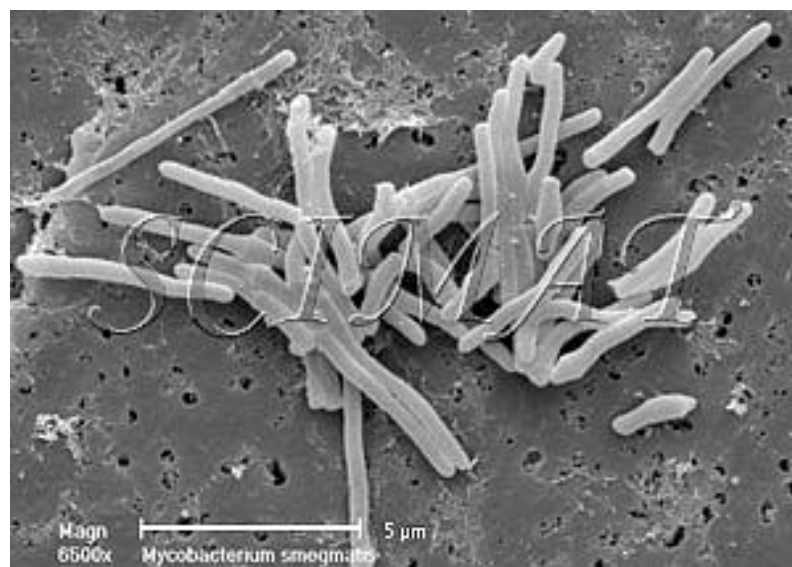


MECHANISMS OF AMINOGLYCOSIDE RESISTANCE IN MYCOBACTERIA



Verfasser: Olivier Gilleron
Stefan Brammertz

Betreuer: P.D. Dr. Peter Sander

Zielsetzung der Experimente

Beim Versuch 25 ging es darum, die Mechanismen der Aminoglykosidresistenz in Mycobakterien zu untersuchen. Die bekanntesten Mycobakterien sind *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium tuberculosis* und *Mycobacterium leprae*. Aminoglykoside binden an die kleine Untereinheit des bakteriellen Ribosoms (30S-Untereinheit). Dies führt zu einer Störung in der Translation, so dass die bakterielle Proteinsynthese gehemmt wird. Aminoglykoside werden in der klinischen Behandlung bei bakteriellen Infektionen eingesetzt. Es gibt aber auch Mycobakterien, die resistent gegen Aminoglykoside sind. Diese Resistenzen können sie sich über unterschiedliche Mechanismen aneignen:

- durch die Anwesenheit von Enzymen, welche Aminoglykoside verändern (Aminoglykosid Nucleotid Transferase (ANT), Aminoglykosid Acetyl Transferase (AAC), Aminoglykosid Phosphotransferase (APH).
- durch die Veränderung der Zielstruktur (ribosomale Proteine, ribosomale RNA)
- durch die Veränderung der Membrandurchlässigkeit
- durch die Ausstossung von Aminoglykosiden aus der Zelle

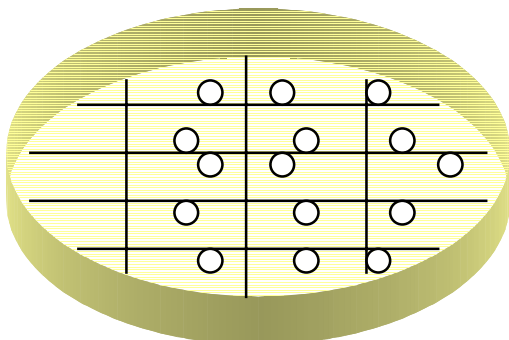
Durchführung / Ergebnisse:

1.Experiment – Dilution Streak

Beim 1.Versuch ging es darum, die Morphologie der Kolonie eines bakteriellen Stammes (A, B, C, D, E oder F) zu beschreiben. Dazu wurde mit dem bakteriellen Stamm ein Dreißenausstich auf eine Agarplatte durchgeführt. Die Agarplatte wurde dann während einer Woche bei einer Temperatur von 37 Grad aufbewahrt. Es zeigte sich, dass die Kolonie kreisförmig war und einen diffusen Rand hatte. Das Innere des Kreises sah hügelig aus und das Zentrum war meist schneeweiss.

2.Experiment – Ermittlung des Phänotyps der Antibiotika-Resistenz von Mycobakterien

Beim 2.Experiment ging es darum, das Wachstum von sieben verschiedenen bakteriellen Stämmen auf sieben verschiedene Agarplatten zu untersuchen. Die Agarplatten waren jeweils mit LB, LB-Streptomycin (Sm), LB-Kanamycin (Kan), LB-Paromomycin (Par), LB-Gentamycin (Gm), LB-Amikacin (Am) und LB-Tobramycin (Tob) behandelt worden. Nachdem diese Agarplatten mit den 7 verschiedenen bakteriellen Stämmen inkubiert worden waren, wurden sie bei einer Temperatur von 37°C für 5 Tage gelagert. Das Ergebnis ist in Tabelle 1 beschrieben.



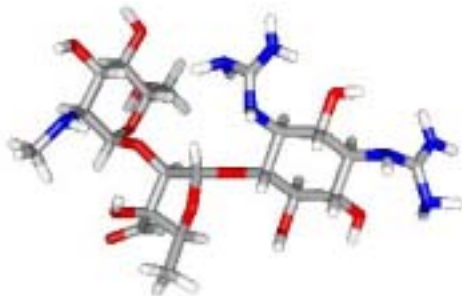
Petrischale mit Agar und dem entsprechenden Antibiotikum, eingeteilt in Felder. Weiße Flecken stellen Auftragspunkte dar: Von rechts nach links weniger stark konzentriert, von oben nach unten Stämme A bis E.

Tabelle 1: Ergebnisse von Experiment 2

Stamm	LB	Sm	Kan	Par	Gm	Am	Tob	Phänotypische Resistenz	Genotyp
A	+	0		0	0	0	0	LB	
B	+	+	0	0	0	0	0	LB, Sm	rpsI
C	+	+	+	+	0	0	0	LB, Sm, Kan, Par	rpsI, APH
D	+	+	0	0	+	0	0	LB, Sm, Gm	rpsI, AAC
E	+	+	0	0	0	0	0	LB, Sm	rpsI, rrnB::hyg
F	+	+	+	+	+	+	+	LB, Sm, Kan, Par, Gm, Am, Tob	rpsI, rrnB::hyg, rrnA:1408A->G
	Kontrolle	Aminocyclitol-Aminoglykosid	2-Deoxystreptamin-Aminoglycosid						

Hinweis: +=Wachstum=Resistenz; 0=kein Wachstum

Stämme B, C, D, E und F haben durch den Erwerb einer Mutation im Ribosom (rpsI) eine Resistenz für Streptomycin erworben. Beim Stamm C wurden die Antibiotika Kanamycin und Paromomycin durch Aminoglycosid-Transferase (aph) inaktiviert. Stamm D kann den Wirkstoff Gentamycin durch Aminoglycosid-Adenyltransferase (aad) inaktivieren. Bei Stamm E gibt es in der rrnB ein Gen, welches Hygromycin inaktiviert. Stamm F hat die gleichen Eigenschaften wie Stamm E. Zusätzlich existiert aber eine Veränderung in der Zielstruktur an der Stelle rrnA::1408; Adenin ist durch Guanin ersetzt. Dies führt dazu, dass der Stamm resistent gegen Streptomycin, Kanamycin, Paromomycin, Gentamycin, Amikacin und Tobramycin ist.



Modell eines im Versuch verwendeten Antibiotikums: Streptomycin

Bei unserer Ausführung von Experiment 2 wurden die Platten so eingeteilt, dass Stamm F nicht eingesetzt werden konnte. Die Ergebnisse dazu sind von anderen Gruppen übernommen. Fälschlicherweise zeigten sich alle Stämme ausser A gegen Tobramycin resistent; auf Kanamycin gab es Wachstum auf den Feldern von B, D und in Spuren von E. Genauso zeigte sich ein Wachstum von D auf Paromomycin sowie von B und C teilweise auf Amikacin. Dies ist vermutlich auf eine ungewollte Übertragung von anderen Stämmen zurückzuführen.

3.Experiment – Ermittlung der kleinsten hemmenden Konzentration durch Verdünnung der Kanamycinbrühe

Im 3.Experiment wurden Stamm G und H in einer Verdünnungsreihe von Kanamycin (Antibiotikum) auf Wachstum untersucht.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Konzentration	200 µg/ml kan	100 µg/ml kan	50 µg/ml kan	25 µg/ml kan	12.5 µg/ml kan	6.25 µg/ml kan	3.13 µg/ml kan	1.56 µg/ml kan	0.78 µg/ml kan	0.39 µg/ml kan	Kontrolle (ohne Antibiotik)	Kontrolle (ohne Stamm)
G (50ul)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	+	0
H (50ul)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0

Hinweis: kan=Kanamycin; +=Wachstum, 0=kein Wachstum

In der Tabelle ist ersichtlich, dass die minimale Kanamycinkonzentration 0.78µg/ml beträgt, um Stamm G beim Wachstum zu hemmen. Bei Stamm H muss die minimale Kanamycinkonzentration bei >200µg/ml liegen, um Stamm H beim Wachstum zu hemmen. Man könnte aber aus der Tabelle auch schliessen, dass Kanamycin bei Stamm H nicht wirkt und es hier keine „inhibitory concentration“ gibt.

Folgerungen

Beim Einsatz eines einzigen Antibiotikums können häufig resistente Mycobakterien vorhanden sein. Nach einer ersten Dezimierung breiten sie sich aus und lassen eine Krankheit erneut ausbrechen. Wirksamer ist es, mehrere Antibiotika gleichzeitig einzusetzen. Dadurch wird das Risiko, dass einer der Krankheitserreger gegen alle resistent ist, minimiert.

Weiterführende Literatur:

- Experimentsanleitung
http://www.microeco.unizh.ch/uni/kurs/bio3_04/pdf/25mycobacteria03.pdf
- Kapitel im Brock-Biology of Microorganism, tenth Edition: 20.6, 20.7, 20.9, 20.12, 24.3 30.5, 12.24, pg. 202, pg. 339
- Medizinische Biologie (F.H.Kayser, K.A.Bienz, J.Eckert, R.M. Zinkernagel), 10 Auflage: Kapitel 3.6
- Azucena, E., Mobashery, S. (2001) Aminoglycoside-modifying enzymes: mechanism of catalytic processes and inhibition. Drug Resistance Updates 4: 106-117