Untersuchung und Beeinflussung der speziesinternen Kommunikation von Bakterien

Niklas Marx
Kilian Günthner

SCHÜLERWETTBEWERB
WERKEN · MACHEN · AUSPROBIEREN

Untersuchung und Beeinflussung der speziesinternen Kommunikation von Bakterien

Inhalt

1. Kurzfassung 3
2. Einleitung 3
3. NetLogo 4
4. Was ist der Vorteil unserer Methode? 5
5. Vorversuche 6
   5.1 Biolumeniszenz erstes Stadium 6
   5.2 Sichtbarmachen von Biolumeniszenz 6
   5.3 Messung von Biolumeniszenz 8
   5.4 Experiment zur positiven Beeinflussung der biochemischen Kommunikation bei Vibrio Fischeri 8
6. Hauptversuch zur negativen Beeinflussung von Quorum-Sensing 10
7. Ausblick 12
8. Literatur- und Linkliste 13

1. Kurzfassung

Derzeit haben Mediziner und Wissenschaftler weltweit mit antibiotikaresistenten Bakterien zu kämpfen. Dies könnte in naher Zukunft zu einem noch größeren Problem werden, da sich schon heute die Bakterien mit einer rasanten Geschwindigkeit zur absoluten Resistenz entwickeln.

In unserer Arbeit beschäftigen wir uns mit der Entwicklung intelligenter Antibiotika am Beispiel von ungefährlichen Bakterienkulturen. Im Gegensatz zu üblichen Antibiotika zerstören wir die Bakterien nicht, sondern greifen direkt in die speziesinterne Kommunikation ein und neutralisieren so eine spezielle Bakteriengruppe. Dieses Prinzip beeinflusst andere Bakterienspezies jedoch nicht. Hierbei können keine Antibiotikaresistenzen entstehen. Bis zum Rotary-Wettbewerb wollen wir unser Mittel perfektionieren.

2. Einleitung

Durch einen unserer Verwandten, der als Arzt tätig ist, erfuhren wir von dem aktuell auch in den Medien kursierenden Thema der immer weiter wachsenden Antibiotikaresistenzen von Bakterien, die eine Schwächung des Immunsystems durch z.B. einen Virus abwarten. Daraufhin beginnen sie die unkontrollierte Wachstumsphase, nach der sie die Symbiose mit dem menschlichen Körper aufkündigen, um ihn anzugreifen. Will nun der Arzt gegen die Bakterien mit Antibiotika vorgehen, muss er oft erkennen, dass sich resistente Bakterien entwickelt haben, die durch die meist schädliche, überkonsumierte aber doch alternativlose Nutzung von Antibiotika entstanden sind. Unser Ziel ist es nun, eine Ausweichmöglichkeit zu diesem Verfahren zu finden, die der Möglichkeit der Entstehung von Antibiotikaresistenzen vorbeugt. Dazu wollen wir das jeweilige Kommunikationsmolekül mit für die Bakterien unschädlichen Blockern (z.B. schwacher Säure) behandeln, ohne das Bakterium jedoch zu schädigen. Dieses Molekül benutzen die Bakterien zur Kommunikation untereinander. Die primäre Rolle dabei spielt die Messung der Anzahl der vorhandenen Bakterien in der Umgebung. So kann die angesiedelte Bakteriengruppe ihre Überlegenheit gegenüber dem Immunsystem feststellen und legt danach den Zeitpunkt ihres Handelns fest. Nach Hinzugabe des Kommunikationsblockers hat das Bakterium durch Abänderung des Kommunikations-moleküls (Abb. 2.1) keine Möglichkeit mehr, die Anzahl seiner Artgenossen zu messen und ist in einem unschädlichen Zustand im Körper vorhanden, wonach es auf natürlichem Wege abgeführt werden kann. Da wir keine gefährlichen Bakterien verwenden dürfen, arbeiten wir mit Vibrio Fischeri, einem ungefährlichen Leuchtbakterium. Durch die Biolumeniszenz dieses Bakteriums ist die Funktionsweise des Kommunikationsmoleküls 3-oxo-C6-HSL gut zu erkennen.

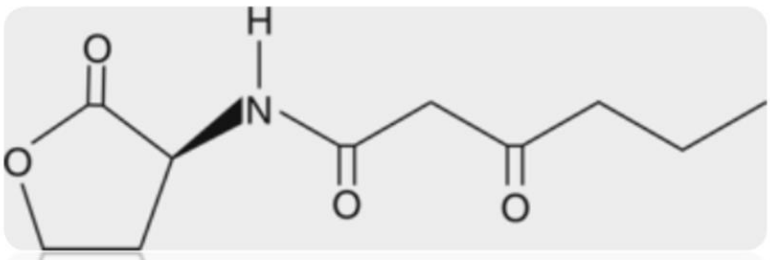

Abb. 2.1: 3-oxo-C6-HSL

3. NetLogo

Das auf künstlicher Intelligenz beruhende Simulationsprogramm „NetLogo“ (Abb. 3.1) wurde entwickelt, um verschiedenste physikalische, biologische und chemische Vorgänge darzustellen. Dieses Programm ist in den unterschiedlichsten Versionen verfügbar. Jede Version ist auf einen bestimmten naturwissenschaftlichen Vorgang ausgerichtet, die von uns verwendete dient speziell der Visualisierung der Biolumeniszenz bei Vibrio Fischeri. Hier sind einige Parameter verfügbar, die auf den angefügten Screenshots sichtbar sind. Sobald das Programm gestartet wurde, erscheinen einige als weiße Ringe dargestellte Leuchtbakterien. Wenn nun die Parameter verändert werden, ergeben sich verschiedene Änderungen bei den leuchtenden Bakterien, die sich jetzt entweder weiter ausbreiten und vermehren oder verblassen. Im Diagramm, welches auf der linken Seite sichtbar ist, kann sowohl die momentane Situation, als auch die bisherige Entwicklung der Leuchtbakterien eingesehen werden. Darunter sind weitere Angaben zur momentan vorhandenen Biolumeniszenz sichtbar. Wir führten hiermit einige Simulationen über einen längeren Zeitraum und unter verschieden Bedingungen durch, um uns einen allgemeinen Überblick über das Verhalten von Vibrio Fischeri in unterschiedlichen Situationen zu verschaffen.

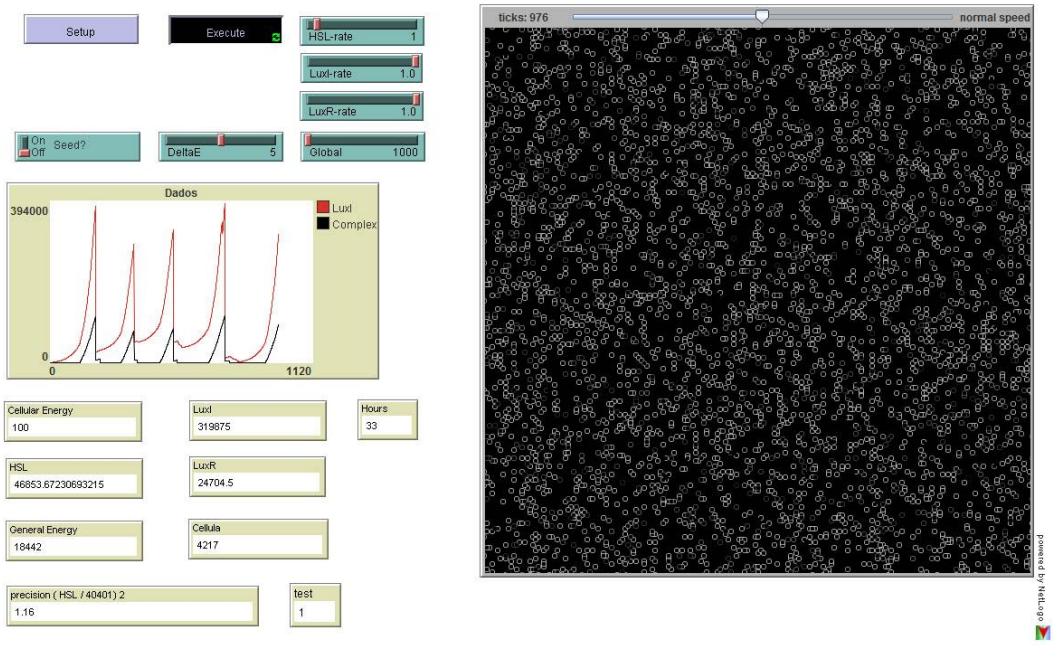

Abb. 3.1: NetLogo Interface bei "Quorum Sensing"

4. Was ist der Vorteil unserer Methode?

Was sind Biofilme und warum sind sie so gefährlich?

Die Biofilme sind Anhäufungen von Bakterien (oft auch verschiedener Spezies), welche aufgrund ihrer symbiotischen Lebensform sehr angriffsresistent gegenüber Antibiotika sind. Sie bilden sich heutzutage leider sehr leicht in empfindlichen Bereichen, wie z.B. in Krankenhäusern. Deshalb werden so viele Resistenzen gerade in den Bereichen gebildet, wo Bakterien eigentlich konterminiert werden sollen.

Wie funktionieren herkömmliche Antibiotika?

Bisher ist es üblich, Antibiotika gegen andere, feindliche Bakterien einzusetzen. Antibiotika sind heutzutage sowohl natürliche, als auch synthetisch hergestellte Stoffwechselprodukte einzelner Bakterien. Sie zerstören ihre feindlichen Bakterien vollständig. Hier entsteht jedoch das Problem, dass einige resistente Bakterien sich in Form von Biofilmen gegen die Antibiotika wehren können.

Wie funktionieren Quorum-Sensing-Blocker und welche Vorteile bieten sie?

Der Hauptvorteil dieser neuen Methode zur Bakterienbekämpfung besteht darin, dass gegen diese Blocker keine Resistenzen entstehen können. Sie sind bei Anwendung in der Lage, die Bakterien in ihrer QS-Fähigkeit einzuschränken.

Muss der QS-Patient die Blocker kontinuierlich zu sich nehmen, um QS weiterhin zu unterbinden?

Nein, denn die weitere Einnahme wird dadurch verhindert, dass mit der Anwendung der Blocker die Biofilme in einzelne Bakterien getrennt werden, die wesentlich weniger resistent sind. So sind die vereinzelten Bakterien mit gering dosierten, herkömmlichen Antibiotika zerstörbar.

Welche Stoffe eignen sich als QS-Blocker?

Besonders sinnvoll sind nichttoxische Stoffe, wie z.B. Citronensäure, die wir verwendeten. Hierbei orientieren wir uns an dem natürlichen Schutzmechanismus einiger gram-negativer Pflanzenoberflächen, wie beispielsweise beim Knoblauch. Dieser hat die Möglichkeit, bakterielle Biofilmbildungen abzuwehren, indem er QS-Blocker absondert, die ihn vor dem Zerfall schützen. Welche QS-Blocker hier jedoch genau verwendet werden, ist noch unklar. Mit der Citronensäure kann das Kommunikationsmolekül verändert und damit für das Bakterium unbrauchbar gemacht werden, indem weitere Wasserstoffatome der Molekülkette hinzugefügt werden.

5. Vorversuche

5.1 Biolumeniszenz erstes Stadium

Nun wollten wir uns ein Bild von der generellen Leuchtkraft des Bakteriums machen. Dazu wollten wir auf dem naheliegendsten Weg Vibrio Fischeri anreichern, was wir auf einem Nährboden aus einer vorgefertigten Agarnährlösung umsetzten. Wir kochten das Agar, bis es einen flüssigen Zustand annahm und wir es für unsere Leuchtbakterien verwenden konnten, die wir daraufhin auf den Nährboden gaben. Wie erwartet, begannen sie nach drei Tagen zu leuchten. Die Biolumeniszenz war nun sehr gut in dunklen Räumen sichtbar.

Abb. 5.1.1: Vibrio Fischeri auf einem Agar-Nährboden

5.2 Sichtbarmachen von Biolumeniszenz

Zuerst wollten wir uns mit der Betrachtung vereinzelter Leuchtbakterien beschäftigen. Es ergab sich jedoch leider die Situation, dass die Zeit, die die Leuchtbakterien zum Wachsen benötigen, noch nicht vorüber war, woraufhin wir uns einen kleinen Vorversuch überlegten. Er sollte den Unterschied der Biolumeniszenz bei verschiedenen Betrachtungssituationen deutlich machen. Wir gingen davon aus, dass unser fluoreszierendes Objekt, eine Armbanduhr mit Zeigern, welche im Dunkeln grünlich leuchten, unter Einsatz eines restlichtverstärkenden Nachtsichtgerätes am besten zu sehen ist. Diese Vermutung stellte sich jedoch als unwahr heraus, da das verwendete Nachtsichtgerät grüne Biolumeniszenz nur sehr schwach, teilweise gar nicht verstärkt. So sahen wir in einem dunklen Raum das Leuchten der Zeiger deutlich besser und konnten dies mit einer langen Belichtungszeit und hohen ISO-Werten gut mit einer digitalen Spiegelreflexkamera festhalten (siehe Abb. 5.2.1 – 5.2.3). Unsere Erkenntnis bestätigte sich nun, als wir, wie auf den Fotos ebenfalls sichtbar, die Spiegelreflexkamera vor das Nachtsichtgerät setzten und davor die Uhr postierten. Es war

jetzt die gesamte Uhr sichtbar, das Leuchten der Zeiger war so jedoch nicht erkennbar, wie auf den Fotos gezeigt wird. Folglich sollte unser Aufbau zur Betrachtung der erwarteten Leuchtbakterien nur die Spiegelreflexkamera beinhalten, die vor das Okular des Mikroskops gesetzt wird.

Abb. 5.2.1: Aufbau zur Beobachtung von Fluoreszenz durch ein Nachtsichtgerät

Abb. 5.2.2: Beobachtung von Fluoreszenz durch ein Nachtsichtgerät

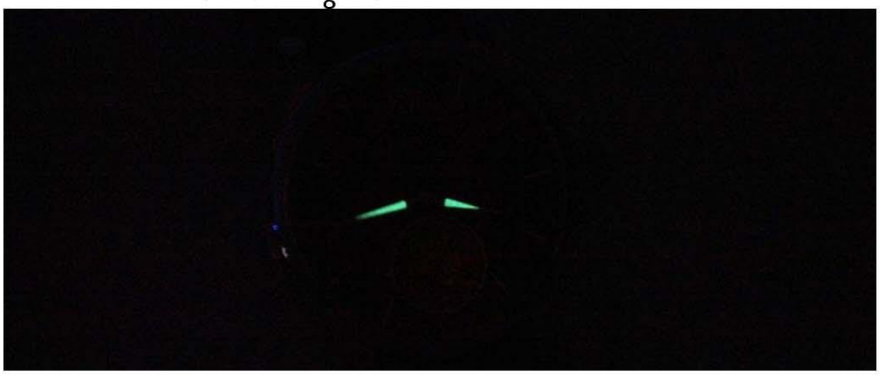

Abb. 5.2.3: Beobachtung von Fluoreszenz mit einer manuell bedienbaren Kamera

5.3 Messung von Biolumeniszenz

Wir beschäftigten uns mit dem Problem, die Biolumeniszenz von Vibrio Fischeri über einen längeren Zeitraum zu messen und stießen dabei auf die Möglichkeit, ein Fotometer für unsere Messungen zu nutzen. Dazu gaben wir ein Knicklicht auf Basis des Luciferin-Verfahrens in Küvetten und maßen die Leuchtintensität alle 5 min (Abb. 5.4.1).

Das Gleiche versuchten wir auch mit einem Fototransistor und einer Fotodiode. Allerdings wiesen beide eine zu geringe Sensibilität auf, als dass wir mit diesen hätten experimentiren können.

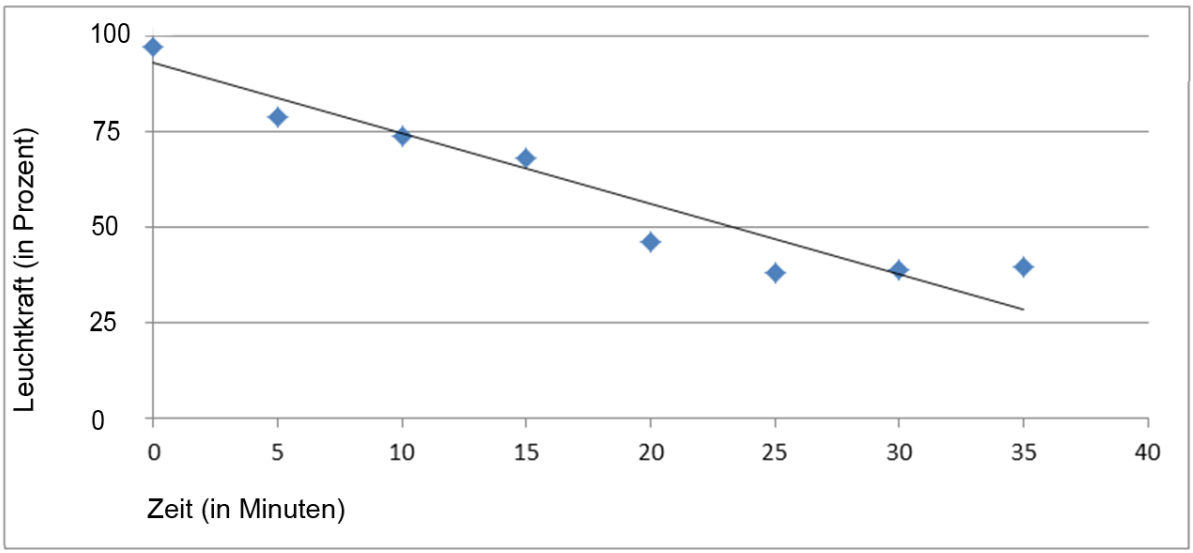

Abb. 5.4.1: Diagramm zur Leuchtkraft von Knicklichtern

5.4 Experiment zur positiven Beeinflussung der biochemischen Kommunikation bei Vibrio Fischeri

In diesem Versuch wollten wir die Biolumeniszenz bei einer verdünnten Masse an Bakterien zum Tragen kommen lassen, wobei sie eigentlich in einer zu geringen Zahl vorhanden sind. Dazu benötigten wir:

- Eine leuchtende Kultur
- Ein Nachtsichtgerät (Restlichtverstärker)
- Eine selbst erstellte Maggi Nährlösung (3g Salz; 2,4g Maggi klare Brühe; 100ml Wasser; 2g Agar)
- 3-oxo-C6-HSL
- Impföse

Die Planung unseres Versuchs sah dabei folgendermaßen aus:

In einem 1 Liter Glasgefäß werden in 100ml Wasser 3g Salz, 2,4g Maggi klare Brühe und 2g Agar gelöst. Dabei sollte die klare Brühe als Instantpulver hinzugegeben und der Agar

aufgekocht werden, damit er in flüssigem Zustand hinzugegeben werden kann. Diese Lösung wird nun 1-2 min. in der Mikrowelle erhitzt und dann auf ca. 7°C abgekühlt. Daraufhin wird ein kleiner Teil an Bakterien von der leuchtenden Kultur mit einer sauberen Impföse in die Maggi Nährlösung übertragen. Bei ca. 7°C wird dies nun für ca. 3 Tage in den Kühlschrank gestellt. Dabei kann hin und wieder mit dem Nachtsichtgerät die (sofern noch nicht mit dem bloßen Auge erkennbar) Biolumeniszenz überprüft werden. Hierbei muss darauf geachtet werden, dass der Raum ausreichend abgedunkelt ist, da eine zu starke Lichtintensität zu einer Schädigung des Gerätes führen kann und ausschließlich das Licht der Bakterien verstärkt wird. Die Steigerung der Biolumeniszenz sollte dokumentiert werden. Nun wird eine kleine Menge 3-oxo-C6-HSL zu der Bakterienlösung hinzugegeben und die Steigerung der Leuchtfähigkeit mit der vorangegangenen Dokumentation verglichen.

Leider ergaben sich unerwartete Probleme. So hatte sich auf der von uns angelegten Kultur Schimmel gebildet und diese war daher nicht länger brauchbar. Da wir aber zuvor bereits die Maggi-Lösung mit dem letzten Teil unserer gefriergetrockneten Kultur vorbereitet hatten, blieb uns nur noch die Möglichkeit, umzudisponieren. Da die Bakterien erst nach Ablauf der drei Tage im Kühlschrank anfangen zu leuchten, gaben wir den Kommunikationsstoff vor Ablauf der Frist von drei Tagen hinzu. So sollte die Biolumeniszenz bereits vorzeitig einsetzen. Dies geschah jedoch nicht. Die Biolumeniszenz setzte allerdings auch nicht nach Ablauf der dreitägigen Frist ein, woraus wir schlossen, dass es entweder Probleme mit der Maggi Nährlösung gab, oder auch die restlichen Bakterien bereits gestorben waren. Daher suchten wir nach einer neuen Variante für eine Nährlösung und stießen dabei auf eine neue Nährlösung mit den folgenden Materialien:

Komponenten	g/L
$CaCi_2$ * H_2O	1
Glycerin	3
Hefeextrakt	3
KCI	0,5
$MgSO_4$ * 7 H_2O	9
NaCI	20
Pepton	5
Agar	14
Wasser dest.	Auf 1000ml auffüllen

Abb. 5.5.1: Zutatenliste „professionelle“ Nährlösung

Nun mischten wir diese Lösung, die Maggi-Lösung und auch einen Agar Nährboden prophylaktisch für das Eintreffen der Bakterien an.

Bei der Zubereitung der Nährböden/-lösungen gingen wir wie folgt vor:

1. **Die Agarplatte**
   Diese Platte wird durch Erhitzen von einer vorgefertigten Agarmischung, die aus Salz und Agar, sowie weiteren Nährstoffen besteht und in Plastikfläschchen abgefüllt ist,

hergestellt. Daraufhin werden Bakterien in flüssiger Form auf die Platte gestrichen (Abb. 5.5.2).

2. **Die professionelle Lösung**
   Hierbei wird die oben genannte Mischung zubereitet. Die Bakterien werden in unveränderter Form hinzugefügt (Abb. 5.5.3).

3. **Die Maggi-Lösung**

Diese für den Schulgebrauch oft verwendete Lösung für Leuchtbakterien ist recht einfach herzustellen und bietet große Vorteile gegenüber dem festen Nährboden. Es ist hierbei deutlich einfacher, die Leuchtbakterien zu vereinzeln und das Leuchten zu verdeutlichen. Die Rezeptur hierfür findet sich in der Materialliste. Wir gaben die Inhaltsstoffe in ein großes Gefäß und lösten sie in den oben genannten 100 ml Wasser. Nach einigem Rühren wurde die Lösung durch einen Kaffeefilter filtriert und 1,5 min. in die Mikrowelle gegeben. Alles wurde noch einmal gründlich umgerührt und in den Kühlschrank gegeben, wo es bei 7° C lagern sollte (Abb. 5.5.4).

Alle benutzten Gefäße etc. kochten wir vorher in destilliertem Wasser ab.

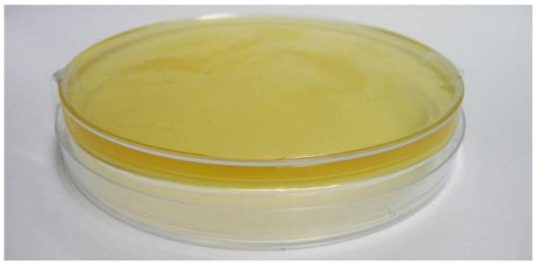

Abb. 5.5.2: Die Agarplatte

Abb. 5.5.3: Die professionelle Nährlösung

Abb Die Maggi Nährlösung

6. Hauptversuch zur negativen Beeinflussung von Quorum-Sensing

Für unseren Hauptversuch wollten wir auf den zuvor angelegten Medien die dehydrierten Bakterien aufstreichen bzw. hinzugeben. Danach wollten wir durch die Zugabe von Säure in Kombination mit Fett die Kommunikation unterbinden.

Aufgrund der einfachen Handhabung entschieden wir uns letztendlich jedoch dafür, die Nähragarplatte als finales Nährmedium zu verwenden, da sie sich zuvor aufgrund ihrer

einfachen Handhabung und ihrer hohen Zuverlässigkeit als bestes Medium herauskristallisierte.

Die Begründung dieses Vorgehens ist wie folgt zu erklären: Wenn wir im Atommodell des 3-oxo-C6-HSL durch Hinzufügen von Citronensäure und Fett mit weiteren Wasserstoff die Sauerstoffmoleküle erweitern, verändern wir das Modell. Da wir nun ein anderes Molekül als 3-oxo-C6-HSL erhalten, sind die Bakterien nicht mehr in der Lage, über dieses Molekül zu kommunizieren. So haben sie nicht die Möglichkeit, die Summe der in der Umgebung vorhandenen Leuchtbakterien zu messen und leben ohne jede Möglichkeit zur Kommunikation mit ihren Artgenossen weiter.

Für unseren Versuch benötigten wir:

- Die Agarplatte
- 3-oxo-C6-HSL (Kommunikationsmolekül)
- Vibrio Fischeri (in Form von gefriergetrockneter Lösung)
- Tierfettbutter
- Citronensäure

Zunächst trugen wir, wie zuvor bereits probiert, die gefriergetrocknete Lösung auf die Agarplatte auf. Dabei gingen wir mit einer Impföse und der Dreizehnstrich-Methode (Abb. 6.1) vor. Die Gemische wurden bei 7°C im Kühlschrank mit Sauerstoffzufuhr untergebracht. Nach Beginn der Biolumeniszenz startete der finale Teil: Wir wollten der Agarplatte Citronensäure hinzufügen und dann überprüfen, ob unser Verfahren gewirkt hatte. Nachdem die Bakterien auf einem 1µm-Filterpapier mit der Citronensäure beträufelt wurden, brachten wir eine Vakuumpumpe an einem Becherglas unter dem Filter an, mit der wir die Citronensäure entfernten und nur noch die Bakterien zurückließen. Die Biolumeniszenz der Bakterien setzte, wie erwartet, aus. Nun galt es zu beweisen, dass die Leuchtbakterien nicht von der Citronensäure zerstört worden waren, sondern dass wir ausschließlich das Kommunikationsmolekül verändert hatten. Wir gaben, da die Citronensäure ja bereits entfernt worden war, etwas 3-oxo-C6-HSL auf das Filterpapier und schon nach kurzer Zeit setzte die Biolumeniszenz wieder ein.

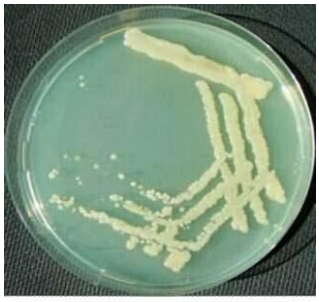

Abb. 6.1: Vibrio Fischeri auf einer Agarplatte mit der Dreizehnstrich-Methode

7. Ausblick

Nach Beendigung des Hauptversuches mit dem Beispielbakterium Vibrio Fischeri eröffnet sich uns nun ein breites Spektrum von Einsatzbereichen für die Quorum-Sensing-Blocker. Sowohl im Bereich der inneren Medizin, also der Vorbeugung von Bakterieninfektionen im menschlichen Körper, als auch im Bereich der Desinfektionsmittel werden die QS-Blocker verwendbar sein. Die Blocker werden, wie weiter oben beschrieben, gegen bakterielle Infektionen aller Art einsetzbar sein. Ferner ist es möglich, z.B. in Krankenhäusern, in denen sich Antibiotikaresistenzen bilden, die QS-Blocker zum primären Konterminieren der Bakterien einzusetzen und so gegen Biofilmbildung vorzugehen. Dann können die Oberflächen, wie sonst üblich, mit Desinfektionsmitteln behandelt werden. Allgemein könnte man sie zur primären Vereinzelung und Autarkisierung anwenden, um sie danach mit sehr geringen Mengen herkömmlicher Antibiotika vollständig zu konterminieren. Wir sehen großes Potential in der Verwendung von QS-Blockern.

8. Literatur- und Linkliste

[1] NetLogo: http://ccl.northwestern.edu/netlogo/models/community/Quorum_Sensing

[2] DSMZ: http://www.dsmz.de/

[3] Conatex Leuchtlabor: http://www.conatex.com/shop/product_info.php?products_id=2181

[4] Bezugsadressen 3-oxo-C6-HSL: http://www.biomol.de/
http://www.caymanchem.com/app/template/Product.vm/catalog/10011207

Literatur:

[1] Grundlagen der Mikrobiologie, Heribert Cypionka, Springer Lehrbuch Verlag, 4.Auflage, Oldenburg 2010

[2] The language of bacteria, Bonnie Bassler:
http://genesdev.cshlp.org/content/15/12/1468.full

[3] Entwicklung von online-Toxizitätstests für die wirkungsbezogene Analyse von Wasserinhaltsstoffen, Philipp Stolper: http://deposit.d-nb.de/cgi-bin/dokserv?idn=993068332&dok_var=d1&dok_ext=pdf&filename=993068332.pdf

[4] wissenschaft.de - Der Teflon-Biofilm:
http://wissenschaft.de/wissenschaft/news/312688.html

[5] wissenschaft.de - Bakterien offenbaren ihre Achillesferse:
http://wissenschaft.de/wissenschaft/news/310948.html

[6] wissenschaft.de - Signal zur Rudelbildung:
http://wissenschaft.de/wissenschaft/news/309893.html

[7] Stern: Keime im Krankenhaus: http://www.stern.de/gesundheit/keime-im-krankenhaus-die-unsichtbare-gefahr-1596548.html

[8] Isolierung von Reinkulturen: http://www.pmbio.icbm.de/mikrobiologischer-garten/de/deleu04.htm

[9] Maggi Nährlösung: http://www.chemieonline.de/forum/archive/index.php/t-33595.html

[10]QS-Blocker: http://pharmakologie.wordpress.com/2009/03/20/antibiotika-ohne-resistenzen/

[11] Natürliche QS-Blocker: http://www.biospektrum.de/blatt/d_bs_pdf&_id=934633

[12] QS und Antibiotika: http://www2.biologie.uni-halle.de/genet/plant/staff/boch/lectures/mabi2005/VL06-Quorum&Antibiotika.pdf