



*Quantitative Relationship Between Antibiotic Exposure and the Acquisition  
and Transmission of Resistance in Bacteria in the Laboratory*

N. Händel

## Samenvatting

De wereldwijde opkomst en verspreiding van antibioticaresistente bacteriën vormen een serieuze bedreiging voor de gezondheidszorg omdat het risico dat een therapie niet aanslaat steeds groter wordt en bovendien de behandelingskosten sterk toenemen. Bacteriën kunnen op drie manieren resistent worden. (1) Door fenotypische aanpassing, bijv. door het aanmaken van meer effluxpompen. (2) Door genetische mutaties, die leiden tot verminderde binding van het antibioticum aan het doelwitenzym, en/of (3) door overdracht van resistentiegenen via bacteriële conjugatie. Om de wereldwijde toename van antibioticaresistente bacteriën tegen te gaan, zijn er dringend nieuwe benaderingswijzen nodig. De ontwikkeling van fundamenteel nieuwe tegenmaatregelen staat of valt met een beter begrip van hoe gevoelige en resistente bacteriën reageren op verschillende antibioticac concentraties en hoe bacteriën er in slagen de bijkomende metabole kosten van resistentieontwikkeling te minimaliseren. Het vereist ook een dieper inzicht in de factoren, die resistentieverwerving beïnvloeden. Ik heb mij daarom in mijn proefschrift vooral ten doel gesteld om onder gecontroleerde omstandigheden en met de darmbacterie *E. coli* als modelorganisme het verband tussen overmatig antibioticagebruik en de ontwikkeling en overdracht van antibioticaresistentie te karakteriseren en te kwantificeren. De met de verwerving van resistentie gepaard gaande genetische en fysiologische veranderingen, die ik in mijn studie heb geïdentificeerd, wijzen er op dat bacteriën op verschillende manieren antibioticaresistentie kunnen verwerven en bovendien compensatiemechanismen kunnen ontwikkelen om de bijbehorende metabole kosten te minimaliseren.

Hoofdstuk 1 beschrijft hoe gedurende de afgelopen zeventig jaar overmatig gebruik en misbruik van antibiotica in bijv. de veefokkerij en in de geneeskunde hebben geleid tot een dramatische, wereldwijde toename in bacteriële resistentie. Dit hoofdstuk laat verder zien dat ruim gebruik van antibiotica niet alleen gepaard gaat met de ontwikkeling van resistentiemechanismen, die bacteriën in staat stellen subletale antibioticac concentraties beter te verdragen, maar ook met de ontwikkeling van resistentiemechanismen, die groei mogelijk maken bij aanvankelijk letale concentraties. Naast moleculaire en fysiologische aanpassingen, die rechtstreeks met resistentieontwikkeling te maken hebben, is er ook sprake van ophoping van een andere klasse van mutaties. Deze helpen bacteriën om de metabole kosten van de resistentieontwikkeling te minimaliseren, waardoor ze kunnen overleven in natuurlijke reservoirs.

In hoofdstuk 2 worden het transcriptieprofiel en de fysiologische eigenschappen gekarakteriseerd van *E. coli* cellen, die resistent zijn geworden tegen amoxicilline. Hoewel gevoelige en resistente cellen niet verschilden in hun energieverbruik, traden er blijvende veranderingen in het transcriptieprofiel op, die wijzen op veranderingen in pH-gevoeligheid en zouttolerantie. Vergelijking van de maximale specifieke groeisnelheid van gevoelige en resistente cellen bij verschillende zuurgraden of verhoogde zoutconcentraties toonde aan, dat antibioticaresistente cellen gevoeliger waren voor belastende milieuomstandigheden. Samengevat, wijzen de resultaten er op, dat resistentieverwerving niet zo zeer meer metabole energie kost, maar het ecologische spectrum verkleint.

Hoofdstuk 3 vergelijkt de transcriptionele respons tegen antibiotica tussen gevoelige cellen en cellen, die resistentie hebben verworven tegen respectievelijk drie antibiotica, die elk behoren tot een verschillende klasse van antibiotica. De gebruikte antibiotica zijn amoxicilline (een  $\beta$ -lactam, bacteriedodend), enrofloxacin (een fluoroquinolone, bacteriedodend) en tetracycline (bacteriostatisch). Gevoelige, wildtype cellen reageren sterk op blootstelling aan subletale antibioticaconcentraties, hetgeen zich uit in een groot aantal differentieel gereguleerde genen. Resistente cellen echter werden gekenmerkt door een beperkt aantal blijvend opgereguleerde of omlaaggereguleerde genen, zelfs in de afwezigheid van een antibioticum, terwijl de expressie van de overige genen slechts beperkte veranderingen vertoonde. Wanneer het antibioticum verwijderd werd, nam het aantal differentieel gereguleerde genen in resistente cellen sterk af zonder dat de resistentie verloren ging. Resistentieverwerving volgt wisselende, evolutionaire wegen, die leiden tot hetzelfde fenotype, maar het uiteindelijke fenotype is gebaseerd op verschillende, resistentieverlenende genetische mutaties. Samengenomen, laten de resultaten van deze studie zien dat de novo resistentie tegen antibiotica tot stand komt door een complexe interactie van cellulaire processen, die zowel aanpassingen in genexpressie als genetische mutaties inhouden.

In hoofdstuk 4 heb de mogelijke bijdrage van een aantal genen in resistentieverwerving onderzocht. Deze heb ik geselecteerd aan de hand van de transcriptieprofielen verkregen met cellen, die resistentie hadden verworven tegen respectievelijk amoxicilline, enrofloxacin en tetracycline (zie hoofdstuk 2 en 3). De resultaten wijzen er op, dat de zogenaamde SOS respons en globale transcriptie-activatoren zoals *gadE* een sleutelrol spelen in de ontwikkeling van antibioticaresistentie. Ik heb verder uitgezocht of suboptimale omgevingsomstandigheden werken als secundaire stressfactoren en als zodanig de snelheid verminderen waarmee cellen antibioticaresistent worden. Verhoogde zoutconcentraties en veranderingen in de zuurgraad vertraagden inderdaad de

aanpassingssnelheid en zouden zodoende een waardevol uitgangspunt kunnen bieden voor de ontwikkeling van nieuwe strategieën om resistentieontwikkeling te bestrijden.

Hoofdstuk 5 richt zich op factoren, die de snelheid beïnvloeden waarmee resistentieverlenende plasmiden via bacteriële conjugatie worden overgedragen. In deze experimenten werd een voedselidolaat van *E. coli* gebruikt, dat een “Extended Spectrum  $\beta$ -Lactamase (ESBL)-plasmide als donor bevatte. Het resistentieverlenende plasmide werd geïdentificeerd als een IncI1 plasmide dat een CTX-M-1  $\beta$ -lactamase gen bevat en zodoende een hoge mate van bescherming tegen  $\beta$ -lactam antibiotica biedt. Overdrachtsexperimenten met plasmidedragende *E. coli* donor cellen en de  $\beta$ -lactamgevoelige *E. coli* MG1655 laboratoriumstam als acceptor toonden aan dat plasmide overdracht toenam bij een toename in celdichtheid, energiebeschikbaarheid, antibiotica concentratie en groeisnelheid.

Hoofdstuk 6 behelst de identificatie en bespreking van gemeenschappelijke, drijvende factoren achter de verwerving en overdracht van antibioticaresistentie, zoals beschikbaarheid van voedingsstoffen en de metabole kosten van resistentie. De voorafgaande hoofdstukken hebben laten zien dat het antibioticapeil in het milieu moet dalen om de novo resistentieverwerving in bacteriën te voorkomen. Als antibiotica noodzakelijk zijn, moet streng worden vast gehouden aan medische protocollen, die korte maar intense antibioticatherapieën voorschrijven. De nieuwe inzichten, die in dit proefschrift verkregen zijn, kunnen worden gebruikt om de huidige behandelingsstrategieën te optimaliseren teneinde de ontwikkeling en verspreiding van antibioticaresistentie in bacteriën onder controle te brengen.