
Exp. 25: Mechanismus der Aminoglykosidresistenz in Mykobakterien

VerfasserInnen:

Linus Grämiger, [boombule @web.de](mailto:boombule@web.de)
Silke Van den Wyngaert, silke52@hotmail.com
Brigitte Spillmann, spillbri@gmx.ch
Eliane Irschara, eliane.irschara@highspeed.ch
Jessica Toller, coemgen@lycos.de

Betreuer:

Peter Sander, psander@immv.unizh.ch

Einleitung

In Versuch 25 haben wir die Mechanismen der Aminoglykosidresistenz in Mykobakterien untersucht. Aminoglykoside werden heute zur medikamentösen Behandlung von bakteriellen Infektionen mit Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien verwendet. In Bakterien binden sie an die kleine Untereinheit der bakteriellen Ribosomen (30S Untereinheit), was zu fehlerhafter Decodierung der DNA führt und so die Proteinsynthese der Bakterien beeinträchtigt.

Zu den bekanntesten Vertretern der Mykobakterien zählen *Mycobacterium leprae* und *Myobacterium tuberculosis*. Besonders für die Untersuchung ribosomaler Struktur-Funktionsbeziehungen eignen sich diese Modellorganismen hervorragend.

Bei der Behandlung von Mykobakterien haben sich sehr rasch Antibiotikaresistenzen entwickelt, häufig aufgrund von Monotherapien. Diese Resistenzen konnten sich über verschiedene Mechanismen etablieren:

- durch die Veränderung der Zielstruktur (ribosomale Proteine, ribosomale RNA)
- durch die Veränderung der Membrandurchlässigkeit
- durch die Ausstossung von Aminoglykosiden aus der Zelle

Exp. 25.1: Vereinzlungsausstrich

Ziel:

Abgrenzung einzelner Bakterienkolonien aus einer Ausgangslösung mit unbekannter Bakterienkonzentration durch Ausplatten.

Vorgehen:

Auftragen einer Bakteriensuspension der Stämme A-E auf eine sterile Öse (Schritt 1). Weitere Verteilung mittels zweier steriler Ösen, gemäss Abbildung (Schritt 2 und 3), wobei sich die Konzentration der Bakterien verringert.

Platten mit Parafilm verschliessen und während einer Woche bei 37° inkubieren.

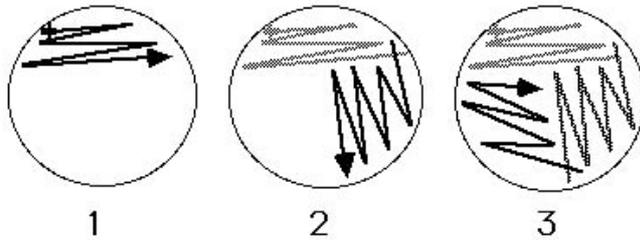


Abbildung 1: Schritte des Dreiösenausstrichs
Bakterienkolonien

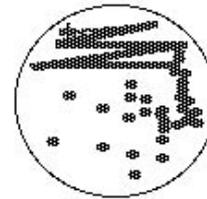


Abbildung 2: Wachstum der

Ergebnis:

Isolierte Bakterienkolonien werden sichtbar.

Diskussion:

Wie erwartet wurden einzelne Kolonien sichtbar, allerdings vereinzelt auch Kontaminationen fremder Organismen. Der ausgestrichene Bakterienstamm unterschied sich aber in seiner Morphologie durch krustenartige Oberflächenstruktur, ausgefranzten Rand und gelbliche Färbung.

Exp. 25.2: Determination der Antibiotikaresistenz-Phänotypen von Mykobakterien

Ziel:

Bestimmung von antibiotikaresistenten Mykobakterienstämmen

Vorgehen:

6 Bakterienstämmen (A-F) werden mit Nährbouillon verdünnt (3 Verdünnungsreihen: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}). Danach gibt man 2 µl von jeder Verdünnung auf verschiedene Agarplatten, welche mit bestimmten Antibiotika behandelt sind. Inkubation bei 37°C für 3-5 Tage.

Ergebnis:

Stamm	LB	Sm	Kan	Par	Gm	Am	Tob	Resistenz-Phänotyp	Genotyp
A	+	0	0	0	0	0	0	sensitiv	wildtyp
B	+	+	0	0	0	0	0	Sm	rpsL
C	+	+	+	+	0	0	0	Sm, Kan, Par	rpsL, aph
D	+	+	0	+/-	+	0	0	Sm, Gm	rpsL, aac
E	+	+	0	0	0	0	0	Sm	rpsL, rrnB-
F	+	+	+	+	+	+	+	alle	rpsL, rrnB-, rrs(A) A1408G
	Kontrolle	Aminocyclitol-Aminoglycosid	2-Deoxystreptamin-aminoglycosid						

Legende:

+ = Wachstum, 0 = kein Wachstum

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

Diskussion:

Wir benutzten *M. smegmatis*, da die Generationszeit lediglich 3 h beträgt und sie nur 2 funktionelle RNA-Operons (*rrnA* und *rrnB*) haben, was eine gezielte Mutagenese erheblich erleichtert. Ausserdem sind sie apathogen und benötigen somit nur wenige Sicherheitsmassnahmen.

Es gibt 3 Möglichkeiten mit denen sich Bakterien gegen Antibiotika schützen können:

- Verstärkung der Zellwand bzw. des Effluxes
- Veränderung der Struktur an die das Antibiotikum angreift
- Antibiotika aufnehmen und zur Inkompatibilität modifizieren

Stamm A: Wildtyp-Stamm, der sensibel ist gegenüber allen eingesetzten Antibiotika.

Stamm B: Trägt eine Mutation im *rpsL*-Gen (ribosomal protein small subunit S12) und ist aus Stamm A entstanden. Zeigt Resistenz gegen Streptomycin.

Stamm C: Entstand aus Stamm B durch Transformation des *aph*-Gens. Folge ist, Kanamycin und Paramycin werden durch Aminoglycosidphospho-Transferase (*aph*) inaktiviert (Kreuzresistenz).

Stamm D: Entstand ebenfalls durch Transformation aus Stamm B, es wurde das aminoglycosidacyltransferase-Gen (*aac*) eingefügt. Dieser Stamm zeigt deshalb Resistenz gegen Gentamycin.

Stamm E: Entstand durch eine gezielte Genveränderung aus Stamm A, bei der das *rrnB* inaktiviert wird. Dies hat keine direkten Folgen für das Bakterium (zeigt den gleichen Phänotyp wie Stamm B), ist aber Grundlage der Selektion von Stamm F.

Stamm F: Zeigt Resistenz gegenüber allen Aminoglycosid-Antibiotika. Das *rrnB*-Operon ist inaktiviert und zusätzlich gibt es eine weitere Mutation an der Stelle 1408 der 16S-RNA, wo die Base A durch G ersetzt wurde. Man spricht hier von Kreuzresistenz d.h. einer Resistenz gegenüber einer gesamten Stoffklasse, in diesem Fall gegenüber den Aminoglycosiden.

→ Die erwarteten Resistenzen wurden durch das Experiment weitgehend bestätigt.

Experiment 25-3 Determination der minimalen Konzentration

Ziel:

Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration von Kanamycin bei zwei Stämmen *Mycobacterium smegmatis*

Vorgehen:

24 Reagenzgläser wurden mit G1-G12 bzw. H1-H12 beschriftet und mit je 1ml Nährmedium (LB-Tween Broth) gefüllt. Weiter wurde 1ml Nährmedium mit 400µg/ml Kanamycin zu G1 zugegeben. Als nächsten Schritt wurde ein Verdünnungsreihe erstellt, bei der man aus G1 1ml entnahm, mixte und in Reagenzglas G1 beimischte. Diesen Schritt galt es bis G10 zu wiederholen und den zum Schluss anfallenden Milliliter zu verwerfen.

G11 war die Wachstumskontrolle ohne Antibiotika, G12 die Sterilprobe ohne Bakterien. Analog zu obigen Schritten wurde bei H1-H12 vorgegangen.

Von den Bakterienstämmen G bzw. H wurden je 50µl einer 1:100 Verdünnung zu den Reagenzgläsern G1-G11 bzw. H1-H11 zugegeben.

Die so erstellten Proben wurden anschliessend 3-5 Tage bei 37° inkubiert.

Ergebnis:

Wachstumstabelle: (0=kein Wachstum, +=Wachstum)

Stamm	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Kan-Konz. µg/ml	200	100	50	25	12.5	6.25	3.12	1.56	0.78	0.39	-	-
G	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Diskussion:

Unsere Feststellung war, dass sich bei allen Verdünnungen der Kanamycin-Konzentrationen Trübung d.h. Bakterienwachstum entwickelte, was auf eine mögliche Verunreinigung der LB-Nährmedien mit Kanamycin insensitiven Bakterien oder fehlerhafte Durchführung des Versuchs zurückzuführen sein könnte. Darauf deutet die Tatsache hin, dass die Sterilkontrollen beide Wachstum aufwiesen.

Vollständigkeitshalber haben wir aber die Resultat der Gruppe, die den Versuch eine Woche vorher gemacht hatte, untersucht:

Wachstumstabelle: (0=kein Wachstum, +=Wachstum)

Stamm	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Kan-Konz. µg/ml	200	100	50	25	12.5	6.25	3.12	1.56	0.78	0.39	-	-
G	0	0	0	0	0	0	0	0	+	+	+	steril
H	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	steril

Reagenzglas 11 war die Wachstumskontrolle und zeigt, dass ohne Antibiotika Wachstum zu verzeichnen ist. Reagenzglas 12 war die Sterilkontrolle und hat, wie erhofft, kein Wachstum.

Stamm G ist erst ab RG 9 bzw. einer Kanamycin-Konzentration von $\leq 0.78 \mu\text{g/ml}$ gewachsen. Die minimale Hemmkonzentration von Stamm G ist also $1.56 \mu\text{g/ml}$.

Stamm H ist von 1-11 gewachsen, was auf 2 Möglichkeiten hindeutet: Entweder hat dieser Stamm eine Resistenz gegen Kanamycin erworben oder aber die minimale Hemmkonzentration ist grösser als $200 \mu\text{g/ml}$. Die Lösung ist mit diesem Versuch nicht ermittelbar und wegen der klinischen Relevanz möglicherweise auch nicht sinnvoll.

Anhang:**Bildquellen:**

http://www.microeco.unizh.ch/uni/kurs/bio3_05/berichte/25-Di-H-report03.pdf

Die Tabellen wurden in Anlehnung an die Kursanleitung selber erstellt.

Folgende Buchkapitel behandeln die Themen des Experiments:

10. Auflage, Brock-Biology of Microorganism (BBOM): 20.6, 20.7, 20.9, 20.12, 24.3, 30.5, 12.24, S.202, S.339