

Mechanismen der Aminoglycosid-Resistenz in Mycobacterien

VerfasserInnen

Cristian Köpfl (crik@gmx.ch)

Michaela Ruffner (michaela.ru@bluwin.ch)

Ursina Koller (ursina.k@rocketmail.com)

Betreuer

P.D. Dr. Peter Sander (psander@immv.unizh.ch)

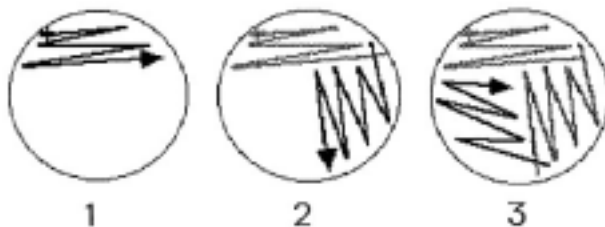
Einleitung

Aminoglycoside werden für die medikamentöse Behandlung bakterieller Infektionen von gram-positiven und gram-negativen Bakterien verwendet. Heute können Aminoglycoside für die Therapie von multi-resistenten *Mycobacteria tuberculosis* und anderen Infektionen von Mycobacterien eingesetzt werden. Allerdings haben sie Nebenwirkungen, die eine Einnahme über längere Zeit verbieten.

Experiment 25-1 Dreiosenausstrich

Ziel Isolierung einzelner Bakterienkolonien aus einer Suspension mit unbekannter Bakterien-Zahl

Vorgehen Mittels steriler Ösen Bakteriensuspension der Stämme A, B, C, D, E, F je auf eine Agar-Platte verteilen gemäss folgendem Schema:



Platten wähen einer Woche bei 37°C inkubieren.

Resultat Einzelne Kolonien werden sichtbar:



Diskussion Unter den einzelnen Kolonien, die sichtbar werden, sind auch fremde, die wir nicht erwartet haben. Durch ihre verschiedenen Formen, Farben und Oberflächenstrukturen kann man die verschiedenen Kolonien auseinanderhalten.

Experiment 25-2 Determination der Antibiotikaresistenz-Phänotypen von Mycobacterien

Ziel Durch Testen verschiedener Stämme antibiotikaresistente Mycobacterien finden.

Vorgehen Aus den sechs Bakterienstämmen A-F Verdünnungsreihen (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) herstellen durch Verdünnen mit Nährbouillon.
Von jeder Verdünnung 2 µl auf Agarplatten geben, welche mit je einem Antibiotikum behandelt sind.

Resultat

Strain	LB	Sm	Kan	Par	Gm	Am	Tob	resistance phenotype	genotype
A	+	(+)/0/0	0	0	0	0	0	sensitiv	
B	+	+	0	0	0	0	0		rpsl
C	+	+	+	+	0	0	0		aph
D	+	+	(+)/0/(+)	0	+	0	0		aac
E	+	+	0	(+)/0/0	0/(+)/0	0	0		rpsl
F	+	+	+	+	+	+	+		rrn, 1408:A G
	Control	aminocyclitol-aminoglycoside	2-deoxystreptamine-aminoglycoside						

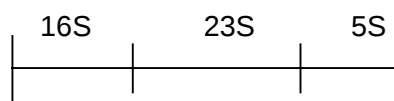
+= Wachstum, 0= kein Wachstum

LB= Nährmedium ohne Antibiotika, Sm=Streptomycin, Kan=Kanamycin, Par=Paramycin, Gm=Gentamycin, Am=Amikacin, Tob=Tobramycin

Diskussion Grundsätzlich gibt es für Bakterien drei Strategien, sich gegen Antibiotika zu schützen:

- Verstärkung der Zellwand
- Veränderung der Zielstruktur (also der Struktur, an der das Antibiotikum angreift)
- Antibiotikum angreifen lassen und modifizieren

Im Fall der eingesetzten Aminoglycosid-Antibiotika werden die Ribosomen der Mycobacterien angegriffen. Das Ribosom besteht aus ribosomaler RNA und Proteinen. Die rRNA wird codiert durch Gene, deren Operon rrn genannt wird. Dieses ist folgendermassen aufgebaut:



Dieses Operon ist in den untersuchten Bakterien in zweifacher Ausführung vorhanden (rrnA und rrnB). Die Resistenzen entstanden aufgrund von Modifikationen der Ribosomen, also der Zielstruktur des Antibiotikums, welche ihren Ursprung wiederum in Veränderungen der ribosomalen Gene haben.

Stamm A ist der ursprüngliche, unveränderte Bakterienstamm, der sensibel gegenüber allen eingesetzten Antibiotika ist.

Stamm B entstand aufgrund einer Mutation im rpsl-Gen (ribosomal protein small subunit S12) aus Stamm A, wodurch er resistent gegen Streptomycin wurde.

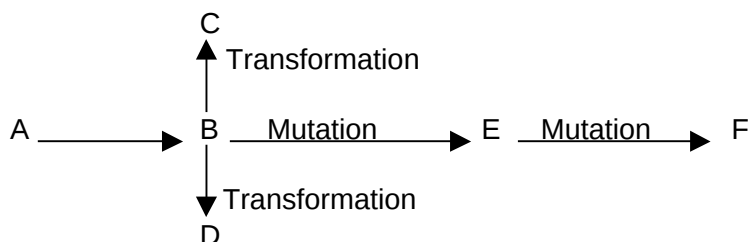
Stamm C wurde mittels einer Transformation, durch Einfügen des aph-Gens (aph=aminoglycosidphosphotransferase) aus Stamm B gewonnen. Dadurch wurde er zusätzlich resistent gegen Kanamycin und Paramycin (**Kreuzresistenz**).

Stamm D wurde ebenfalls durch Transformation aus Stamm B erzeugt, durch Einfügen des aac (aminoglycosidamyltransferase)-Gens. Als Folge trat Resistenz gegen Gentamycin auf.

Stamm E entstand durch eine Mutation aus Stamm A, wodurch rrnB inaktiviert wurde. Diese Mutation hat zunächst keine weiteren Auswirkungen für das Bakterium, ist aber die Grundlage der Züchtung des Stammes F.

Stamm F ist resistent gegenüber allen Aminoglycosid-Antibiotika aufgrund der Inaktivierung von rrnB in Kombination mit einer weiteren Mutation, und zwar wurde an Position 1408 der 16S-RNA die Base A durch G ersetzt (ebenfalls **Kreuzresistenz**).

In der Übersicht ergibt sich folgendes Schema:



Die erwarteten Resistenzen wurden durch das Experiment weitgehend bestätigt.

Nun zur Frage, warum Aminoglycosid-Antibiotika für den Menschen ototoxisch (gehörschädigend) und nephrotoxisch (nierenschädigend) sind. Bestimmt man das Nucleotid an der Position 1408 der 16S-RNA von sensiblen und resistenten Bakterienstämmen sowie mit mitochondrialen und cytoplasmatischen Ribosomen des Menschen, erhält man folgende Resultate:

Sensitive Bakterien:	A
Resistente Bakterien:	G
Mitochondriale Ribosomen:	A
Cytoplasmatische Ribosomen:	G

Daraus lässt sich schliessen, dass die Antibiotika die menschlichen mitochondrialen Ribosomen, deren Nucleotid an Stelle 1408 demjenigen von sensiblen Bakterien entspricht, angreifen und dies die Nebenwirkungen verursacht.

Experiment 25-3 Determination der minimalen inhibitorischen Konzentration

Ziel Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (inhibitorische Konzentration) von Kanamycin auf zwei Mycobakterien-Stämme

Vorgehen Durch Verdünnen zwei Reihen von Reagenzgläsern mit je 1 ml Nährbouillon sowie Kanamycin in abnehmender Konzentration gemäss Tabelle erstellen.
Je 50 µl der Bakterienstämme A respektive B begeben, Verdünnung jeweils 1:100
Während einer Woche bei 37°C inkubieren.

Resultat

Tube	Kanamycin µg/ml	Stamm A	Stamm B
1	200	0	+
2	100	0	+
3	50	0	+
4	25	0	+
5	12.5	0	+
6	6.25	0	+
7	3.125	0	+
8	1.5625	0	+
9	0.78125	+	+
10	0.3906	+	+
11 (Positivkontrolle)	-	+	+
12 (Sterilkontrolle)	-	0	0

+ = Wachstum (Trübung), 0 = kein Wachstum (klare Lösung)

Diskussion Die minimale inhibitorische Antibiotika-Resistenz beträgt bei Stamm A etwa 1.5 µg/ml.
Die minimale inhibitorische Antibiotika-Resistenz ist bei Stamm B >200 µg/ml.

Siehe auch

<http://www.tchain.com/otoneurology/disorders/bilat/ototoxins.html#good>