

Integron und Integrase

Ein Versuch zum Nachweis von
Antibiotikaresistenzen.

Ein NUGI-Projekt am
Albert-Einstein-Gymnasium, Wiblingen

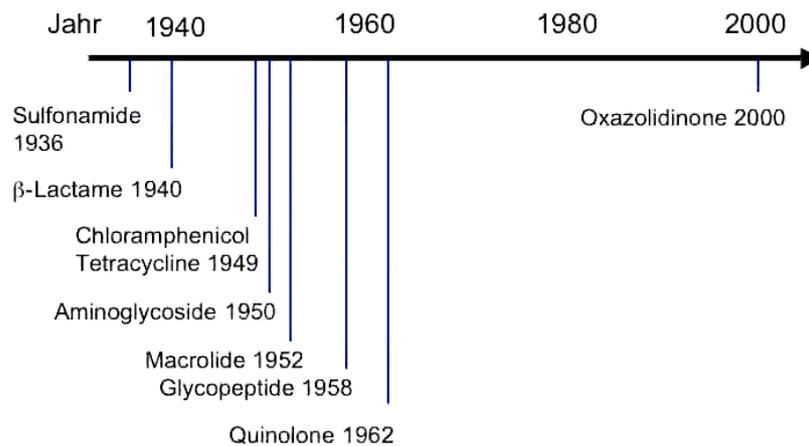
These

- Der Einsatz von Antibiotika führt zu einer erhöhten Resistenzbildung gegen diese Wirkstoffe.
- Auch pathogene Bakterien entwickeln Mechanismen zum Schutz gegen Antibiotika.
- Ein solcher Schutzmechanismus ist das **Integronsystem**.

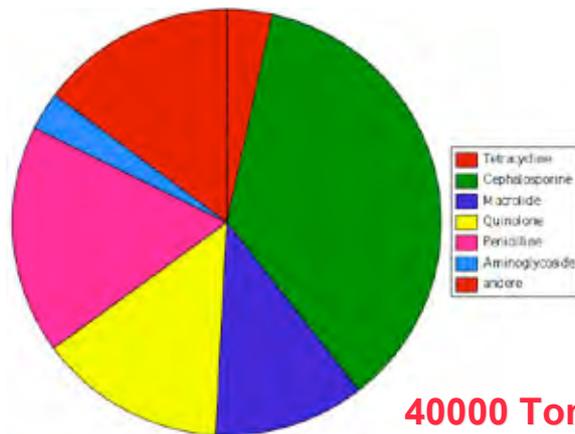
Konsequenz

- Antibiotika-Resistenz und Antibiotika-Bildung sind beide natürlichen Ursprungs.
 - Jeder Organismus, der AB herstellt, muss sich vor diesem AB schützen.
- Beim Einsatz von Antibiotika werden Antibiotika-Resistenzen ausgebildet.
 - Bei mehreren eingesetzten AB werden dann auch Mehrfach-Resistenzen entwickelt.
 - Selektionsdruck nimmt mit steigendem Antibiotika-Einsatz zu.

Einführung neuer AB

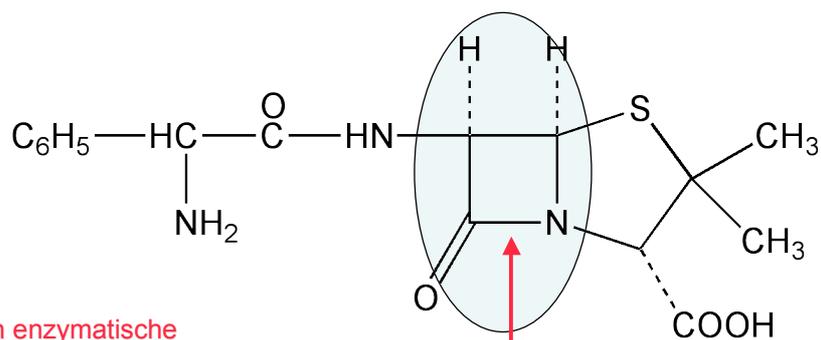


Antibiotika-Verbrauch



40000 Tonnen/Jahr

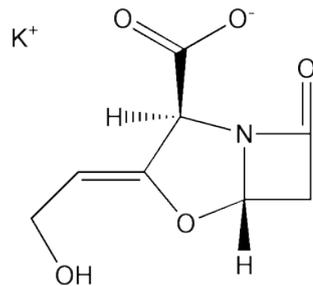
Beispiel β -Lactamasen



Durch enzymatische
Veränderungen am AB
verliert dieses seine
Wirksamkeit

Spaltstelle durch die beta-Lactamasen

Hemmung der β -Lactamasen



Clavulansäure ist eine **Lactam-analoge** Verbindung.

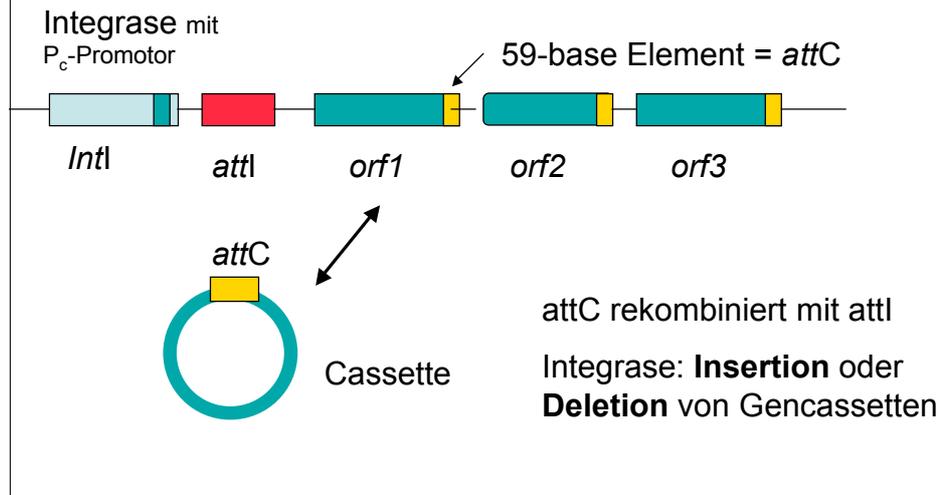
Sie bindet fester an die β -Lactamasen, als Penicillin.

Dadurch werden die β -Lactamasen blockiert.

Was ist ein Integron?

Sammelstelle für Gene, deren Genprodukte **mehrfache** Antibiotika-Resistenzen vermitteln

Aufbau eines Integrons



Unser Versuch

Das Projekt ist angelaufen.

Probennahme



Probestellen:

- Klärwerk
- Donau
- Badeseesee
- Ulmer Münster

Nachweis mehrfacher Antibiotikaresistenzen

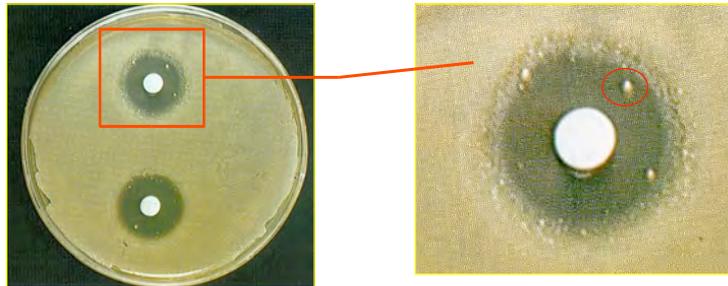


Bakterienhaltige Proben werden auf Agarplatten ausgestrichen und zusammen mit einem **Antibiotika-Testring** inkubiert.

Mechanismen der Antibiotika-Resistenz

Entstehung und Nachweis von Spontan-Mutationen

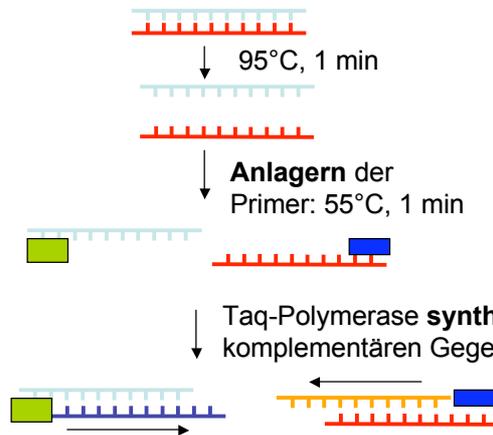
Mutationsrate 10^{-6} bis 10^{-9}



Das Integronsystem

- Wir weisen das Integronsystem durch eine PCR nach. Die **Primer** passen zum **Integrase Gen**.
- Durch eine anschließende Analyse des PCR-Produktes (DNA) mit Restriktionsenzymen, wird dieses Ergebnis dann bestätigt.
- Wir erwarten ein PCR-Produkt (DNA) mit einer Länge von etwa 500 Bp. Dieses Produkt sollte durch Restriktionsenzyme in zwei Teile geschnitten werden.

Prinzip der PCR



- PCR steht für Polymerase-Ketten-Reaktion
- Vervielfältigung eines DNA-Abschnittes, der durch zwei **Primer** flankiert wird.

Diese Schritte werden etwa 32 mal wiederholt. Dabei entstehen aus einem Molekül etwa 1 Milliarde (2^{32}) Kopien.

Der Integron-Nachweis

Hier wird ein Ergebnis dieses Versuches auf einem **Agarosegel** gezeigt:

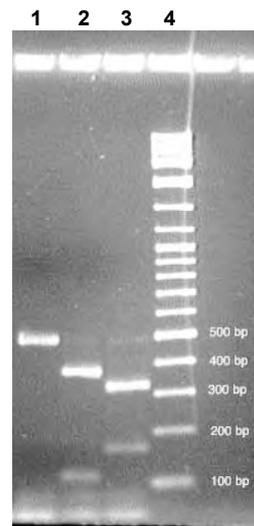
Die Nukleinsäuren im Agarosegel werden mit **Ethidiumbromid** sichtbar gemacht.

Spur 1: das unverdaute PCR-Produkt

Spur 2: Verdau des PCR-Produkt mit *PvuII*

Spur 3: Verdau des PCR-Produktes mit *BglI*

Spur 4: 100 bp Längenstandard



Erklärung

- Die Integrase ist in der Natur ein erfolgreiches Enzymsystem.
- Sie bietet ihren Besitzern Wachstumsvorteile.
- Sie ist deshalb in konservierter Form weit verbreitet.
 - Daher kann sie leicht nachgewiesen werden
 - Das hier untersuchte Integron häufig bei Enterobakterien (Darmbakterien) vor.

Das Integransystem

Nachweis **mehrfacher** Antibiotikaresistenz

Antibiotika bedingen bei Bakterien in der Natur die
Ausbildung von Resistenzen.

Ein solches System werden Sie hier mit der PCR Technik
nachweisen.

Dazu wird die Integrase nachgewiesen.

Integrasen

- Integrasen kommen auch bei Viren und Bakteriophagen vor.
- Dort bauen Sie die Viren DNA in die DNA des Wirtes ein

Das Integronsystem

Die Ausbildung von Antibiotikaresistenzen bei Bakterien als Antwort auf die Auseinandersetzung der Keime mit diesen Verbindungen ist eine natürliche Reaktion.

Das Integronsystem

Durch die **hohe** Zahl von Bakterienzellen in einer Probe und die **kurzen** Verdoppelungszeiten dieser Organismen, kommt es **häufiger zu Veränderungen** in den Zellen, die eine sehr schnell Anpassung an diese Situation bedingen.

Das Integronsystem

Es sind mehrere Resistenzmechanismen bekannt.
Im so genannten Integron können mehrere Gene für die Inaktivierung von Antibiotika „gesammelt“ werden. Damit bilden sich mehrfache Antibiotikaresistenzen in einem Organismus aus.

PCR

- Benötigt werden DNA-Bausteine und eine hitzestabile DNA-Polymerase
- Die DNA-Polymerase synthetisiert aus den DNA-Bausteinen an einer DNA-Vorlage (template) neue DNA-Stränge
- Die DNA-Polymerase stammt aus einem thermophilen Bakterium (*Thermus aquaticus*), das bei 75°C wächst
- Diese Taq-Polymerase (Taq = *Thermus aquaticus*) wird heute rekombinant in *E. coli* hergestellt