resistenz festzustellen), sondern es ändert sich auch der Kappa-Wert, also die Steilheit der pharmakodynamischen Kurve und damit die Weite des MSW [5]. Wie sich diese Änderungen wiederum auf die Dynamik der Resistenzentwicklung auswirken, ist

noch völlig unerforscht. Werden alle oben genannten Faktoren in einem mathematischen Modell integriert, wird deutlich, dass das Risiko der Resistenzentwicklung für AMPs wesentlich geringer ausfällt als das Risiko für Antibiotika (**Abb. 3**, [4]). Unser Modell gibt somit ein gutes Abbild für die Realität und erlaubt daher, Szenarien der Resistenzentwicklung durchzuspielen.

Synergien von AMPs

In natürlichen Situationen, also beispielsweise in der Immunabwehr eines Insekts oder Säugetiers, werden gleichzeitig mehrere AMPs exprimiert. Dies sind oft zehn oder mehr AMPs aus unterschiedlichen Familien [6]. Bei einer Injektion mit *Staphylococcus aureus* in unserem Modelltier, dem Mehlkäfer *Tenebrio molitor*, fanden wir zudem, dass z. B. AMPs exprimiert werden, die *in vitro* nicht gegen Gram-positive Bakterien wie *S. aureus* wirken. Dies ist erstaunlich, denn die Käfer haben Toll- und Imd-Signalfade, die zwischen Gram-positiven und -negativen Bakterien unterscheiden können. Diese Beobachtung legt zwei Schlussfolgerungen nahe: Erstens wirken die AMPs gemeinsam, ohne dass jedes AMP in Isolation eine Wirkung gegen ein bestimmtes Bakterium haben muss. Zweitens zeigt dies, dass die standardisierten *in vitro*-Messungen von AMPs vielleicht zu ungenau sind (ein Problem, das die Antibiotikaforschung auch betrifft).

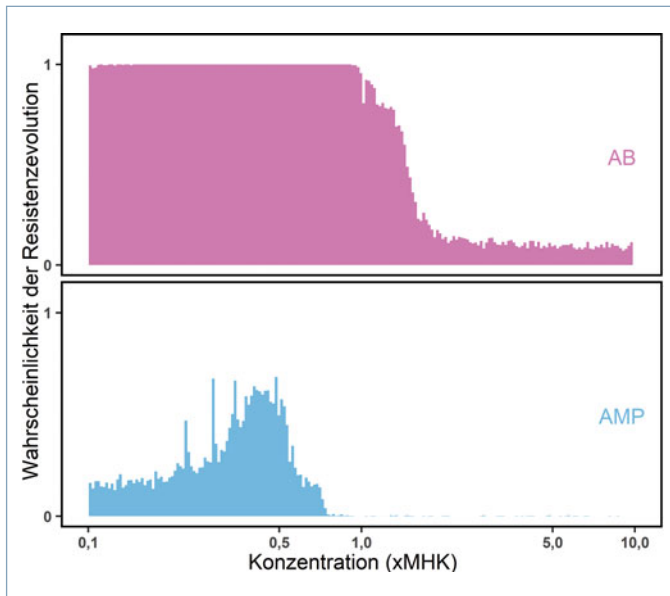
In einer *in vitro*-Studie, in der wir fünf verschiedene AMPs unterschiedlicher Herkunft und Aktivität untersuchten [7], wirkten die meisten Zweifach-Kombinationen synergistisch. Bei Dreifach-Kombinationen war dies sogar noch stärker ausgeprägt [4]. Eine Studie zu Antibiotikakombinationen konnte ebenfalls zeigen, dass mit zunehmender Zahl

an Komponenten die synergistischen Effekte zunahm [8]. Wie diese Interaktionen berechnet und vielleicht auch prognostiziert werden können, ist im Moment unklar und Gegenstand aktiver Forschung [9]. Erst für einige wenige AMPs sind die Synergien von zwei AMPs recht gut untersucht. Antimikrobielle Peptidcocktails haben Vorteile: Synergie erlaubt eine geringere Konzentration eines Peptids; dies reduziert die mögliche Toxizität.

Gefährdet Kreuzresistenz die Wirksamkeit der wirtseigenen AMPs?

Für den medizinischen Einsatz der AMPs sind aktuell etwa 20 in der Erprobung, und mehr als 3.000 beschrieben [10]. Ein mögliches Risiko des Einsatzes von AMPs in der Medizin ist die Entstehung von Kreuzresistenzen: Wenn Resistenz gegen das eingesetzte AMP evolviert, könnten die Bakterien auch gegen die wirtseigenen AMPs, also einen wichtigen Arm der angeborenen Immunabwehr, resistent werden [1], mit möglicherweise dramatischer Konsequenz für den Menschen, aber auch z. B. Millionen Insektenarten. Eine systematische *in vitro*-Studie [11], bei der *Escherichia coli* gegen 15 verschiedene AMPs Resistenz entwickelte, zeigte vor allem Kreuzresistenz, wenn die AMPs ähnliche Wirkmechanismen hatten. Erstaunlicherweise gibt es dazu keine tiefergehenden Studien mit humanen AMPs.

In unserem *T. molitor*-Modell fanden wir, dass *S. aureus*-Stämme, die gegen AMPs des Käfers resistent sind, nicht virulenter waren als nicht-resistente Stämme [12]. Ein möglicher Grund könnte sein, dass die Staphylokokken aufgrund der AMP-Resistenz sensibler gegen andere Effektoren des Käferimmunsystems werden.



◀ **Abb. 3:** Die Wahrscheinlichkeit, dass Bakterien Resistenz entwickeln, wenn sie einem typischen Antibiotikum (oben) ausgesetzt werden, ist wesentlich höher als bei einem typischen AMP (unten). Dieses Simulationsmodell integriert die empirischen Daten zur Pharmakodynamik, zu Mutationsraten und zur Geschwindigkeit des Tötens von Bakterien durch die antimikrobiellen Substanzen (verändert nach [4]).

AMPs anwenden und Resistenz minimieren

Eine Kombination aus dem Wissen um die evolutionäre Diversifikation der AMPs, ihre Aktivität im Zusammenhang mit (synergistischen) Cocktails und die Kenntnisse zur Resistenzentwicklung können hoffentlich dazu beitragen, dass beim Einsatz von AMPs in der Behandlung bakterieller Infektionen die Fehler, die zur derzeitigen Antibiotikakrise geführt haben, vermieden werden können [10]. Eine der vielversprechenden Anwendungen von AMPs könnte dann die Bekämpfung von multiresistenten Bakterien werden.

Danksagung

Wir danken allen Mitgliedern der AG Evolutionsbiologie und unseren Ko-Autoren und Ko-Autorinnen, die an den vorgestellten Arbeiten beteiligt waren, sowie Klaus Reinhardt für Feedback. Wir danken der DFG für die Förderung (SFB 973, FOR 5026). ■

Literatur

- [1] Zasloff M (2002) Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415: 389–395
 [2] Liu Y, Wang Y, Walsh T et al. (2016) Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis* 16: 161–168

- [3] Rodríguez-Rojas A, Makarova O, Rolff J (2014) Antimicrobials, stress and mutagenesis. *PLoS Pathog* 10: e1004445
 [4] Yu G, Baeder D, Regoes R, Rolff J (2018) Predicting drug resistance evolution: insights from antimicrobial peptides and antibiotics. *Proc Roy Soc Lond B* 285: 20172687
 [5] El Shazely B, Yu G, Johnston P, Rolff J (2020) Resistance evolution against antimicrobial peptides in *Staphylococcus aureus* alters pharmacodynamics beyond the MIC. *Front Microbiol* 11: 103
 [6] Makarova O, Rodríguez-Rojas A, Eravci M et al. (2016) Antimicrobial defence and persistent infection in insects revisited. *Phil Trans R Soc B* 371: 20150296
 [7] Yu G, Baeder D, Regoes R, Rolff J (2016) Combination effects of antimicrobial peptides. *Antimicrob Agents Chemother* 60: 1717–1724

- [8] Tekin E, White D, Kang T et al. (2018) Prevalence and patterns of higher-order drug interactions in *Escherichia coli*. *Syst Biol Appl* 4: 31
 [9] Baeder D, Yu G, N. Hozé et al. (2016) Antimicrobial combinations: bliss independence and Loewe additivity derived from mechanistic multi-hit models. *Phil Trans R Soc B* 371: 20150294
 [10] Lazzaro B, Zasloff M, Rolff J (2020) Antimicrobial peptides: application informed by evolution. *Science* 368: eaau5480
 [11] Kintses B, Jangir P, Fekete G et al. (2019) Chemical-genetic profiling reveals cross-resistance and collateral sensitivity between antimicrobial peptides. *Nat Comm* 10: 5731
 [12] El Shazely B, Urbański A, Johnston P, Rolff J (2019) In vivo exposure of insect AMP resistant *Staphylococcus aureus* to an insect immune system. *Insect Biochem Mol Biol* 110: 60–68

Funding note: Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.
Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Jens Rolff
 Evolutionsbiologie
 Institut für Biologie
 Freie Universität Berlin
 Königin-Luise-Straße 1–3
 D-14195 Berlin
 Jens.rolff@fu-berlin.de
www.bcp.fu-berlin.de/en/biologie/arbeitsgruppen/zoologie/ag_rolff

AUTOREN



Alexandro Rodríguez-Rojas

Biologiestudium. 2001–2003 Forscher in F&E am Carlos J. Finlay Impfstoffinstitut, Havanna, Kuba. 2004–2005 Forschungspraktikum, Hospital Univesitario la Paz, Madrid, Spanien. 2006–2010 Promotion an der Universität Complutense Madrid. 2010–2012 Postdoc am Spanischen Nationalen Zentrum für Biotechnologie, Madrid. 2012–2021 Senior Postdoc an der FU Berlin bei Prof. Dr. J. Rolff. Seit 2022 Forschungsgruppenleiter an der Veterinärmedizinischen Universität Wien.



Jens Rolff

Biologiestudium. 1996–1999 Promotion an der TU Braunschweig bei Prof. Dr. G. Rueppell. 1999 Postdoc am Imperial College London, UK, bei Prof. Dr. H. C. J. Godfray. 2000–2003 Postdoc und Marie-Curie Fellow an der University of Sheffield, UK, bei Prof. Dr. M. Siva-Jothy. 2003–2012 NERC Research Fellow, Lecturer and Senior Lecturer, University of Sheffield. Seit 2012 Professor für Evolutionsbiologie an der FU Berlin.