



UPPSALA
UNIVERSITET

Mycobacterium tuberculosis

-en avundsvärt framgångsrik bakterie

Malin Ericstam

Independent Project in Biology
Självständigt arbete i biologi, 15 hp, höstterminen 2010
Institutionen för biologisk grundutbildning, Uppsala universitet

***Mycobacterium tuberculosis* – en avundsvärt framgångsrik bakterie**

Malin Ericstam

Självständigt arbete i biologi 2010

Sammandrag

Mycobacterium tuberculosis orsakar sjukdomen tuberkulos. Tuberkulos var, tack vare antibiotikans ankomst, på nedgång men i och med utvecklandet av resistens och i kombination med HIV/AIDS har problemet idag ökat igen och sjukdomen är en av de största i världen. *M. tuberculosis* har inneboende resistensmekanismer i sin ovanligt ogenomträngliga cellvägg, effluxpumpar och subpopulationer av uthålliga och vilande bakterier. Förvärvad resistens sker inte genom genöverföring utan endast genom anhopning av enskilda mutationer. Tuberkulosbehandling är på grund av dessa, inneboende och förvärvade, orsaker svår och framförallt långvarig. Hoppet kanske dock väcks av de första nya tuberkulosmedicinerna på över 40 år, vilka eventuellt också kan förkorta behandlingstiden.

Inledning

I tusentals år har människor dött i tuberkulos och tyvärr dör människor än idag av sjukdomen (Hershkovitz *et al.* 2008). Man tror att upp emot två miljoner dör varje år och att en tredjedel av världens befolkning bär på bakterien *M. tuberculosis* som orsakar tuberkulos (Smittskyddsinstitutet 2010, WHO 2010a). Även om en tredjedel av befolkningen bär på bakterien utvecklar inte alla sjukdomen. Mellan 5-10 % av de infekterade utvecklar aktiv tuberkulos medan resten har så kallad latent tuberkulos (Smittskyddsinstitutet 2010, WHO 2010a). Av dem som utvecklar aktiv tuberkulos gör de flesta det några år efter det att de har blivit infekterade av bakterien men risken för återaktivering av vilande bakterier i lungorna finns kvar hela livet (De Backer *et al.* 2006). Speciellt vid immunsänkande sjukdomar som HIV/AIDS ökar risken för aktivering av bakterierna till aktiv sjukdom (De Becker *et al.* 2006, Smittskyddsinstitutet 2010). I och med antibiotikans upptäckt kunde tuberkulos behandlas och man trodde då att problemet var löst (Carlson & Linder 2008). Behandlingen är dock inte problemfri och tar lång tid (Russell *et al.* 2010). Alarmerande är också att resistens mot alla förstahandpreparat och flera andrahandpreparat för behandling av *M. tuberculosis* ökar (WHO 2010 a). Så trots antibiotika är tuberkulos ett stort problem än idag.

Tuberkulos sprids via luften och det kan räcka med så lite som en bakterie för infektion (Russell *et al.* 2010). När en person med aktiv tuberkulos i lungorna till exempel hostar, pratar

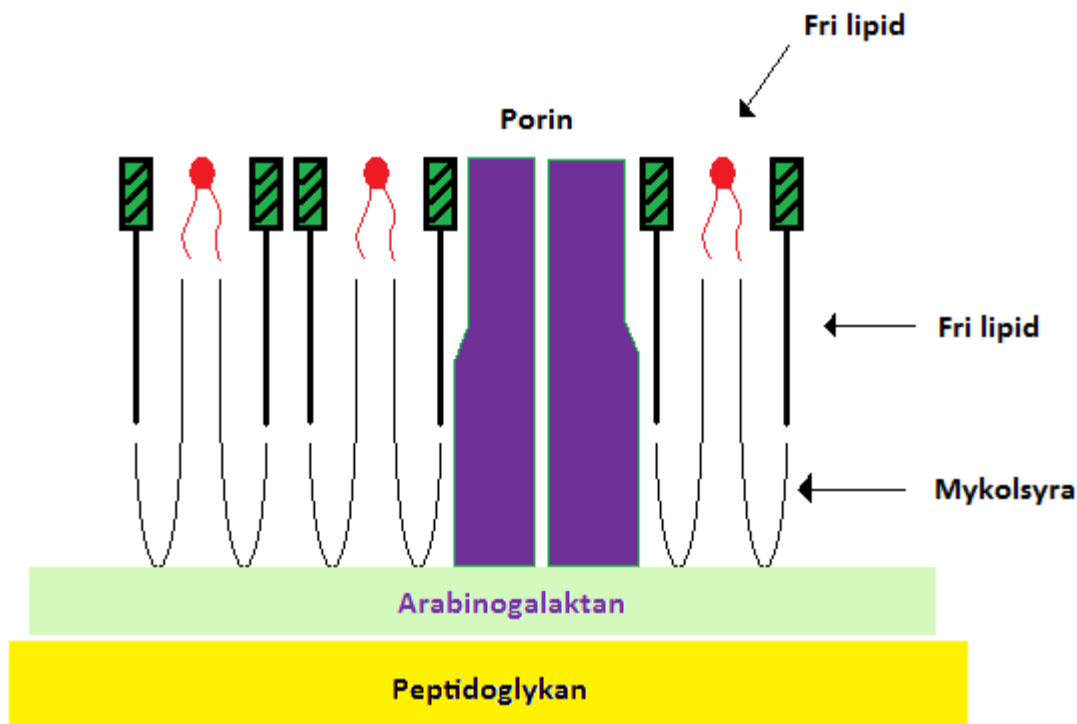
eller nyser sprids små droppar i luften och i dem medföljer även *M. tuberculosis* (WHO 2010a). En person inandas sedan bakterien och eftersom bakterien kräver mycket syre drabbar sjukdomen främst lungorna, men kan även spridas i resten av kroppen (Flynn & Chan 2001, Smittskyddsinstitutet 2010). När bakterien når lungorna fagocyteras den av makrofagerna i alveolerna (Bloom & Murray 1992, Russell *et al.* 2010). Makrofagen tar sig sedan in i epitelet i lungorna (Russell *et al.* 2010). *M. tuberculosis* förhindrar fusion mellan fagosom och lysosom i makrofagen och bakterien elimineras därför inte av kroppen (Flynn & Chan 2001). Bakterien kan istället leva och föröka sig skyddat inne i makrofagen (Russell *et al.* 2010). Mononukleära celler rekryteras sedan av den efterföljande inflammationen, vilket ger nya celler för bakterien att leva fritt i och cellerna blir också byggstenar för granulomat. Granulomat är karakteristiskt för sjukdomen (Russell *et al.* 2010). Makrofagerna differentierar sig sedan till specialiserade celltyper och omringas av tuberkulosspecifika lymfocyter, som i sig omringas av ett kalcifierat yttre (Bloom & Murray 1992, Russell *et al.* 2010). Bakterierna blir då instängda och troligen avstannar oftast replikationen vilket ger ett stabilt antal bakterier (Russell *et al.* 2010). Latent tuberkulos är just bakterier inkapslade av granulomat vilka bildas av kroppens immunförsvar. Granulomat har även blivit vaskulariserat och celler rekryteras aktivt till det (Russell *et al.* 2010). Utvecklas aktiv sjukdom stängs inte bakterierna inne i granulomat längre utan granulomat spricker och bakterier kan spridas från personens luftvägar och smitta andra (Russell *et al.* 2010). Hur *M. tuberculosis* överlever i makrofager och drar nytta av kroppens immunsvär är av stort intresse men ämnet utvecklas inte mer i denna översiktsartikel på grund av platsbrist. Som start för ytterligare information rekommenderas exempelvis Russell och kollegors översiktsartikel ”Tuberculosis: What we don’t know can, and does, hurt us” från 2010.

M. tuberculosis är en mycket långsamt växande grampositiv bakterie (Flynn och Chan 2001). Denna översiktsartikel ska titta närmare på varför tuberkulos är så svårbehandlat och hur resistensutveckling sker hos *M. tuberculosis*? Vilka inneboende och förvärvade mekanismer har *M. tuberculosis* för att utveckla resistens mot alla dessa preparat? Eftersom tuberkulos är ett så stort problem är det viktigt att få svar på dessa frågor för att hitta nya behandlingsvägar. Hur långt har egentligen forskningen kommit med nya mediciner?

Unik cellvägg

M. tuberculosis har en unik cellvägg som är ovanligt ogenomtränglig, och detta bidrar till resistensutvecklingen (Figur 1.) (Jarlier & Nikaido 1994). Cellväggen består av peptidoglykan men peptidoglykanet består inte av de vanliga N-acetylmuraminsyra (NAM) och N-acetylglukosamin (NAG) utan av N-glykolylmuraminsyra (NGM) samt NAG (Jarlier & Nikaido 1994, Brennan 2003, Carlson & Linder 2008). Ovanligt är också att upp till 60 % av cellväggens vikt består av lipider, majoriteten av dessa lipider är den ovanligt långa mykolsyan på 60-90 kolatomer (Jarlier & Nikaido 1994). Peptidoglykan är via en fosfodiesterbinding bunden till arabinogalaktan (Jarlier & Nikaido 1994). Arabinosdelen är i

cirka 10 % av fallen utbytt mot mykolsyra (Jarlier & Nikaido 1994). Det finns också lipider som inte är kovalent bundna såsom trehalos-innehållande glykolipider (cord factor) och glykopeptidolipider av olika längd som kompletterar mykolsyran (Brennan 2003). Olika grad av tvärbindingar finns mellan diaminosyrorna i NAM hos de flesta bakterier (Carlson & Linder 2008). Eftersom *M. tuberculosis* har NGM istället för NAM bildas inte bara tvärbryggor mellan diaminosyrorna utan också mellan en dipeptid och D-alanin (Brennan 2003). Tillsammans bildar peptidoglykan, arabinogalaktan och mykolsyra ett kovalent bundet komplex (mAGP-komplex) som bildar cellväggens kärna, sedan tillkommer fria lipider och proteiner. I och med att mykolsyran är kovalent bundet i mAGP-komplexet kan mykolsyran inte röra sig i sidled vilket ger ett mycket ogenomträngligt membran för *M. tuberculosis* (Nikaido 1994, Brennan 2003). Eftersom mykolsyran som bygger upp yttermembranet är exceptionellt lång blir membranet också ovanligt tjockt, tjockleken i sig bidrar till ogenomträngligheten (Niederweis 2003). Mykolsyra är på grund av sina sidokedjor även mycket hydrofob vilket gör det svårt för vattenlösliga ämnen att tränga in i cellväggen. På grund av detta kan *M. tuberculosis* inte gramfärgas utan syrafast färgning får istället användas (Carlson & Linder 2008).



Figur 1. Cellvägg hos *M. tuberculosis*. De fria lipiderna är trehalos-innehållande glykolipider och glykopeptidolipider av olika längd, för att komplettera mykolsyran (Figur omritad efter Jarlier & Nikaido 1994).

Antibiotika och resistens

Dagens sjukvårdsstandard är beroende av antibiotikans selektiva verkan på bakterier (Sköld 2006, Carlson & Linder 2008). Antibiotika kan sägas verka på fyra olika sätt (Carlson & Linder 2008). Det kan verka på cellväggssyntes, proteinsyntes, nukleinsyrasyntes eller folsyrametabolism. Isoniazid (INH), rifampicin (RIF), pyrazinamid (PZA), etambutol (EMB) och streptomycin (SM) är förstahandspreparat vid behandling av tuberkulos (Shi & Sugawara 2010). Om det uppstår resistens eller patienten inte tål en eller flera av dessa mediciner kompletteras dessa med andrahandsval, vilka dock har sämre effekt eller värre biverkningar (RAF 2008, Shi & Sugawara 2010, WHO 2010b). Andrahandsvalen är para-amino-salicylsyra (PAS), kanamycin, fluorokinoloner (FQ), capreomycin, ethionamid, amikacin och cykloserin. INH, PZA, EMB, PAS och ethionamid verkar specifikt mot *M. tuberculosis* eller andra mykobakterier, vilket ger en specifik verkan och resistensutveckling för dessa preparat på just *M. tuberculosis*. Antibiotika med bredare verkan såsom RIF, SM, kanamycin, FQ, capreomycin, amikacin och cykloserin har samma verkan och resistensutveckling även i andra bakterier, förutom *M. tuberculosis* (Zhang 2005).

Resistensutvecklingen är ett stort hot mot sjukvårdsstandarden och tuberkulos är ett oroväckande exempel (Sköld 2006). Resistens kan också delas upp i huvudmekanismer (Li & Nikaido 2009). Medicinen kan modifieras, inaktiveras eller misslyckas att aktiveras till den aktivt verkande molekylen. Målet för antibiotikan kan ändras eller ackumulering av medicinen minska på grund av minskad permeabilitet eller ökat utflöde. Resistens kan antingen vara en naturlig eller förvärvad egenskap hos bakterien och flera mekanismer kan verka synergistiskt för att förstärka resistens (De Rossi *et al.* 2005). Multiresistenta *M. tuberculosis* är resistenta mot åtminstone INH och RIF (WHO 2010a). Multiresistenta stammar går att behandla men det kan ta upp emot två år och eftersom behandlingen också sker med andrahandspreparat kan flera biverkningar uppkomma (WHO 2010a). På senare tid har även extremt multiresistenta stammar utvecklats, vilket är stammar, som förutom resistens mot INH och RIF, också är resistenta mot en fluorokinolon och minst ett injicerbart andrahandspreparat, så som amikacin, kanamycin och/eller capreomycin (WHO 2010b). 3,6 % av tuberkulosfallen i världen rapporteras av WHO (2010b) vara multiresistenta, av dessa är i sin tur 5,4 % extremt multiresistenta.

Specifika förvärvade resistensmekanismer

Förvärvat försvar kan fås antingen genom mutation eller genom genöverföring av resistensgener. Hos Mykobakterier känner man inte till någon genöverföring mellan bakterier (Shinnick *et al.* 1995). Resistensutvecklingen har därför förvärvats genom ackumulation av enskilda mutationer (Morris & Rouse 1996, Wade & Zhang 2004, De Rossi *et al.* 2005). Nedan beskrivs de vanligaste tuberkulospreparaten, deras verkningsmekanism och resistensutvecklingsmekanismer (Tabell 1.).

Tabell 1. Tuberkulosmedicinens mål vid verkan samt gener involverade i resistansutveckling, oftast på grund av mutation.

Medicin	Verkningsmekanism	Gen involverad i resistansutveckling
Isoniazid	Mykolsyrasyntes	<i>inhA, katG</i>
Rifampicin	DNA transkription	<i>rpoB</i>
Pyrazinamid	Membrantransport eller fettsyrsyntes	<i>pncA</i>
Etambutol	Arabinogalaktansyntes	<i>embCAB operonet</i>
Streptomycin	Proteinsyntes	<i>rpsL, rrs, gidB</i>
Fluorokinolon	Supercoiling	<i>gyrA, gyrB</i>
Ethionamid	Mykolsyrasyntes	<i>inhA, eraR</i>
Makrolider	Proteinsyntes	<i>ermMt</i>
Betalaktamer	Cellväggssyntes	<i>blaC</i>

Tabellen har skapats med hjälp av följande referenser: Takayama *et al.* 1972, Takayama & Kilburn 1989, Zhang *et al.* 1992, Banerjee *et al.* 1994, Scorpio & Zhang 1996, DeBarber *et al.* 2000, Ginsburg *et al.* 2003, Burianková *et al.* 2004, Wade & Zhang 2004, Flores *et al.* 2005, Zhang 2005, Plinke *et al.* 2006, Sköld 2006, Vilcheze *et al.* 2006, Ngo *et al.* 2007, Okamoto *et al.* 2007, RAF 2008.

Isoniazid (INH)

Katalas-peroxidase skyddar *M. tuberculosis* mot oxider men aktiverar också INH till den aktiva och mycket reaktiva föreningen isonikotinsyrehydrazid, som främst påverkar mykolsyrasyntesen (Takayama *et al.* 1972, Sköld 2006). Vid mutation i *katG*, genen som kodar för katalas-peroxidase, uppstår resistens på grund av ett mindre effektivt enzym (Zhang *et al.* 1992). Om enzymet är ineffektivt aktiveras medicinen sämre och kan inte verka på acylbärrar-proteinreduktas, kodat av *inhA* (Banerjee *et al.* 1994, Zhang 2005, RAF 2008). Vid mutation i *inhA* uppstår också resistens mot INH (Vilcheze *et al.* 2006). Detta eftersom målet är detta enzym involverat i mykolsyrasyntesen och via mutation i *inhA* förändras enzymet. INH verkar endast mot aktivt metaboliserande bakterier (Zhang 2005). Mutation i *katG* är den vanligaste orsaken till resistens men det finns flera mindre vanliga orsaker och även resistentastammar utan förklarade mekanismer (Wade & Zhang 2004).

Rifampicin (RIF)

RIF binder till β -underenheten i RNA-polymeras vilket förhindrar RNA-syntes och därmed transkription av DNA (Sköld 2006). Resistens mot RIF orsakas i 96 % av fallen av en

mutation i *rpoB* som kodar för β -underenheten hos *M. tuberculosis* stammar (Wade & Zhang 2004, RAF 2008). RIF dödar framförallt aktivt metaboliserande bakterier men till viss del även äldre vilande bakterier (Wade & Zhang 2004).

Pyrazinamid (PZA)

PZA tros antingen verka genom att inhibera fettsyrasyntetas 1 som krävs för fettsyrasyntes eller genom att påverka membrantransport (Ngo *et al.* 2007, RAF 2008). PZA måste för att ge verkan aktiveras till pyrazinoinsyra (POA) av pyrazinamidas, sker därför mutation i *pncA*, genen som kodar för pyrazinamidas ges resistens (Scorpio & Zhang 1996, Wade & Zhang 2004). 97 % av de PZA-resistenta stammarna har en mutation i *pncA* (Scorpio & Zhang 1996). Antalet olika mutationer i *pncA* är ovanligt många. Förklaringen till detta kan finnas i att genen inte är livsnödvändig, vilket inte ger samma trade-off (kompromiss) vid resistensutveckling (Wade & Zhang 2004). PZA omvandlas till POA vid låga pH och verkar därför bäst under låga pH (Wade & Zhang 2004). Raynaud och kollegor (1999) har sett att PZA tas upp i cellen via en ATP driven mekanism, denna mekanism har från början troligen utvecklats för att ta upp nikotinamid. Raynaud och kollegor (1999) visade också att resistens kan uppstå vid försämrat upptag av PZA. PZA verkar framförallt på äldre vilande bakterier, vilket gör den bra att ha i antibiotikackoktailen då den kan förkorta behandlingstiden (Zhang *et al.* 2002).

Etambutol (EMB)

EMB stör arabinogalaktansyntesen och det troliga målet är arabinosyltransferas kodat av *embB* (Takayama & Kilburn 1989, Zhang 2005). Majoriteten av EMB-resistenta bakterier har en mutation i *embCAB*-operonet, framförallt i *embB* (Wade & Zhang 2004, Plinke *et al.* 2006, RAF 2008). EMB verkar endast på aktivt delande bakterier (Zhang 2005).

Streptomycin (SM)

SM verkar genom att binda till 30S-subenheten i ribosomen, detta inhiberar proteinsyntesen eftersom mRNA läses felaktigt (Sköld 2006). Vid mutation i *rpsL* eller *rrs*, som kodar för S12-proteinet respektive 16S-proteinet, uppstår resistens. Mutationer i *rpsL* och *rrs* svarar för 70-75 % av isolerade streptomycinresistenta stammar (Wade & Zhang 2004). Resistens vid låga koncentrationer av streptomycin verkar till största delen bero på mutation i *gidB* som kodar för ett metyltransferas (Okamoto *et al.* 2007). Vid mutation kan metyltransferaset inte längre metylera rRNA och resistens uppkommer. SM var den första tuberkulosmedicinen och då den inte gavs tillsammans med annan antibiotika uppstod hög grad av resistensutveckling (Wade & Zhang 2004). Aktivt delande bakterier är troligen de enda som påverkas av SM (Wade & Zhang 2004).

Fluorokinolon (FQ)

FQs mål i cellen är DNA-gyras, vilket förhindrar supercoiling (superspiralisering) av DNA (Sköld 2006). Resistens beror främst på mutation i *gyrA* men vid mutation i *gyrA* och *gyrB* ges högre resistens och multipla mutationer i *gyrA* ger högst resistens (Ginsburg *et al.* 2003). Resistens för en FQ kan ge korsresistens för andra FQ (Wade & Zhang 2004).

Ethionamid

Ethionamid måste aktiveras av monooxygenas/EtaA för att verka och efter flera aktiveringssteg bildas en produkt snarlik isonikotinsyrehydrazid (DeBarber *et al.* 2000, Wade & Zhang 2004). Ethionamidprodukten inhiberar sedan, precis som INH, acylbärrarproteinreduktas och stör mykolsyrasyntesen (DeBarber *et al.* 2000). Resistens kan uppkomma vid induktion av EtaR som reglerar *etaA* negativt, men om EtaR istället induceras ges hypersensivitet (DeBarber *et al.* 2000). Resistens kan liksom med INH även utvecklas vid mutation av *inhA*, vilket är logiskt med tanke på att de aktiva produkterna från INH och ethionamid är snarlika (Banerjee *et al.* 1994). Ethionamid är ett andrahandspreparat men verkar även mot multiresistenta stammar (Wade & Zhang 2004).

Inneboende resistensmekanism

Det naturliga försvaret hos *M. tuberculosis* tros dels bero på den unika cellväggen som en ogenomtränglig barriär och dels på aktivt utpumpande av specifika eller strukturellt olika antibiotika (Ryan *et al.* 2001, De Rossi *et al.* 2005). Beror resistensutvecklingen på en inneboende egenskap är alla bakterier inom arten, till exempel *M. tuberculosis*, resistent såvida inte en mutation åt andra hållet sker (De Rossi *et al.* 2005). Även om *M. tuberculosis* cellvägg är så pass ogenomtränglig så kommer en viss mängd av små molekyler ändå nå cytoplasman (Nikaido 1994). Då kompletterar och/eller förstärker effluxpumpar resistensutvecklingen och en stor del av den resistens som inte förklaras med mutationer kan förklaras med effluxpumpar (Wade & Zhang 2004). En inneboende mekanism för resistens är den tidigare förklarade ogenomträngliga cellväggen vilken därför inte diskuteras vidare.

Specifikt inneboende resistens mekanism

Makrolider verkar genom att binda till 23S-RNA kedjan i 50S-partikeln i ribosomen och proteinsyntes hämmas då (Sköld 2006). ErmMt är ett rRNA metyltransferas som metylerar en adeninrest i 23S-RNA kedjan vilket ger resistens för makrolider (Tabell 1.) (Burianková *et al.* 2004, Sköld 2006). Linkosamider och streptograminer är två antibiotika som trots stora strukturella olikheter har samma verkan och resistensutveckling som makrolider (Sköld 2006). Genom att *M. tuberculosis* har enzymet ErmMt ges därför inte bara resistens för makrolider utan också för linkosamider och streptograminer (Burianková *et al.* 2004).

Betalaktamer är ineffektiva mot *M.tuberculosis* då de snabbt hydrolyseras av BlaC, en ambler-betalaktamas, som kodas av *blaC*. Flores och kollegor (2005) har i försök slagit ut *blaC* och då blev *M. tuberculosis* mer känslig för betalaktamer (Tabell 1.).

Effluxpumpar

Effluxpumpar är mebranbundna proteiner som aktivt pumpar ut ämnen, däribland antibiotika (Nikaido 1994, De Rossi *et al.* 2005). Effluxpumparna är oftast inte specifika utan verkar mot ett brett spektrum av ämnen och antibiotika vilket möjliggör för bakterien att undgå antibiotikabehandlingen (Nikaido 1994, De Rossi *et al.* 2005). Resistens via effluxpumpar kan ske genom mutation i gener som reglerar effluxpumparna, vilket ger induktion av effluxpumpen och effektivare utpumpning eller induktion på transkription via antibiotika (De Rossi *et al.* 2005).

Jiang och kollegor undersökte 2008 om induktion, via INH och RIF, av fem effluxpumpar kunde resultera i resistens på 1499, en vanlig stam i Kina. De fann att *Rv0783c* hade en mycket högre aktivitet än de fyra andra effluxpumparna, men inducerades inte av någon av medicinerna. Möjligen är *Rv0738c* en inneboende resistensmekanism, genom konstant utpumpning, men vidare försök behövs. *Rv1410c* och *Rv1258c*, som kodar för P55- respektive Tap-proteinerna, inducerades av båda medicinerna vilket kan vara en mekanism bakom resistens för dessa mediciner. Även *Rv1819c* och *Rv2136c* inducerades men bara av INH respektive rifampicin. Jiang och kollegor drog således slutsatsen att inducering av effluxpumpar kan vara en mekanism involverad i multiresistens, kanske både genom inneboende och genom förvärvad resistens (Jiang *et al.* 2008).

P55-effluxpumpen styrs av membranpotentialen och är viktig för tillväxt och vid oxidativt stress. Den har också en funktion i utpumpningen av ett brett spektrum av mediciner såsom rifampicin, vilket ger naturlig resistens. Vid mutation i genen *Rv1410c* som kodar för P55-pumpen var bakterien mer känslig för bland annat rifampicin (Silva *et al.* 2001, Ramón-García *et al.* 2009).

Försök har påvisat att vid behandling med etambutol uppstod resistens mot etambutol och INH (Srivastava *et al.* 2010). Detta kan förklaras med att ett antibiotikum kan inducera en effluxpump med brett spektrum. Det kan också förklaras med att antibiotikumet inducerar inte bara en utan flera effluxpumpar (Srivastava *et al.* 2010). Så har till exempel visats för *whiB7* vid tetracyklinbehandling (Morris *et al.* 2005, Srivastava *et al.* 2010). *whiB7* är en gen som reglerar flera antibiotikaresistensgener: *Rv1258* som kodar för en Tap-liknande effluxpump som ger resistens mot tetracyklin, *Rv1273* som kodar för en ABC-transportör för makrolider samt *erm* som kan ge resistens mot makrolider, linokosamider och streptograminer (Aínsa *et al.* 1998, Morris *et al.* 2005, Srivastava *et al.* 2010). *whiB7* inducerades av låga doser av antibiotika men också av fettsyror (Morris *et al.* 2005). *M. tuberculosis* delar *whiB7*-genen med besläktade *Streptomyces* som producerar mycket av den antibiotika som används idag (Morris *et al.* 2005).

En viktig försvarsmekanism hos *M. tuberculosis* verkar således vara att effluxpumpar, som kan transportera ämnen med olika struktur ut ur cellen, induceras av antibiotika (Srivastava *et al.* 2010). Srivastava och kollegor (2010) föreslog, med sina egna och andras experiment bakom sig, en modell för multiresistens hos *M. tuberculosis*. Ett antibiotikum inducerar en effluxpump vilket leder till viss resistens. Bakterien har då större möjlighet och längre tid på sig att replikera sig själv vilket ger möjlighet till en mutation resulterande i specifik resistens. Denna specifika mutation ger troligen en lönsammare trade-off för bakterien, vilket kan betyda att resistens för mer än en antibiotika inte bara uppstår via multipla mutationer utan via en effluxpump som transporterar mer än ett antibiotikum. Modellen har inte bevisats men även om så skulle ske utesluter det inte andra mekanismer. Andra mekanismer kan exempelvis vara mutationer i gener involverade i DNA reparation, vilket kan leda till hypermutationsutveckling.

Oförklarade resistensmekanismer

McCune och kollegor (1956) behandlade *M. tuberculosis* i möss med mediciner enskilt och i olika kombinationer. Trots att det såg ut som om bakterierna eliminerades överlevde vissa bakterier behandlingen, men vid vidare in vitro-behandling var dessa bakterier ändå känsliga för INH och PZA. Bakterierna hade alltså inte överlevt på grund av mutationsresistens utan resistensmekanismen är okänd. Förutom dessa vilande bakterier kan även okända resistensmekanismer hos *M. tuberculosis* ses hos så kallade uthålliga bakterier (Wade & Zhang 2004). Dessa uthålliga bakterier överlever trots behandling i den exponentiella tillväxtfasen. Troligen spelar dessa okända resistensmekanismer in i den långvariga behandlingen av tuberkulos (Wade & Zhang 2004).

Framtidens tuberkulosmediciner?

Inga nya mediciner har utvecklats mot tuberkulos på fyrtio år men med ökad forskning hoppas man att nya och snabbare mediciner snart ska komma (Zhang 2005). Inga mediciner för vilande bakterier finns heller idag vilket hade varit ett stort framsteg i behandlingen av tuberkulos (Zhang 2005).

PA-824 (Nitroimidazo-oxazine) genomgår fas II-medicinska prövningar (TB alliance 2010). Preparatet har en unik mekanism som påverkar biosyntesen av lipider i cellväggen och måste aktiveras till den aktiva molekyl. Aktiviteten hos PA-824 ser ut att motsvara INH och RIF men preparatet tros även verka på resistentastammar och icke replikerande subpopulationer. Inga farliga bieffekter har upptäckts och inte heller någon korsresistens. PA-824 är en medicin som ger hopp om att inte bara kunna behandla multiresistentastammar och vilande bakterier utan även om att kunna förkorta behandlingstiden. OPC-67683 (Nitro-dihydro-imidazooxazole) är strukturellt besläktad med PA-824 och genomgår även det fas II-tester. OPC-67683 ser också

ut att ha hög aktivitet mot multiresistenta stammar och utan farliga bieffekter (Zhang 2005, Shi & Sugawara 2010).

TMC 207 (Diaryl quinoline) genomgår likaså den fas II-tester (TB alliance 2010). TMC 207 verkar på det helt nya målet F0F1-proton ATP-syntas, vilket troligen är ett livsnödvändigt enzym för *M. tuberculosis*. Medicinen kan antagligen ge en kortare behandlingstid men resistens har setts vid mutation i *atpE* vilket kodar för en subenhet i F0F1-proton ATP-syntaset. Resistensmekanismer som varken kan förklaras av mutation i F0- eller F1-ATP-syntasen måste dock också finnas. Synergism med PZA har setts. TMC 207 har lång halveringstid och tros kunna förkorta behandlingstiden om det godkänns som tuberkulosmedicin. Några farliga bieffekter verkar inte finnas men illamående har setts (Shi & Sugawara 2010).

Moxifloxacin (MXF) och gatifloxacin är fluorokinoloner som genomgår fas III-medicinska tester. Då de är fluorokinoloner verkar de genom att inhibera DNA-gyras vilket förhindrar supercoiling. Man har sett korsresistens mellan de båda preparaten men inte med andra mediciner. Aktiviteten överensstämmer med INH och en kombination av MXF-RIF-PZA hade större verkan än INH-RIF-PZA. MXF verkar troligen därför på subpopulationer som inte påverkas av INH, detsamma är även troligt för RIF (Zhang 2005, Shi & Sugawara 2010).

SQ109 är ett derivat från etambutol men med ungefär samma aktivitet som INH, alltså högre än etambutol. Preparatet verkar ha synergistisk effekt med RIF (även på RIF-resistenta stammar) och INH, additiv effekt med streptomycin men verkar inte påverka effekten av EMB och PZA. Medicinen är under medicinsk prövning (Shi & Sugawara 2010).

Linezolid är ett preparat som blivit godkänt för behandling av grampositiva bakterier men ännu inte för tuberkulos. Preparatet, som utvecklats av Pharmacia, binder till 50S-enheten och hindrar proteinsyntesen. Denna inhibition av ribosomal proteinsyntes är en unik verkningsmekanism. Bioavilibiliteten är hög men vissa bieffekter, såsom anemi, har setts (Zhang 2005, Sugawara 2010).

Diskussion

Det vanligaste sättet för bakterier att förvärva resistens är via genöverföring och de flesta bakterier har relativt nyförvärvat DNA i sitt genom (Normark & Normark 2002, Alekshun & Levy 2007). Ovanligt är därför att genöverföring hos *M. tuberculosis* verkar vara av minimal betydelse, om ens det, vid resistensutveckling (Shinnick *et al.* 1995). Ackumulering av enskilda specifika mutationer är istället bakteriens sätt att förvärva resistens (Morris & Rouse 1996, Wade & Zhang 2004, De Rossi *et al.* 2005). Eftersom mutationer ackumulerats på detta sätt borde forskning mot nya mediciner fokusera på helt nya mål. Exempelvis TMC207, som verkar på det nyligen identifierade målet F0F1-proton ATP-syntas, tycks lovande.

Genöverföring är ovanligt inte bara hos *M. tuberculosis* utan hos alla Aktinobakterier. Några

exempel på genöverföring finns dock. Diskussion har även förts huruvida horisontell genöverföring, av ett virulensoperon viktigt vid patogenes, har skett hos *Mycobacterium prototuberculosis*, en anfader till *M. tuberculosis* (Ventura *et al.* 2007). Detta enda exempel på möjlig genöverföring hos *M. tuberculosis* visar på en fördel ur människans synvinkel. Endast resistens som förvärvas via genöverföring kan spridas vidare till andra bakterier (Normark & Normark 2002). *M. tuberculosis* imponerande sätt att förvärva resistens via mutationer, istället för via genöverföring, kan därför ses som fördelaktigt då denna framgångsrika bakterie troligen inte för dessa gener vidare till andra bakterier.

Viktigt att tänka på är hur mutationen som ger resistens uppstår (Normark & Normark 2002). Uppstår resistens via inaktivering av en gen är mutationsfrekvensen högre än om genen måste ändras till att fortfarande koda för ett protein med samma funktion. Den ytterst höga mutationsfrekvensen i *pncA* kan med detta resonemang förklaras med att genen inte är livsnödvändig. Även om en fungerande genprodukt måste bildas, kanske en mindre funktionell produkt tolereras som trade-off. Resistens hos *M. tuberculosis* sker framförallt genom modifiering av målorganet eller enzymet som aktiverar antibiotikan. Då målorganet och enzymet oftast är livsnödvändigt borde det betyda en lägre mutationsfrekvens med ovan resonemang. Att *M. tuberculosis* trots detta har en så pass hög mutationsfrekvens tyder på avsevärd framgång. Hur ofta mutation för resistensutveckling sker beror också på bakterien och om den har en mutationsbenägen fenotyp (Normark & Normark 2002). Kan *M. tuberculosis* vara extra mutationsbenägen på grund av ett sämre DNA-reparationssystem? Detta kan vara en bidragande faktor till så pass många ackumulerade enskilda mutationer. Den höga graden av multiresistens kan också kopplas till *M. tuberculosis* höga mutationsfrekvens. Hos *M. tuberculosis* ges multiresistens av enskilda multipla mutationer istället för genöverföring av ett kluster av gener. Fluorokinolon är ett exempel på hur stegvis ökning av resistens sker via flera efterföljande mutationer som även kan ses hos *M. tuberculosis*. Detta visar att man måste se allvarligt även på lägre resistensutveckling då den successivt kan leda till en högre (Normark & Normark 2002).

Även om de flesta bakterier har effluxpumpar ger detta i sig inget inneboende försvar, utan oftast behövs en mutation vilket inducerar pumpen (Normark & Normark 2002). Hos *M. tuberculosis* har man sett att mutationer har inducerat effluxpumpar men även vissa resultat som kan antyda en inneboende försvarsmekanism i *Rv0738c*. Då effluxpumpar spelar en roll i resistensutveckling, kanske mer än man förut trott, är effluxpump inhibitorer ett nytt område för forskning på nya mediciner (Nikaido 1994, De Rossi *et al.* 2005, Jiang *et al.* 2008). Speciellt effluxpumpar, som klarar av utpumpning av strukturellt olika ämnen, är viktiga att inhibera. Detta då inhibition av en sådan pump skulle verka på flera olika antibiotika och därmed multiresistens. Intressant är också att effluxpumparna verkar vara relativt konserverade hos många humana patogener (Normark & Normark 2002). Så inte bara i fallet av *M. tuberculosis* utan även utvidgat till andra bakterier kan detta vara ett bra mål för nya mediciner.

Pseudomonas aeruginosa som har ett ovanligt starkt inneboende försvar har en del likheter med *M. tuberculosis*. Båda har ett ovanligt ogenomträngligt membran, β -laktamas och *P. aeruginosa* har naturliga effluxpumpar för ett brett spektrum av ämnen medan *M. tuberculosis*

troligen både har inneboende och förvärvade effluxpumpar. (Normark & Normark 2002). *M. tuberculosis* har även inneboende försvar i degraderande eller inaktiverande enzymer till skillnad från *P. aeruginosa* (Normark & Normark 2002). Så om *M. tuberculosis* i likhet med *P. aeruginosa* har ett starkt inneboende försvar förstärks det bara av även ett starkt förvärvat försvar mot antibiotika.

M. tuberculosis delar *whiB7* med *Streptomyces*, båda släktingar inom gruppen Aktinobakterier (Morris *et al.* 2005). Eftersom *M. tuberculosis* inte verkar ha någon genöverföring borde genen ha funnits hos de bådass gemensamma stamfader. Kanske kan släktskapet till *Streptomyces*, denna uppsjö av antibiotika, vara en faktor som bidrar till *M. tuberculosis* förmåga till multiresistens?

De vilande och uthålliga bakterier med okänd resistensmekanism kan vara en viktig faktor som spelar in i den långvariga behandlingen (McCune *et al.* 1956, Wade & Zhang 2004). Just den långvariga behandlingen är ett problem som förstärker resistensutvecklingen. Därför borde kanske ett av de allra viktigaste forskningsområdena vara på dessa vilande och uthålliga subpopulationer. Speciellt som ingen medicin i dagläget verkar på dessa bakterier (Zhang 2005). PA-824 som ser ut att kunna verka även på vilande bakterier väcker därför hopp. Viktigt är nog också att undersöka *M. tuberculosis* ovanliga patogener. Även andra patogena Aktinobakterier såsom *Tropheryma whipplei* och *Propionibacterium acnes* lever oftast intracellulärt såsom *M. tuberculosis*. Speciellt *P. acnes* har likheter med *M. tuberculosis* patogener då den växer långsamt och tolererar att växa i makrofager (Ventura *et al.* 2007). Kanske kan vidare studier i likheter och olikheter mellan bakteriernas patogener uppdaga viktiga insikter.

Då *M. tuberculosis* har många unika egenskaper borde framtiden ändå se relativt ljus ut eftersom det möjliggör för just nya mål för preparat att verka på. Cellväggen och dess ovanliga komponenter är en uppsjö av möjliga nya mål. Förhoppningsvis upptäcks preparat med dessa nya verkningsmekanismer och godkänns för användning innan resistens och multiresistens når för hög andel. Än så länge gäller det dock att jobba med det som finns, vilket är att minska och förebygga, där det kanske viktigaste är att det finns möjlighet att fullfölja behandlingen. Slutligen kan nog sägas att trots att *M. tuberculosis* inte verkar ha någon genöverföring, vilket är ovanligt, så har den istället varit ovanligt framgångsrik på att förfina andra mekanismer och kan därmed avundas av andra bakterier, men samtidigt skrämna och gäckas oss människor.

Tack

Tack till Leif Kirsebom och Lage Cerenius. Tack till Sara Karlsson, Noura Al-Walai och Anders Lind för värdefulla kommentarer. Tack till min mamma Kerstin Rehdell Ericstam för korrekturläsning. Slutligen tack till min sambo Peter Claesson för all hjälp under arbetets gång.

Referenser

- Aínsa JA, Blokpoel MCJ, Otal I, Young DB, De Smet KAL, Martín C. 1998. Molecular cloning and characterization of tap, a putative multidrug efflux-pump present in *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Bacteriology* **180**: 5836-5843.
- Alekshun MN, Levy SB. 2007. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell* **128**: 1037-1050.
- Banerjee A, Dubnau E, Quemard A, Balasubramanian V, Urn KS, Wilson T, Collins D, De Lisle G, Jacobs WR. 1994. *inhA*, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* **263**: 227-230.
- Bloom BR, Murray CJL. 1992. Tuberculosis: Commentary on a reemerging killer. *Science* **257**: 1055-1064.
- Brennan PJ. 2003. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis* **83**: 91-97.
- Burianková K, Doucet-Populaire F, Dorson O, Gondran A, Ghnassia J-C, Weiser J, Pernodet J-L. 2004. Molecular basis of intrinsic macrolide resistance in the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* **48**: 143-150.
- Carlson K, Linder C. 2008. Introduktion till mikrobiologi – med inriktning mot naturvetare och farmaceuter.1: a uppl. Studentlitteratur, Lund.
- De Backer AI, Mortelé KJ, De Keulenaer BL, Parizel PM. 2006. Tuberculosis: epidemiology, manifestation, and the value of medical imaging in diagnosis. *JBR-BTR* **89**: 243-250.
- De Barber AE, Mdluli K, Bosman M, Bekker L-G, Barry CE. 2000. Ethionamide activation and sensitivity in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 9677 -9682.
- De Rossi E, Aínsa JA, Riccardi G. 2005. Role of mycobacterial efflux transporters in drug resistance: an unresolved question. *FEMS Microbiology Reviews* **30**: 36-52.
- Flores AR, Parsons LM, Pavelka MS. 2005. Genetic analysis of the beta-lactamases of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium smegmatis* and susceptibility to beta-lactam antibiotics. *Microbiology* **151**: 521-532.
- Flynn JL, Chan J. 2001. Immunology of tuberculosis. *Annual Review of Immunology* **19**: 93-129.

- Ginsburg AS, Grosset JH, Bishai WR. 2003. Fluoroquinolones, tuberculosis, and resistance. *The Lancet Infectious Diseases* **3**: 432-442.
- Hershkovitz I, Donoghue HD, Minnikin DE, Besra GS, Lee OY-C, Gernaey AM, Galili E, Eshed V, Greenblatt CL, Lemma E, Bar-Gal GK, Spigelman M. 2008. Detection and molecular characterization of 9000-year-old *Mycobacterium tuberculosis* from a neolithic settlement in the eastern mediterranean. *PLOS ONE*, doi: [10.1371/journal.pone.0003426](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003426).
- Jarlier V, Nikaido H. 1994. Mycobacterial cell wall: Structure and role in natural resistance to antibiotics. *FEMS Microbiology Letters* **123**:11-18.
- Jiang X, Zhang W, Zhang Y, Gao F, Lu C, Zhang X, Wang H. 2008. Assessment of efflux-pump gene expression in a clinical isolate *Mycobacterium tuberculosis* by real-time reverse transcription PCR. *Microbial Drug Resistance* **14**: 7-11.
- Li X-Z, Nikaido H. 2009. Efflux-mediated drug resistance in bacteria: an update. *Drugs* **69**: 1555-1623.
- McCune RM, Tompsett R, McDermott W. 1956. The fate of *Mycobacterium tuberculosis* in mouse tissues as determined by the microbial enumeration technique. II. The conversion of tuberculous infection to the latent state by administration of pyrazinamide and a companion drug. *The Journal of Experimental Medicine* **104**: 763-802.
- Morris SL, Rouse DA. 1996, The genetics of multiple drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* and the *Mycobacterium avium* complex. *Research in Microbiology* **147**: 68-73.
- Morris RP, Nguyen L, Gatfield J, Visconti K, Nguyen K, Schnappinger D, Ehrt S, Liu Y, Heifets L, Pieters J, Schoolnik G, Thompson CJ. 2005. Ancestral antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **102**:12200-12205.
- Ngo SC, Zimhony O, Chung WJ, Sayahi H, Jacobs WR, Welch JT. 2007. Inhibition of isolated *Mycobacterium tuberculosis* Fatty acid synthase I by pyrazinamide analogs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, doi: [10.1128/AAC.01458-06](https://doi.org/10.1128/AAC.01458-06).
- Niederweis M. 2003. Mycobacterial porins – new channel proteins in unique outer membranes. *Molecular Microbiology* **49**: 1167-1177.
- Nikaido H. 1994. Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Science* **264**: 382-388.
- Normark BH, Normark S. 2002. Evolution and spread of antibiotic resistance. *Journal of Internal Medicine* **252**: 91-106.

- Okamoto S, Tamaru A, Nakajima C, Nishimura K, Tanaka Y. 2007. Loss of a conserved 7-methylguanosine modification in 16S rRNA confers low-level streptomycin resistance in bacteria. *Molecular Microbiology* **63**: 1096-1106.
- Plinke C, Rusch-Gerdes S, Niemann S. 2006. Significance of mutations in *embB* codon 306 for prediction of ethambutol resistance in clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **50**: 1900-1902.
- RAF. 2008. RAF om mykobakterier. WWW-dokument: <http://www.srga.org/Mykobakterier/Mykobakterier2008.htm#B>. Hämtad 2010-11-21.
- Ramón-García S, Martín C, Thompson CJ, Aínsa JA. 2009. Role of the *Mycobacterium tuberculosis* P55 efflux-pump in intrinsic drug resistance, oxidative stress response and growth. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **53** 3675-3682.
- Raynaud C, Lanéelle M-A, Senaratne PD, Lanéelle G, Daffé M. 1999. Mechanism of pyrazinamide resistance in mycobacteria: importance of lack of uptake in addition to lack of pyrazinamidase activity. *Microbiology* **145**: 1359-1367.
- Russell DG, Barry CE, Flynn JL. 2010. Tuberculosis: What we don't know can, and does, hurt us. *Science* **328**: 852-856.
- Ryan BM, Dougherty TJ, Bealieu D, Chuang J, Dougherty BA, Barrett JF. 2001. Efflux in bacteria: what do we really know about it? *Expert Opinion on Investigational Drugs* **10**: 1409-1422.
- Scorpio A, Zhang Y. 1996. Mutation in *pncA*, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. *Nature Medicine* **2**: 662-667.
- Shi R, Sugawara I. 2010. Development of new anti-tuberculosis drug candidates. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine* **221**: 97-106.
- Shinnick TM, King CH, Quinn FD. 1995. Molecular-biology, virulence, and pathogenicity of mycobacteria. *American Journal of the Medical Sciences* **309**: 92-98.
- Silva, PEA., Bigi F, Paz Santangelo M, Romano MI, Martín C, Cataldi A, Aínsa JA. 2001. Characterization of P55, a multidrug efflux-pump in *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **45**: 800-804.
- Sköld O. 2006. Antibiotika och antibiotikaresistens. 1:a uppl. Studentlitteratur. Lund.
- Smittskyddsinstitutet. 2010. Sjukdomsinformation om tuberkulos (TBC). WWW-dokument 2010-08-18: <http://www.smittskyddsinstitutet.se/sjukdomar/tuberkulos/>. Hämtad 2010-11-21.
- Srivastava S, Musuka S, Sherman C, Meek C, Leff R, Gumbo T. 2010. Efflux-pump derived multiple drug resistance to ethambutol monotherapy in *Mycobacterium tuberculosis* and

- the pharmacokinetics and pharmacodynamics of ethambutol. *The Journal of Infectious Diseases* **201**: 1225-1231.
- Takayama K, Wang L, David HL. 1972, Effect of isoniazid on the in vivo mycolic acid synthesis, cell growth, and viability of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2**: 29-35.
- Takayama K, Kilburn JO. 1989. Inhibition of synthesis of arabinogalactan by ethambutol in *mycobacterium-smegmatis*. *Antibicrobial Agents and Chemotherapy* **33**: 1493-1499.
- TB alliance. Global alliance for TB drug development. 2010. WWW-dokument: http://www.tballiance.org/downloads/mediakit/TBA_Portfolio_%2011.8.2010.pdf. Hämtad 2010-11-21.
- Ventura M, Canchaya C, Tauch A, Chandra G, Fitzgerald GF, Chater KF, van Sinderen D. 2007. Genomics of *Actinobacteria*: Tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **71**: 495-547.
- Vilcheze C, Wang F, Arai M, Hazbon MH, Colangeli R, Kremer L, Weisbrod TR, Alland D, Sacchettini JC, Jacobs WR. 2006. Transfer of a point mutation in *Mycobacterium tuberculosis inhA* resolves the target of isoniazid. *Nature Medicine* **12**: 1027-1029.
- Wade MM, Zhang Y. 2004. Mechanism of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Frontiers in Bioscience* **9**: 975-994.
- WHO. 2010a. Tuberculosis. WWW-dokument: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/index.html>. Hämtad 2010-11-21.
- WHO. 2010b. Multidrug and extensively drug-resistance TB (M/XDR TB). 2010 global report on surveillance and response. WWW-dokument: http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241599191_eng.pdf. Hämtad 2010-11-21.
- Zhang Y, Heym B, Allen B, Young D, Cole S. 1992. The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature* **358**: 591-593.
- Zhang Y, Permar S, Sun ZH. 2002. Conditions that may affect the result of susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide. *Journal of Medical Microbiology* **51**: 42-49.
- Zhang Y. 2005. The magic bullets and tuberculosis drug targets. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **45**: 529-64.