

Experiment Nr. 25 / Mechanismen der Aminoglycosid-Resistenz in Mycobakterien

VerfasserInnen des Berichts

Rita Melcarne
Irene Völlmy
Rahel Schüepp
Rebecca Claudia Furrer
Willy Decurtins

Betreuer

P.D. Dr. Peter Sander

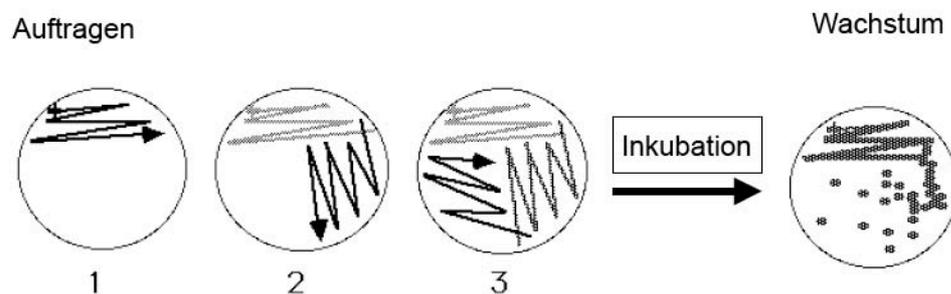
Einleitung

Aminoglycoside sind eine Stoffklasse von mehr als 20 Molekülen mit antibakterieller Wirkung. Sie gehören zur wasserlöslichen Gruppe der Aminozucker, die durch Glycosid-Ketten miteinander verbunden werden. Als Antibiotika unterdrücken sie die Proteinsynthese in der 30S Untereinheit bakterieller Ribosomen. Dem Streptomycin sehr ähnlich, wird es speziell zur medikamentösen Behandlung des *Mycobacterium tuberculosis* eingesetzt. Die vollständige Kursanleitung kann auf der Homepage der Microbial Ecology Group (s. Anhang) eingesehen werden.

Experiment 25-1 / Der Dreiösenaufstrich

Ziel Das Ziel ist die Isolierung einzelner Bakterienkolonien aus einer Bakteriensuspension.

Vorgehen Mittels steriler Ösen (Streichstäbchen) werden auf den 6 Agarplatten die verschiedenen Bakterienstämme (A-F) in einer speziellen ZickZack Form verteilt. Das Aufstreichen der Suspension soll nach folgenden Schema verlaufen:



Die Platten werden anschliessend mit Parafilm versiegelt und für eine Woche bei 37°C inkubiert.

Diskussion Die Kolonien sind definitiv sichtbar. Sie weisen eine bräunliche Farbe auf und haben eine raue Oberfläche. Wenn man die Struktur näher betrachtet, liegen die Flächen übereinander, so dass ein Überlappungseffekt erscheint. Eine genauere Untersuchung der Kolonien kann mit blossem Auge nicht durchgeführt werden.

In der Platte D ist das Experiment nicht sehr gut gelungen. Die Kolonie erscheint nur im Depot, und am Rande der zweiten Fraktion erschien eine rötliche Kolonie. Mit grösster Wahrscheinlichkeit handelt es sich hier um einen Kontaminanten.

Experiment 25-2 / Bestimmung der Antibiotikaresistenz-Phänotypen von Mycobacterien

Ziel Durch Testen verschiedener Stämme antibiotikaresistente Mycobacterien zu finden.

Methode Zuerst werden die sechs Bakterienstämme (A – F) dreimal 10-fach mit der LB-Bouillon verdünnt, so dass man die Verdünnungen 10-1, 10-2 und 10-3 bekommt.
Danach wird auf die Rückseite der 7 verschiedenen Agarplatten jeweils ein Gitter mit 18 Feldern gezeichnet. Je eine Platte enthielt LB-Bouillon (LB), LB-Streptomycin (Sm), LB-Kanamycin (Kann), LB-Paromomycin (Par), LB-Gentamycin (Gm), LB-Amikacin (Am) oder LB-Tobramycin (Tob), wobei die Antibiotika in die Platten eingegossen wurden.
Nun gibt man von jeder Verdünnung der sechs Stämme je 2 µl in eines der Felder und verschliesst die Agarplatten mit Parafilm. Diese werden dann für 5 Tage bei einer Temperatur von 37°C inkubiert.

Resultat

Stamm	LB	Sm	Kan	Par	Gm	Am	Tob	Resistenz-Phänotyp	Genotyp
A	+	0	0	0	0	0	0	Sensitiv	wt
B	+	+	0	0	0	0	0	Sm	rpsL
C	+	+	+	+	0	0	0	Sm, Kan, Par	aph
D	+	+	0	0	+	0	0	Sm, Gm	aac
E	+	+	0	0	0	0	0	Sm	rpsL
F	+	+	+	+	+	+	+	alles	rrn, A1408G
	Kontrolle	Aminocyclitol- Aminoglycoside							

Tab. 1: Übersicht der sechs Stämme bezüglich ihrer Wachstumsfähigkeit auf den verschieden behandelten Agarplatten (+ = Wachstum, 0 = kein Wachstum)

Diskussion Durch Mutationen und Transformationen wurden in verschiedenen Teststämmen Resistenzen eingeführt, die durch Strukturänderungen am Angriffspunkt des Antibiotikums (durch genetische Veränderung ribosomaler RNA und ribosomaler Proteine), oder durch Enzyme, welche die Testsubstanzen modifizieren, hervorgerufen werden.

Stamm A wurde nicht verändert. Er ist gegenüber allen in diesem Experiment eingesetzten Antibiotika sensibel (Wildtyp des Mycobacterium smegmatis).

Veränderung der Zielstruktur : ribosomale Proteine

Stamm B ist resistent gegen Streptomycin. Diese Resistenz wurde erreicht durch eine Mutation des Gens rpsL (ribosomal protein small subunit 12) am

Wildtypstamm A, die eine Änderung der Beschaffenheit eines der über 50 ribosomalen Proteinen bewirkt, dadurch ein Andocken des Streptomycins an die Zielstruktur verhindert und seine Wirkung unterbindet.

Enzymatische Veränderung des Wirkstoffes

Stamm C besitzt eine zusätzliche Resistenz gegen Kanamycin und Paromomycin, die durch die Aufnahme des aph-Gens durch Transformation des Stammes B zustande kam. Die Plasmid-DNA kodiert für das Enzym Aminoglycosid-Phosphotransferase (APH), die Aminoglycoside phosphoryliert. Dadurch wird die Struktur des Antibiotikums verändert und damit in seiner Wirkung inhibiert, da es nicht mehr an die Zielstruktur binden kann. Weil die beiden Antibiotika Kanamycin und Paromomycin strukturell sehr ähnlich sind, können beide Substanzen durch APH inhibiert werden (Kreuzresistenz). Bei den übrigen Aminoglycosiden dieser Testreihe sind die entsprechenden Seitenketten entweder nicht vorhanden oder für das Enzym nicht frei zugänglich, so dass sie durch APH nicht modifiziert werden können und wirksam bleiben.

Stamm D ist neben Streptomycin auch gegen Gentamycin resistent. Mittels eines Plasmides als Vektor wurde hier das Gen aac in den Stamm B eingeführt, das für ein anderes Enzym, die Aminoglycosid-Acyl-Transferase kodiert. Dabei wird Gentamycin an einer Amino-Seitengruppe acyliert, die nur bei dieser Substanz für das Enzym frei zugänglich ist. Auch hier verliert Gentamycin seine Wirkung, weil es durch die enzymatische Modifikation nicht mehr an die Zielstruktur binden kann.

Veränderung der Zielstruktur: ribosomale RNA

Stamm E entstand aus einer Mutation in Stamm B, durch die das Operon rrnB inaktiviert wurde. Stamm E hat denselben Phänotyp wie Stamm B, weil die Inaktivierung eines Operons ohne weitere Mutationen noch keine weitere Wirkung auf die bakterielle Resistenz hat. Er diente als Ausgangsstamm, um Stamm F zu generieren.

Stamm F ist resistent gegenüber allen Testsubstanzen. Durch die Inaktivierung von rrnB und einer zusätzlichen Punktmutation an der 16s rRNA an der kleinen Untereinheit des Ribosoms, die an der Stelle 1408 statt eines Adenins ein Guanin trägt, wurde dieser Bakterienstamm unempfindlich gegenüber allen getesteten Substanzen, da die Bindung an die Zielstruktur durch diese Veränderung unmöglich gemacht wurde (Kreuzresistenz).

Das zweite Operon rrnB musste dabei vorgängig ausgeschaltet werden, da die Wahrscheinlichkeit sehr klein ist, dass gleich zwei identische Mutationen an den kodierenden Sequenzen beider Operons der rRNA auftreten. Das ist auch der Grund, weshalb diese Art von Mutationen im Allgemeinen nicht so häufig in Bakterienstämmen vorkommen wie Resistenzen, die aufgrund von Enzymen auftreten, welche antibiotisch wirksame Substanzen neutralisieren.

Die zu erwarteten Resistenzen der Teststämme wurden mit der Ausführung des Experimentes weitgehend bestätigt (siehe Tabelle).

Experiment 25-3 / Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration

Ziel Finden der minimalen Hemmkonzentration („minimal inhibitory concentration“) von Kanamycin (1 ml 400 ug/ml) auf den Mycobakterien-Stämmen B & C von Versuch 25.2 (hier G und H in diesem Versuch).

Vorgehen Je eine abnehmende Verdünnungsreihe von G und H in 24 Reagenzgläsern herstellen. Dazu 1ml Nährlösung zu 1 ml G resp. H-Stamm geben und davon wieder 1 ml in eine Nährlösung von 1ml zufügen. Dies bis G10 und H10 fortfahren. G11 und H11 sind Positivproben (auch je 1ml von G und H beifügen!) G12 und H 12 sind Sterilproben. Anschliessend wurden die Röhren 1-11 mit verdünnter Bakterienlösung angeimpft.

Resultat

Reagenzglas	Kanamycin ug/ml	Stamm G	Stamm H
1	200	-	+
2	100	-	+
3	50	-	+
4	25	-	+
5	12.5	-	+
6	6.25	-	+
7	3.13	-	+
8	1.56	-	+
9	0.78	+	+
10	0.4	+	+
Positivkontrolle		+	+
Sterilkontrolle		+	+

0 = kein Wachstum + = Wachstum

Tab. 2: Die minimale Hemmkonzentration ist bei Stamm G ca. bei 1.5 ug/ ml und bei Stamm H größer als 200 ug/ml

Anhang

Literatur zum Thema:

- Madigan M.T., J.M. Martinko, J. Parker: "Brock – Biology of Microorganisms", 10. Auflage, 2003, Prentice Hall, Kapitel 20.6, 20.7, 20.9, 20.12, 24.3, 30.5, 12.24, s. 202, s. 339.
- Medizinische Mikrobiologie – F.H. Kayser, K.A. Bienz, J. Eckert, R.M. Zinkernagel, 10. Auflage, Thieme Verlag, Kapitel 3.6 Grundlagen der Antibiotikatherapie

Die Abbildung stammt aus der Kursanleitung von der Webseite:

- http://www.microeco.unizh.ch/uni/kurs/bio3_05/pdf/25mycobacteria04.pdf