

Der Zufall schlägt zu

Stochastischer Zugang zur Entstehung von Antibiotikaresistenzen

DANA LAUENROTH – BERIT BENDER – STEFANIE BOIE – BÄRBEL KUNZE – KARSTEN KELLER

Antibiotikaresistenzen sind ein für Schüler/innen attraktives und zugleich hochbrisantes Thema. Ihre Entstehung lässt sich gut mathematisch modellieren und es können Computersimulationen sowie biologische Experimente durchgeführt werden. Das hier beschriebene fächerübergreifende Unterrichtsprojekt für die Oberstufe möchte Interesse und Verständnis für die Mathematik und insbesondere die Stochastik wecken und die Schüler/innen mit interdisziplinären Denkweisen in den Naturwissenschaften vertraut machen.

1 Motivation

Mathematik und Biologie sind eng miteinander verknüpft und profitieren gleichermaßen voneinander. COHEN (2004) formuliert das mit dem Titel einer seiner Arbeiten wie folgt: „*Mathematics is biology's next microscope, only better; biology is mathematics' next physics, only better*“. Bereits in der Schulzeit sollten erste Verbindungen zwischen der Mathematik und der Biologie hergestellt werden, damit Schüler/innen auf die Herausforderungen interdisziplinärer Arbeit vorbereitet werden. Es ist jedoch nicht selten, dass Schüler/innen konträr dazu Biologie als Naturwissenschaft wählen, um der eher ungeliebten Mathematik aus dem Weg zu gehen (ŠORGO, 2010). Eine nachhaltige Motivation zur Beschäftigung mit Mathematik ist eine besonders wichtige und nicht einfache Aufgabe des Schulunterrichts. Ohne Zweifel kann eine anwendungsorientierte Gestaltung bestimmter Teile des Mathematikunterrichts hier einen positiven Beitrag leisten. Künstliche Anwendungsbezüge führen eher selten zu einem verstärkten Interesse an der Beschäftigung mit Mathematik.

Mit dem vorgestellten Projekt wird eine reale, interessante und durchaus komplexe biologische Thematik vorgestellt, an der Mathematik erarbeitet werden kann und bei der durch die Modellierung von naturwissenschaftlichen Sachverhalten strukturelle Aspekte der Mathematik sichtbar werden. Die gewählte Thematik der Entstehung von Antibiotikaresistenzen spricht besonders vielfältige Aspekte der Mathematik, aber auch der Biologie an und zeigt die Notwendigkeit wie auch die Attraktivität interdisziplinärer Arbeit auf. Sie ist aus mehreren Gründen ideal:

1. Antibiotikaresistenzen sind ein für Schüler/innen attraktives biologisches Thema mit hochbrisanten medizinischen und gesellschaftlichen Aspekten, die darüber hinaus die Bedeutung der Evolution als allgegenwärtigen Prozess verdeutlichen.
2. Die der Entstehung von Antibiotika-Resistenzen unterliegenden Mechanismen können mathematisch relativ gut beschrieben werden, erfordern wegen ihrer Komplexität aber eine vertiefte Beschäftigung mit den biologischen und den mathematischen Aspekten sowie

einen interdisziplinären Ansatz. Insbesondere können Theorie, Experimente und Modellierung gut miteinander verbunden werden.

3. In besonderem Maße können Sachverhalte der Stochastik adressiert und illustriert werden, denn nahezu alle Aspekte der elementaren Stochastik werden von der gewählten Thematik berührt. Dadurch kann eine Verbesserung des Verständnisses für die teils ungeliebte, aber in vielen Studienfächern sehr relevante Stochastik unterstützt werden.

Das fächerübergreifende Projekt bietet vielfältige Möglichkeiten für eine individuelle Gestaltung der Unterrichtseinheiten. Die nachfolgenden Abschnitte können dabei als Module verstanden werden, die bis auf das Kernmodul 3.2 optional ausgewählt werden können. Die Module selbst sind ebenso flexibel zu gestalten und können beliebig vertieft werden. Einige Hinweise dazu finden sich in den Modulabschnitten selbst sowie im Ausblick.

2 Biologische Grundlagen

Viele Antibiotika mit bakteriostatischer Wirkung (Hemmung der Zellteilung) inhibieren die Proteinbiosynthese (Translation). Bei der Translation wird die genetische Information der mRNA an den Ribosomen in die kodierte Aminosäuren-Sequenz übersetzt. Grundsätzlich ähneln sich diese Vorgänge bei Bakterien (Prokaryonten) und Zellkern-haltigen Organismen (Eukaryonten). Die bestehenden molekularen Unterschiede ermöglichen den Einsatz von Antibiotika, die nur die prokaryote Translation inhibieren, aber nicht die Translation im eukaryoten Wirtorganismus. Ribosomen bestehen aus einer großen und einer kleinen Untereinheit, die ihrerseits aus ribosomaler RNA (rRNA) und aus ribosomalen Proteinen bestehen. Die für die Spectinomycin-Resistenz relevante kleine ribosomale Untereinheit besteht bei Bakterien aus einem Molekül 16S-rRNA und 21 angelagerten Proteinen. Die 16S-rRNA hat eine Länge von 1540 Nukleotiden und faltet sich durch inner-molekulare Wechselwirkungen zu einer komplizierten Sekundärstruktur auf. Veränderungen dieser Struktur (bedingt durch Mutationen in der ribosomalen DNA, rDNA) können dazu führen, dass das Antibio-

tikum nicht mehr an die Ribosomen binden kann; dies führt zu Resistenz gegen das Antibiotikum (weitere Ursachen für die Resistenz gegen Spectinomycin sind Mutationen im ribosomalen Protein S5 und Efflux-Pumpen).

Für den helicalen Abschnitt 34 der 16S-rRNA von *Escherichia coli* beschreiben JOHANSON und HUGHES (1995) fünf kritische Positionen, deren Mutation zu einer Spectinomycin-Resistenz führen kann, je nach dem, zu welcher Base die ursprüngliche Base mutiert (Abb. 1). In Abbildung 1 sind alle Punktmutationen in der 16S-rRNA aufgeführt, die zu einer Spectinomycin-Resistenz führen; sie liegen in den Bereichen 1062-1067 und 1189-1194.

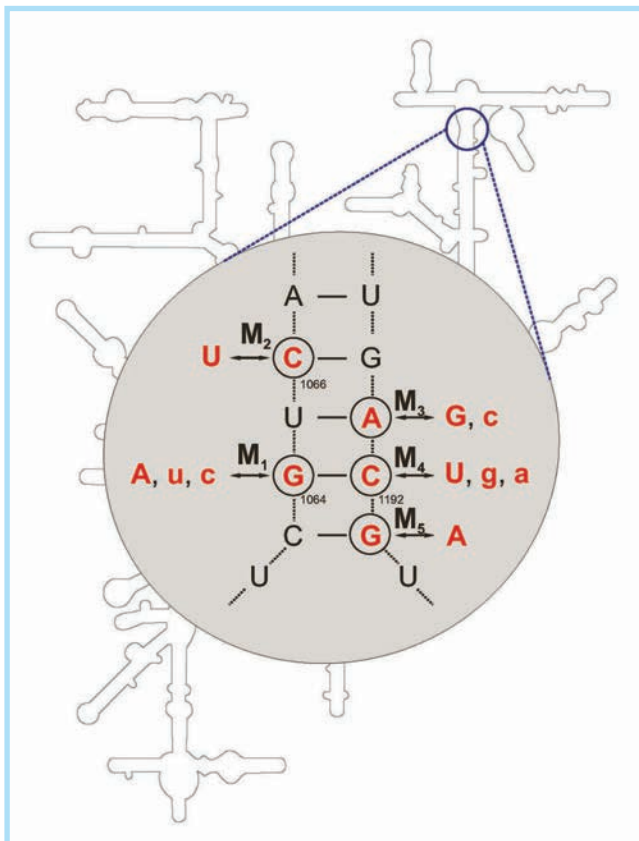


Abb. 1. Schematische Darstellung der Sekundärstruktur der 16S-rRNA von *E. coli* im oberen Stamm von Helix 34. Eingezeichnet sind die Mutationen, die eine Resistenz gegen Spectinomycin verursachen. Diese Mutationen sind G-an-1064-zu-A, u, c; C-an-1066-zu-U; A-an-1191-zu-G, c; C-an-1192-zu-U, g, a; G-an-1193-zu-A. Transitionen sind dabei durch Großbuchstaben gekennzeichnet und Transversionen durch Kleinbuchstaben. Die Bezeichnungen der entsprechenden Mutations-Ereignisse M_i , $i = 1, 2, \dots, 5$ sind eingezeichnet. (Originaldaten aus JOHANSON & HUGHES, 1995)

LEE, POPODI, TANG & FOSTER (2012) geben für *E. coli* eine Mutationsrate von $\mu = 2.2 \cdot 10^{-10}$ Mutationen pro Nukleotid pro Generation an. Bei den Mutationen sind grundsätzlich zwei verschiedene Klassen zu unterscheiden. Transitionen sind Punktmutationen innerhalb der gleichen Klasse von Basen; eine Purinbase (A oder G) wird durch eine andere Purinbase ersetzt oder eine Pyrimidinbase (C oder T, in der RNA C oder U) wird

durch eine andere Pyrimidinbase ersetzt. Die zweite Klasse von Punktmutationen sind Transversionen, d. h. eine Purinbase wird durch eine Pyrimidinbase ersetzt oder umgekehrt. Aus biochemischen Gründen treten Transitionen häufiger auf als Transversionen. LEE et al. (2012) haben für *E. coli* die in Tabelle 1 angegebenen relativen Häufigkeiten für die einzelnen Basenaustausche ermittelt.

Basenaustausch	Relative Häufigkeiten
Transitionen	0.56
A:T → G:C	0.21
G:C → A:T	0.35
Transversionen	0.44
A:T → T:A	0.07
A:T → C:G	0.16
G:C → T:A	0.13
G:C → C:G	0.07

Tab. 1. Relative Häufigkeiten der Basenaustausche in *E. coli* unterteilt in Transitionen und Transversionen. Verändert nach LEE et al., 2012.

Auf Grund des hohen Bedarfs an Ribosomen verfügen Bakterien über mehrere Kopien der ribosomalen DNA, was eine verstärkte Synthese von ribosomaler RNA ermöglicht. Das Darmbakterium *Escherichia coli* besitzt in seinem Genom sieben rDNA-Cluster (KISS, SAIN & VENETIANER, 1977) und damit sieben Kopien der 16S-rDNA, die jeweils unabhängig voneinander mutieren. Der Anteil mutierter 16S-rDNA-Kopien korrespondiert mit dem Anteil entsprechend mutierter 16S-rRNA-Kopien und somit mit dem Anteil modifizierter Ribosomen in der Zelle. Je höher der Anteil veränderter Ribosomen in der Zelle ist, umso höher ist die Antibiotikumkonzentration, die die Zelle noch tolerieren kann, d. h. bei der sie sich noch vermehren kann. In Folge dessen müssen in der Diagnostik unvollständige und vollständige Resistenzen unterschieden werden.

3 Mathematische Aspekte der Resistenzentwicklung

3.1 Benötigte biologische Fakten

Nachdem im vorherigen Abschnitt ausführlicher auf die biologischen Aspekte der Spectinomycin-Resistenz von *E. coli* eingegangen wurde, sollen hier noch einmal die für die mathematische Modellierung wichtigsten biologischen Fakten rekapituliert werden.

1. Das Antibiotikum Spectinomycin hemmt die Proteinbiosynthese an den Ribosomen von *E. coli*.
2. Tritt mindestens eine der in Abbildung 1 dargestellten Mutationen auf, entsteht eine Spectinomycin-Resistenz.
3. Die Mutationsrate von *E. coli* ist $\mu = 2.2 \cdot 10^{-10}$ Mutationen pro Nukleotid pro Generation (LEE et al., 2012).
4. Die einzelnen Basenaustausche haben die in Tabelle 1 aufgeführten relativen Häufigkeiten.

5. *E. coli* hat sieben Kopien der 16S-rDNA, die unabhängig voneinander mutieren (Kiss et al., 1977).
6. Der Anteil mutierter rDNA-Kopien korrespondiert mit dem Anteil modifizierter Ribosomen in der Zelle.

Für den Abschnitt 3.2 sind zunächst nur die Punkte 1. bis 4. relevant.

3.2 Basisfall von nur einer rDNA-Kopie

Mit Hilfe der Mutationsrate μ können aus den relativen Häufigkeiten (Tab. 1) leicht die durchschnittlichen Wahrscheinlichkeiten für die entsprechenden Basenaustausche innerhalb einer Generation berechnet werden. Die mittlere Wahrscheinlichkeit für den Austausch eines Adenins gegen ein Guanin beziehungsweise eines A-T-Basenpaares im DNA-Doppelstrang gegen ein G-C-Basenpaar beträgt zum Beispiel

$$P(A \rightarrow G) = 0.21 \cdot \mu = 0.21 \cdot 2.2 \cdot 10^{-10} = 4.62 \cdot 10^{-11}.$$

Im Nachfolgenden ist es für das grundlegende Verständnis jedoch nicht wichtig, alles ganz genau zu modellieren. Es könnte auch angenommen werden, dass alle Basenaustausche gleichwahrscheinlich sind. Unter dieser Annahme trägt jeder Basenaustausch die Wahrscheinlichkeit $\frac{1}{3} \mu$, da jede Base zu drei anderen Basen mutieren kann. Es ist einerseits möglich, nur diesen vereinfachten Fall zu betrachten, andererseits können auch die Auswirkungen einer solchen Annahme mit den Schüler/innen diskutiert werden, wenn die nachfolgenden Berechnungen jeweils einmal wie aufgeführt und einmal unter dieser Annahme ausgeführt werden.

Unter weiteren Annahmen können aus den mittleren Basenaustausch-Wahrscheinlichkeiten nun die Wahrscheinlichkeiten

für die zur Resistenz führenden Mutationen in der 16S-rDNA bestimmt werden. Es kann für die Berechnung vereinfachend angenommen werden, dass die Nukleotide unabhängig voneinander mutieren und dass die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer Mutation nur von dem Basenaustausch, nicht aber von der Position auf dem Strang abhängt. Bezeichne M_i das Ereignis, dass an der i -ten kritischen Position einer 16S-rDNA innerhalb einer Generation eine Mutation auftritt, die eine Spectinomycin-Resistenz bedingt (Abb. 1). Die M_i , $i = 1, 2, \dots, 5$, sind stochastisch unabhängig. Da die möglichen Basenaustausche an einer einzelnen Position stets disjunkte Ereignisse darstellen, kann die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten der Ereignisse M_i jeweils als Summe der Wahrscheinlichkeiten für die zur Resistenz führenden Basenaustausche angegeben werden:

$$\begin{aligned} P(M_1) &= P(G - an - 1064 - zu - A, u, c) \\ &= P(G \rightarrow T) + P(G \rightarrow C) + P(G \rightarrow A) \\ &= 0.13 \cdot \mu + 0.07 \cdot \mu + 0.35 \cdot \mu \\ &= 0.55 \cdot 2.2 \cdot 10^{-10} = 1.21 \cdot 10^{-10} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} P(M_2) &= P(C - an - 1066 - zu - U) \\ &= P(C \rightarrow T) \\ &= 0.35 \cdot \mu = 7.7 \cdot 10^{-11}, \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} P(M_3) &= P(A - an - 1191 - zu - G, c) \\ &= P(A \rightarrow G) + P(A \rightarrow C) \\ &= 0.21 \cdot \mu + 0.16 \cdot \mu = 8.14 \cdot 10^{-11}, \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} P(M_4) &= P(C - an - 1192 - zu - U, g, a) \\ &= P(C \rightarrow T) + P(C \rightarrow G) + P(C \rightarrow A) \\ &= 0.35 \cdot \mu + 0.07 \cdot \mu + 0.13 \cdot \mu \\ &= 1.21 \cdot 10^{-10}, \end{aligned}$$

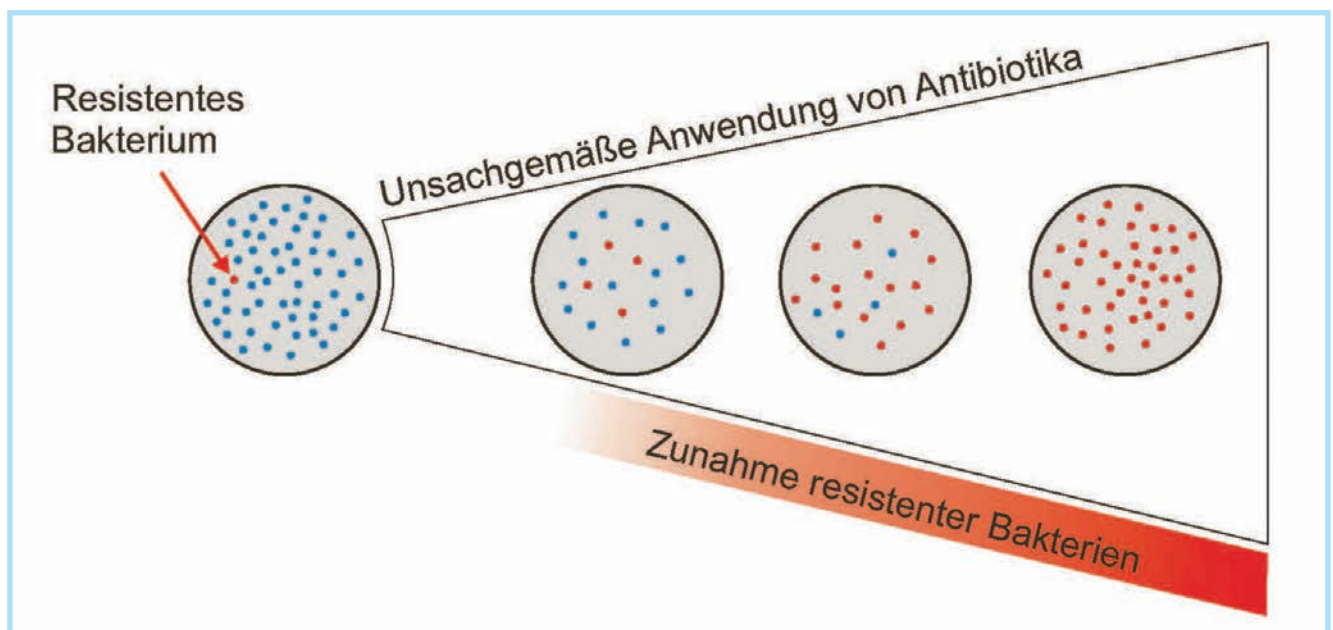


Abb. 2. Schematische Darstellung der Selektion zugunsten resistenter Bakterien durch unsachgemäße Anwendung von Antibiotika. Das Antibiotikum übt einen Selektionsdruck auf die Bakterienpopulation aus. Mit steigender Antibiotikumkonzentration haben die sensiblen Wildtyp-Bakterien (blau) einen Wachstumsnachteil gegenüber den resistenten Bakterien (rot) und werden von diesen verdrängt. Bei zu niedriger Dosierung des Antibiotikums überleben auch Bakterien mit unvollständig ausgeprägter Resistenz.

$$\begin{aligned}
 P(M_5) &= P(G - an - 1193 - zu - A) \\
 &= P(G \rightarrow A) \\
 &= 0.35 \cdot \mu = 7.7 \cdot 10^{-11}.
 \end{aligned}$$

Die Wahrscheinlichkeiten, mit denen die Ereignisse M_i für eine einzelne 16S-rDNA-Kopie eintreten, sind also sehr gering, aber verschieden von Null, was bedeutet, dass diese Ereignisse dennoch sehr vereinzelt eintreten. Bei Abwesenheit von Antibiotika treten in einzelnen Bakterien durchaus Mutationen auf, die zu einer Resistenz führen; jedoch haben die Bakterien keinen Vorteil davon und führen ein Nischendasein. Erst durch den Selektionsdruck des Antibiotikums kommt es zu einem Selektionsvorteil zugunsten der resistenten Bakterien. In Abbildung 2 ist die Selektion resistenter Bakterien schematisch dargestellt. Die steigende Antibiotikumkonzentration übt einen immer stärkeren Selektionsdruck auf die Bakterienpopulation aus. Die Wildtyp-Bakterien haben zunehmend einen Wachstumsnachteil gegenüber den Bakterien mit modifizierten Ribosomen, da an letzteren die Proteinbiosynthese nicht durch Spectinomycin gehemmt wird. Sind resistente Bakterien vorhanden, werden die Wildtyp-Bakterien bei steigender Antibiotikumkonzentration von diesen verdrängt. Da Bakterien sich bei ausreichend Platz und günstigen Bedingungen exponentiell vermehren, genügt ein einzelnes resistentes Bakterium als Ausgangspunkt für die Entstehung einer resistenten Population. Wird also das Antibiotikum in einer Konzentration verabreicht, die für die Wildtyp-Bakterien letal ist, aber von resistenten Bakterien noch toleriert wird, so kann aus einem resistenten Bakterium innerhalb kürzester Zeit eine neue Population resistenter Bakterien heranwachsen. Dies gilt insbesondere dann, wenn das Antibiotikum unsachgemäß verabreicht wird, also zu niedrig dosiert oder die Medikation vorzeitig abgebrochen wird. In diesem Fall überleben auch diejenigen Bakterien, die keine volle Resistenz ausgeprägt haben, bei denen zum Beispiel nur einige der sieben rDNA-Kopien mutiert sind.

Wenn nun die Wahrscheinlichkeit bestimmt werden soll, mit der nach der Gabe einer entsprechenden Dosis des Antibiotikums nicht alle Bakterien abgetötet werden, sondern eine resistente Bakterienpopulation zurückbleibt, genügt es daher zu betrachten, mit welcher Wahrscheinlichkeit mindestens ein Bakterium aus der Ausgangspopulation eine Resistenz aufweist.

Dafür muss erst einmal untersucht werden, mit welcher Wahrscheinlichkeit p eine 16S-rDNA innerhalb einer Generation derart mutiert, dass eine Resistenz des Bakteriums gegenüber Spectinomycin entsteht. Da bereits eine entsprechende Mutation an einer der fünf kritischen Positionen (Abb. 1) zur Resistenz führt, aber auch jede mögliche Kombination dieser Mutationen, wäre die Berechnung über die Einzelwahrscheinlichkeiten all dieser Ereignisse recht aufwendig. Bei komplexen Ereignissen ist oft die Wahrscheinlichkeit des Komplementäreignisses leichter zu bestimmen als die des Ereignisses selbst. Unter der Annahme, dass die Ereignisse M_i , $i = 1, 2, \dots, 5$ unabhängig voneinander eintreten und damit auch ihre Komplementäreignisse \bar{M}_i , $i = 1, 2, \dots, 5$ lässt sich die Wahrscheinlichkeit p für mindestens eine relevante Mutation in der 16S-rDNA sehr einfach über Gegenwahrscheinlichkeiten bestimmen

$$\begin{aligned}
 p &= P(\text{'mindestens eine relevante Mutation'}) \\
 &= 1 - P(\text{'keine relevante Mutation'}) \\
 &= 1 - P(\bar{M}_1) \cdot P(\bar{M}_2) \cdot P(\bar{M}_3) \cdot P(\bar{M}_4) \cdot P(\bar{M}_5) \\
 &= 1 - (1 - 1.21 \cdot 10^{-10})^2 \cdot (1 - 7.7 \cdot 10^{-11})^2 \cdot (1 - 8.14 \cdot 10^{-11}) \\
 &\approx 1 - 0.9999999995 \\
 &= 5 \cdot 10^{-10}.
 \end{aligned}$$

Wird nun zunächst angenommen, dass ein Bakterium lediglich eine rDNA-Kopie besitzt, so ist $p = 5 \cdot 10^{-10}$ zugleich die Wahrscheinlichkeit dafür, dass ein direkter Nachkomme eines Wildtyp-Bakteriums resistent gegen Spectinomycin ist. Für ein einzelnes Bakterium ist damit die Wahrscheinlichkeit für eine Resistenzentwicklung innerhalb einer Generation äußerst gering. Ein Mensch hat jedoch ungefähr 10^{14} Bakterien im Körper, wovon etwa 0.1% *E. coli* Bakterien sind, die sich im Darm befinden.

Wird jetzt von einer *E. coli* Population ausgegangen, die $n = 10^{11}$ Wildtyp-Bakterien umfasst, so ergibt sich eine gänzlich andere Wahrscheinlichkeit für die Resistenzentwicklung. Die Populationsgröße ist durch Zellteilung und Ausscheidung der Bakterien natürlichen Schwankungen unterworfen. Für die Modellierung wird jedoch vorausgesetzt, dass diese Prozesse sich die Waage halten und die Populationsgröße konstant bleibt. Da die Replikation sowie Modifikationen der Basen innerhalb der einzelnen Zellen ablaufen, ist die Annahme gerechtfertigt, dass die Bakterien unabhängig voneinander mutieren. Mit Hilfe der Gegenwahrscheinlichkeit lässt sich dann die Wahrscheinlichkeit, mit der mindestens ein Bakterium innerhalb einer Generation eine Resistenz entwickelt, angeben als

$$\begin{aligned}
 P(\text{'mindestens ein Bakterium wird resistent'}) \\
 &= 1 - P(\text{'kein Bakterium wird resistent'}) \\
 &= 1 - (1 - p)^n \\
 &= 1 - (1 - 5 \cdot 10^{-10})^{10^{11}} \\
 &\approx 1.
 \end{aligned}$$

Somit ist es, wenn die gesamte Bakterienpopulation betrachtet wird, fast sicher, dass eines der Bakterien eine Resistenz entwickelt, obwohl die Wahrscheinlichkeit einer Resistenzentwicklung für jedes einzelne Bakterium äußerst gering ist.

Eine derartige Aussage ist nicht nur in diesem speziellen Fall gültig. Wenn ein Ereignis bei den Individuen einer Gruppe unabhängig voneinander und mit gleicher Wahrscheinlichkeit \tilde{p} eintritt, gilt im Allgemeinen: ist die Eintretenswahrscheinlichkeit \tilde{p} für ein einzelnes Individuum nur größer als Null, so tritt das Ereignis in einer hinreichend großen Gruppe fast sicher ein. Denn in einer Gruppe aus \tilde{n} Individuen tritt das Ereignis mit einer Wahrscheinlichkeit von $1 - (1 - \tilde{p})^{\tilde{n}}$ mindestens bei einem Individuum ein, und als Grenzwert ergibt sich $\lim_{\tilde{n} \rightarrow \infty} (1 - (1 - \tilde{p})^{\tilde{n}}) = 1$.

Es ist sinnvoll, an entsprechender Stelle stochastische Unabhängigkeit und Disjunktheit von Ereignissen sowie Komplementäreignisse und die Komplementarität von Wahrscheinlichkeitsmaßen zu behandeln und deren Bedeutung auch in Hinblick

auf die angestellten Berechnungen zu diskutieren. Ebenso kann angesprochen werden, dass stets eine Modellierung und damit verbundene vereinfachende Annahmen notwendig sind, wenn die Mathematik naturwissenschaftliche Sachverhalte betrachtet. Wenn entsprechend Zeit vorhanden ist, kann es zudem interessant sein, die Schüler/innen bei den Berechnungen der Resistenzwahrscheinlichkeiten verschiedene Mutationsraten μ und Populationsgrößen n ausprobieren zu lassen und über die Einflüsse zu diskutieren.

3.3 Sieben rDNA-Kopien

Tatsächlich besitzen *E. coli* Bakterien jedoch sieben Kopien der 16S-rDNA, die unabhängig voneinander mutieren (Kiss et al., 1977). Da die meisten Bakterien ohne den Einfluss von Antibiotika keine Resistenzen aufweisen, wird erneut von einer Ausgangspopulation bestehend aus n Wildtyp-Bakterien ausgegangen. Anders als bei den bisherigen Überlegungen können die Bakterien sieben verschiedene Anteile modifizierter Ribosomen entwickeln, die mit verschiedenen maximal tolerierbaren Spectinomycin-Konzentrationen einhergehen. Dennoch ist zunächst wieder von Interesse, mit welcher Wahrscheinlichkeit es überhaupt zu einer Resistenzentwicklung in der Wildtyp-Population kommt. Da sowohl die sieben 16S-rDNA-Kopien in den einzelnen Bakterienzellen als auch die Genome der verschiedenen Bakterien unabhängig voneinander mutieren, kann für diese Fragestellung die Population als eine Menge von $7 \cdot n$ unabhängigen 16S-rDNA-Kopien betrachtet werden. Die Wahrscheinlichkeit dafür, dass mindestens ein Bakterium aus der Population innerhalb einer Generation eine Resistenz entwickelt, was mindestens einer mutierten 16S-rDNA entspricht, kann analog zum Fall von nur einer rDNA-Kopie angegeben werden als

$$\begin{aligned} P(\text{'mindestens ein Bakterium wird resistent'}) &= 1 - P(\text{'kein Bakterium wird resistent'}) \\ &= 1 - (1 - p)^{7 \cdot n} \\ &= 1 - (1 - 5 \cdot 10^{-10})^{7 \cdot 10^{11}} \\ &\approx 1. \end{aligned}$$

Es ist also davon auszugehen, dass sich zu jedem Zeitpunkt mindestens ein Bakterium im Darm befindet, das eine Spectinomycin-Resistenz aufweist.

Nun wäre es ebenso interessant zu wissen, wie wahrscheinlich es ist, dass eines der Bakterien mehr als nur eine mutierte Kopie der 16S-rDNA besitzt und damit eine höhere Dosis des Antibiotikums tolerieren kann. Es wird angenommen, dass es nicht zu Rückmutationen kommt, da diese die Berechnungen verkomplizieren würden. Wenn davon auszugehen ist, dass die Bakterien in der Population bereits jeweils über k , $k \in \{1, 2, 3, 4, 5, 6\}$, mutierte Kopien der 16S-rDNA verfügen, so ist die Wahrscheinlichkeit, dass in mindestens einem Bakterium mindestens eine weitere Kopie mutiert entsprechend

$$\begin{aligned} P(\text{'mindestens ein Bakterium erwirbt weitere Resistenzen'}) &= 1 - P(\text{'kein Bakterium erwirbt weitere Resistenzen'}) \\ &= 1 - (1 - p)^{(7-k) \cdot n} \\ &= 1 - (1 - 5 \cdot 10^{-10})^{(7-k) \cdot 10^{11}} \\ &\approx 1. \end{aligned}$$

Wenn also davon auszugehen ist, dass aus Bakterien mit k mutierten Kopien eine Population herangewachsen ist, ist es fast sicher, dass einzelne Bakterien einen noch höheren Anteil modifizierter Ribosomen erreichen. Ist hingegen anzunehmen, dass keine Selektion zugunsten resistenter Bakterien durch die Gabe von Spectinomycin stattgefunden hat, also der Großteil der Bakterien keine entsprechenden Resistenzen aufweist, so ist es eher unwahrscheinlich, dass die Bakterien höhere Anteile modifizierter Ribosomen entwickeln.

Für ein einzelnes *E. coli* Bakterium vom Wildtyp ist die Anzahl der 16S-rDNA-Kopien, die innerhalb einer Generation derart mutieren, dass es zu einer Resistenz kommt, binomialverteilt mit den Parametern $n' = 7$ und $p = 5 \cdot 10^{-10}$. Die Wahrscheinlichkeit dafür, dass innerhalb einer Generation k der sieben Kopien entsprechend mutieren, lässt sich angeben als

$$P(\text{'genau } k \text{ Kopien mutieren'}) = \binom{7}{k} \cdot p^k \cdot (1 - p)^{7-k}$$

mit $k \leq 7$.

Ist die Ausgangspopulation nicht resistent, ergibt sich damit eine Wahrscheinlichkeit von

$$\begin{aligned} P(\text{'mindestens ein Bakterium mit } \geq 2 \text{ mutierten Kopien'}) &= 1 - P(\text{'kein Bakterium mit } \geq 2 \text{ mutierten Kopien'}) \\ &= 1 - (P(\text{'höchstens eine Kopie mutiert'}))^n \\ &= 1 - ((1 - p)^7 + 7 \cdot p \cdot (1 - p)^6)^n \\ &= 1 - ((1 - 5 \cdot 10^{-10})^7 + 7 \cdot 5 \cdot 10^{-10} \cdot (1 - 5 \cdot 10^{-10})^6)^n \\ &\approx 5.25 \cdot 10^{-7} \end{aligned}$$

dafür, dass mindestens ein Bakterium in der nächsten Generation über einen Anteil von $\frac{2}{7}$ oder mehr modifizierter Ribosomen verfügt.

Wird nun zudem angenommen, dass ein gewisser Teil der Bakterienpopulation bereits eine mutierte Kopie besitzt, wofür die vorherigen Betrachtungen sprechen, muss ebenso berücksichtigt werden, dass diese weiter mutieren können. Bei m Bakterien mit einer mutierten Kopie ist mit einer Wahrscheinlichkeit von $1 - (1 - p)^{6 \cdot m}$ in der nachfolgenden Generation mindestens ein Bakterium mit mehr als einer mutierten Kopie der 16S-rDNA vorhanden. Selbst für $m = 1000$ liegt diese Wahrscheinlichkeit gerade einmal bei etwa $3 \cdot 10^{-6}$.

Insgesamt lässt sich also festhalten, dass ohne den Selektionsdruck durch das Antibiotikum die Wahrscheinlichkeit für die Entwicklung eines höheren Anteils modifizierter Ribosomen in der Bakterienpopulation sehr gering ist, vor allem im Vergleich zu der Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer Resistenz, die annähernd 1 ist. Denn die Wahrscheinlichkeit, dass zwei oder mehr Kopien gleichzeitig in einer Zelle mutieren, ist sehr gering, und nur wenige Bakterien besitzen bereits mutierte Kopien.

Entsprechende Wahrscheinlichkeitsberechnungen können auch für die übrigen Resistenzanteile durchgeführt werden. Allgemein ist zu erwarten, dass in einzelnen *E. coli* Bakterien im Vergleich zu dem Großteil der Population eine weitere

16S-rDNA-Kopie derart mutiert, dass diese Bakterien einen höheren Anteil modifizierter Ribosomen erreichen. Jedoch ist es eher unwahrscheinlich, dass bei einem Bakterium mehr als eine zusätzliche Kopie entsprechend mutiert. Wird Spectinomycin in einer Dosis verabreicht, die für Bakterien mit einer höheren Anzahl mutierter Kopien nicht letal ist, führt dies zum Absterben der Wildtyp-Bakterien und zu einer Selektion zugunsten dieser resistenten Bakterien (Abb. 2). Der Selektionsdruck, den das Antibiotikum auf die Bakterien ausübt, führt zu einer Evolution innerhalb der Bakterienpopulation. Durch eine schrittweise Erhöhung der Spectinomycin-Konzentration können so bewusst oder unbewusst Bakterien mit immer stärkeren Resistenzen „gezüchtet“ werden. Dabei muss dieser Prozess nicht zwingend in einem einzelnen Wirts-Organismus ablaufen. Bereits resistente Bakterien können ebenso gut übertragen werden und dann weitere Resistenzen akkumulieren; d. h. sowohl stärkere Resistenzen als auch Resistenzen gegen andere Antibiotika (Entstehung multiresistenter Keime).

Bereits mit den recht einfachen angestellten Berechnungen lässt sich damit zeigen, dass ein ungezielter und wiederholter Einsatz von Antibiotika auch aus Sicht der Stochastik als äußerst bedenklich einzustufen ist.

4 Ausblick

Wie eingangs erwähnt, kann das Projekt modular gestaltet werden. Das Kernmodul 3.2, gegebenenfalls mit den wichtigsten biologischen Fakten 3.1, sollte jedoch immer im Rahmen des Mathematikunterrichts behandelt werden. Besonders interessant und vielfältig ist eine fächerübergreifende Durchführung des Projektes. In diesem Fall wird mit der biologischen Seite begonnen. Je nach Vorkenntnissen der Schüler/innen können dabei in zwei bis drei Unterrichtsstunden die in Abschnitt 2 angesprochenen Aspekte der Spectinomycin-Resistenz von *E. coli* thematisiert werden wie auch allgemein Antibiotika mit ihren Wirkungsweisen und Resistenzmechanismen. Auch die Entstehung von Mutationen und, falls den Schüler/innen nicht hinreichend bekannt, die Zellteilung mit Schwerpunkt auf Replikation und Translation können besprochen werden.

Das Kernmodul 3.2 kann jedoch auch behandelt werden, ohne den biologischen Hintergrund allzu genau zu kennen. In Abschnitt 3.1 sind die für eine detaillierte Modellierung benötigten biologischen Fakten jedoch noch einmal aufgeführt. Die elementarste vorstellbare Variante ist, in einer einzelnen Mathematikstunde ausschließlich die grundlegende Erkenntnis zu erarbeiten, dass die Wahrscheinlichkeit einer Resistenzentwicklung für ein einzelnes Bakterium zwar äußerst gering ist, aber für die gesamte Population fast 1, weil es genügt, wenn ein einziges der 10^{11} *E. coli* Bakterien resistent wird und dies fast immer der Fall ist. Dass, ausgelöst durch den Selektionsdruck des Antibiotikums, Evolution stattfindet und bereits ein resistentes Bakterium ausreicht, damit aus diesem eine neue Population resistenter Bakterien heranwächst, kann an dieser Stelle auch durch die Lehrkräfte der Mathematik betont wer-

den. Die Wahrscheinlichkeit p , mit der eine 16S-rDNA entsprechend mutiert, kann wie in Abschnitt 3.2 angegeben über die Mutationsrate und die relativen Basenaustauschwahrscheinlichkeiten anhand des Schemas in Abbildung 1 bestimmt werden. Vereinfachend darf jedoch auch angenommen werden, dass jeder Basenaustausch die Wahrscheinlichkeit $\frac{1}{3} \mu$ trägt. Oder es kann alternativ einfach mit der hier angegebenen Wahrscheinlichkeit $p = 5 \cdot 10^{-10}$ für eine Resistenzentwicklung in einem Bakterium innerhalb einer Generation gearbeitet werden, ohne sich überhaupt mit den dafür verantwortlichen Mutationen auseinanderzusetzen. Für eine detaillierte Modellierung, bei der auf weitere Einzelheiten und Aspekte der Stochastik wie stochastische Unabhängigkeit oder disjunkte und komplementäre Ereignisse genauer eingegangen wird, sollten zwei bis drei Unterrichtsstunden eingeplant werden. Eine Analyse des Effekts verschiedener Mutationsraten und Populationsgrößen auf die Wahrscheinlichkeit einer Resistenzentwicklung innerhalb der Population kann in einer weiteren Mathematikstunde durchgeführt werden.

Optional kann im Anschluss der komplexere Fall 3.3 mit sieben unabhängigen rDNA-Kopien ebenfalls in etwa zwei Stunden des Mathematikunterrichts behandelt werden. Hierdurch ist es möglich, zu überprüfen, ob das Gelernte verstanden wurde und übertragen werden kann. Zudem findet die Binomialverteilung Anwendung.

Wenn das Projekt fächerübergreifend durchgeführt wird, bietet es sich an, am Ende in einer weiteren Biologiestunde Antibiotikaresistenzen mit ihren Konsequenzen zum Thema zu machen ebenso wie den richtigen Umgang mit Antibiotika. Zudem kann noch einmal angesprochen werden, dass es sich bei der Resistenzentwicklung um einen evolutionären Prozess handelt, der erst durch das Zusammenwirken von Mutation und Selektion entsteht. Erst Mutationen sorgen für die notwendige Vielfalt an Merkmalen, damit Selektion stattfinden kann. Ohne Selektion wiederum würde sich kein Merkmal durchsetzen, da alle Individuen ihre Erbanlagen mit gleicher Wahrscheinlichkeit weitergeben würden. Dieses Beispiel zeigt den Schüler/innen weiterhin, dass Evolution ein allgegenwärtiger Prozess von hoher medizinischer Relevanz ist.

Anregungen zur praktischen Arbeit sind auf der Homepage des LoLa (Lübecker offenes Labor) www.lola.uni-luebeck.de/materialien/versuchsbeschreibungen.html zu finden. Neben Hintergrundinformationen und Versuchsprotokollen sind dort auch Versuchsergebnisse hinterlegt, die 2018 im Rahmen eines Kooperationsprojektes zwischen LiMa (Lübecker Initiative Mathematik), LoLa und dem Gymnasium Johanneum zu Lübeck an der Universität zu Lübeck gewonnen wurden.

Das Projekt ist jedoch nicht auf reine Mathematik und Biologie beschränkt. Es ist auch möglich, die Resistenzentwicklung in Bakterienkolonien mit Hilfe von Computersimulationen zu erforschen. Dafür ist es sinnvoll anzunehmen, dass jedes Bakterium nur eine Kopie der 16S-rDNA besitzt und diese mit der Wahrscheinlichkeit $p = 5 \cdot 10^{-10}$ innerhalb einer Generation entsprechend mutiert, dass eine Resistenz entsteht und dass jede

Zelle sich innerhalb eines Zeitschrittes einmal teilt. Da davon ausgegangen wird, dass die Bakterien unabhängig voneinander mutieren, ist dann die Anzahl resistenter Bakterien, die innerhalb einer Generation entstehen, binomialverteilt mit den Parametern $p = 5 \cdot 10^{-10}$ und neuer Populationsgröße $2 \cdot n$. Binomialverteilte Zufallszahlen werden dann genutzt, um die Anzahl resistent werdender Bakterien zu simulieren.

Danksagung

Das beschriebene Unterrichtskonzept wurde im Schuljahr 2018/19 mit einem Oberstufenkurs im Biologie-Profil des Gymnasiums Johanneum (Lübeck) erprobt. Wir danken der Schulleitung und den beteiligten Fachschaften für die gute Zusammenarbeit und danken stellvertretend besonders Frau OSTR' M. HAGEMANN (Mathematik) und Frau OSTR' S. SCHEIBE (Biologie). Die Durchführung dieses einsemestrigen Projekts wurde gefördert von der Joachim Herz Stiftung (Perlenfonds). Darüber hinaus danken wir Frau GABRIELA FLETSCHINGER für die Erstellung der Abbildungen.

Literatur

COHEN, J. E. (2004). Mathematics is biology's next microscope, only better; biology is mathematics' next physics, only better. *PLoS Biology*, 2, 2017–2023.

JOHANSON, U., HUGHES, D. (1995). A new mutation in 16S rRNA of *Escherichia coli* conferring spectinomycin resistance. *Nucleic Acids Research*, 23, 464–466.

KISS, A. SAIN, B., VENETIANER, P. (1977). The number of rRNA genes in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.*, 79, 77–79.

LEE, H., POPODI, E., TANG, H., FOSTER, P. L. (2012). Rate and molecular spectrum of spontaneous mutations in the bacterium *Escherichia coli* as determined by whole-genome sequencing. *PNAS*, 109, E2774–E2783.

ŠORGO, A. (2010). Connecting Biology and Mathematics: First Prepare the Teachers. *CBE-Life Sciences Education*, 9, 196–200.

DANA LAUENROTH, dana.lauenroth@student.uni-luebeck.de, ist Studentin des Master-Studiengangs Mathematik in Medizin und Lebenswissenschaften, Universität zu Lübeck, Ratzeburger Allee 160, 23562 Lübeck.

DIPLOM.-MATH. BERIT BENDER, bender@math.uni-luebeck.de, Lübecker Initiative Mathematik, Institut für Mathematik, Universität zu Lübeck, Ratzeburger Allee 160, 23562 Lübeck.

DR. STEFANIE BOIE, boie@lola.uni-luebeck.de, Lübecker offenes Labor (LoLa), Universität zu Lübeck, Ratzeburger Allee 160, 23562 Lübeck.

PD DR. BÄRBEL KUNZE, kunze@lola.uni-luebeck.de, Leiterin des Lübecker offenen Labors (LoLa), Universität zu Lübeck, Ratzeburger Allee 160, 23562 Lübeck.

PROF. DR. KARSTEN KELLER, keller@math.uni-luebeck.de, Lübecker Initiative Mathematik, Institut für Mathematik, Universität zu Lübeck, Ratzeburger Allee 160, 23562 Lübeck. ■