

Schuster bleib bei deinen Leisten – bakterieller Zelltod durch Antibiotika ist nicht durch reaktive Sauerstoffspezies erklärbar**

Nikolai Kuhnert*

Antibiotika · Antioxidantien · Oxidativer Stress ·
Polyphenol · Reaktive Sauerstoffspezies

Eine Vielzahl wissenschaftlicher Theorien ist ihrem Charakter nach einfach und somit Lernenden und der breiten Öffentlichkeit leicht verständlich zu machen. Solche einfachen Theorien und Konzepte werden daher häufig in benachbarte Wissenstegebiete übertragen und auch von fremden Fachrichtungen aufgenommen. Das Gebot der Einfachheit oder auch das Sparsamkeitsprinzip in der Wissenschaft ist als Ockhams Rasiermesser bekannt geworden. Ockhams Rasiermesser sagt aus, dass im Falle zweier konkurrierender Theorien die einfacheren der komplexeren vorgezogen werden sollte.^[1]

Das Konzept der reaktiven Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS) ist in den Lebenswissenschaften eine solche einfache und hochgradig erfolgreiche Theorie. Jeder lebende Organismus produziert ROS mithilfe der Fenton-Reaktion, wobei Fe^{2+} oder Cu^{+} Radikale wie $\cdot\text{OH}$ aus H_2O_2 produzieren. H_2O_2 ist hierbei ein Reaktionsprodukt von Flavoenzymen, entstanden durch unvollständige Reduktion von Sauerstoff. Weitere Faktoren wie Rauchen oder Umwelteinflüsse tragen zusätzlich zur Produktion von ROS im menschlichen Körper bei.^[2-4] Die hochreaktiven Sauerstoffradikale wie $\cdot\text{OH}$ reagieren wiederum mit wichtigen Biomolekülen, in erster Linie mit Lipiden und weiterhin mit DNA und Proteinen, und verändern diese chemisch, wobei die Funktion der Zelle gestört wird und diese letztlich abstirbt oder in einem komplexeren Organismus zur Krankheit führt. Die Produktion von ROS in lebenden Organismen ist unvermeidlich, und so haben alle Lebewesen effektive Entgiftungsstrategien entwickelt, um freie Radikale abzufangen. Die Enzyme Superoxid-Dismutase (SOD) und Catalase entgiften den Organismus beispielsweise von H_2O_2 , effektive Radikalfänger wie Ascorbinsäure (Vitamin C) reagieren mit freien Radikalen in der wässrigen Phase, und Tocopherole (Vitamin E) schützen Lipiddmembranen in der Lipidphase.^[2] Im Falle einer Störung des Gleichgewichtes von Radikal-

produktion und Entgiftung tritt der Zustand des oxidativen Stresses ein, ein passender und einprägsamer Begriff, der von Sies et al. eingeführt wurde.^[5] Das Konzept des oxidativen Stresses zur Erklärung der Ethologie einer Reihe degenerativer Krankheiten wurde mit Erfolg angewendet, unter anderem zur Erklärung der Entstehung von einigen Krebsarten sowie von Herz-Kreislauf- und Parkinson-Erkrankungen.^[3]

Als Folge dessen entwickelte sich die Theorie der Antioxidantien (Reduktionsmittel, die in der Lage sind, ROS abzufangen). Die Antioxidantientheorie besagt, dass sich alle Verbindungen, die in der Lage sind, ROS abzubauen, besonders solche, die täglich mit der Nahrung aufgenommen werden, positiv auf die menschliche Gesundheit auswirken. Eine Vielzahl von Verbindungen, vor allem die Polyphenole, eine Klasse allgegenwärtiger, pflanzlicher Sekundärmetabolite, zeigte in sämtlichen In-vivo- und In-vitro-Studien in Zellkulturen ausgezeichnete antioxidative Eigenschaften. Die Antioxidantientheorie ist mittlerweile Teil der wissenschaftlichen Allgemeinbildung geworden und wird auf zahlreichen Lebensmittelpackungen zur Werbung genutzt, häufig mit den Worten „reich an Antioxidantien“.

Im letzten Jahrzehnt kamen jedoch vermehrt Zweifel an der Antioxidantientheorie auf. Erstens konnten Bioverfügbarkeitsstudien eindeutig zeigen, dass die Plasmakonzentration von Antioxidantien aus der Nahrung, besonders die von Polyphenolen, sehr gering ist (in der Regel im nanomolaren Bereich). Es scheint nicht plausibel, dass bei solch geringen Konzentrationen Polyphenole dieselbe Aufgabe als Radikalfänger ausüben können wie Ascorbinsäure oder Tocopherole, die im Plasma in mikromolaren Konzentrationen vorliegen (z.B. Ascorbinsäure 50 μM , Tocopherole 30 μM). Zweitens wurde beobachtet, dass die meisten so genannten Antioxidantien aus der Nahrung intensiv von der Darmmikroflora metabolisiert werden, wobei der in der Regel reduktive Metabolismus der Darmbakterien lipophile Metabolite produziert, die eine erhöhte Bioverfügbarkeit aufweisen, zugleich aber schlechtere Antioxidantien in vitro sind.^[6] Zu guter Letzt wurden 30 Jahre nach der Formulierung der Antioxidantientheorie Biomarker entdeckt, die zuverlässige Informationen über den Redoxzustand des Organismus liefern. Als solche Biomarker fungieren oxidierte Prostaglandine (Isoprostane), die problemlos im menschlichen Urin aufgespürt werden können. Die Messung dieser Iso-

[*] Prof. Dr. N. Kuhnert

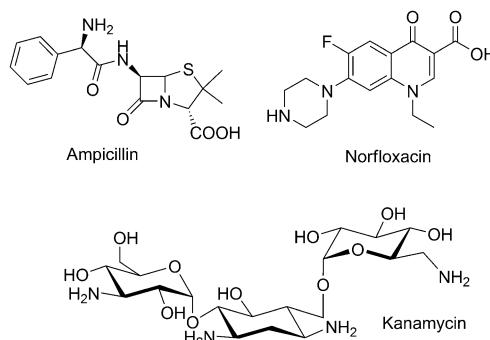
School of Engineering and Science, Chemistry
Jacobs University Bremen
Campusring 8, 28759 Bremen (Deutschland)
E-Mail: n.kuhnert@jacobs-university.de
Homepage: <http://www.jacobs-university.de/ses/nkuhnert>

[**] Dank gilt der Jacobs University für finanzielle Unterstützung.

prostane im Urin im Rahmen klinischer Interventionsstudien, entweder nach Verabreichung von hohen Dosen an antioxidativen Polyphenolen als Reinsubstanzen oder auch nach Verzehr von Nahrungsmitteln bestehend aus großen Mengen an Früchten und Gemüse (und somit reich an „Antioxidantien“), zeigten, dass die „antioxidativen“ Polyphenole in Wirklichkeit keinerlei Einfluss auf den Redoxstatus des Organismus hatten.^[5] Als Folge dessen kann die Antioxidantienhypothese als widerlegt betrachtet werden. Nach derzeitigem Wissensstand spielt der antioxidative Effekt nur eine kleine (oder vielleicht auch gar keine) Rolle für die gesundheitsförderlichen Effekte der Polyphenole.^[7] Leider hat allerdings jede wissenschaftliche Theorie, auch nachdem sie sich als ungültig erwiesen hat, eine sehr lange Halbwertszeit in der breiten Öffentlichkeit – und selbst in Fachkreisen.

Während in den meisten Fällen die Produktion von ROS für den Organismus schädlich ist, kann sie auch bei der Verteidigung gegen Feinde nützlich sein. Dieser Effekt wurde in der Literatur als prooxidativer Effekt beschrieben. So können alle Verbindungen, die in der Lage sind, die Konzentration von Fenton-Ionen zu erhöhen, den oxidativen Stress verstärken und die schädlichen freien Radikale als tödliche Waffe gegen alle Arten von Feinden einsetzen. Dieses Konzept wurde genutzt, um die präventive Wirkung einiger Polyphenole gegen Krebs^[8] ebenso wie den Mechanismus zu erklären, mit dem T-Lymphozyten der menschlichen Immunabwehr Invasoren unschädlich machen (Schema 1).

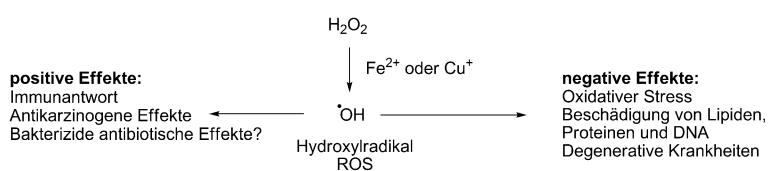
Vor einigen Jahren wurde dieses Konzept von Kohanski et al. herangezogen, um die bakterizide Wirkung vieler Antibiotika zu erklären und damit eine vereinheitlichte Theorie antibiotischer Wirkung zu entwickeln.^[9] Kohanski et al. konnten in einer Reihe eleganter Experimente überzeugend belegen, dass ausgewählte Antibiotika unterschiedlichster Verbindungsklassen, z. B. Ampicillin [ein β -Lactamantibiotikum (Zellwandbiosyntheseinhibitor)], Norfloxacin [ein Chinolonantibiotikum (DNA-Gyraseinhibitor)] und Kanamycin [ein Aminoglycosidantibiotikum (Inhibitor der bakteriellen Proteinbiosynthese)] (Schema 2), die eine bakterizide und keine bakteriostatische Aktivität gemeinsam haben, die ROS-Produktion in *Escherichia coli* mit tödlichem Ausgang für die Bakterien anschalten. Es wurde gefolgert, dass die Bindung der Antibiotika an ihre biologischen Targets eine untergeordnete Rolle für ihre bakterizide Aktivität spielt. Die Produktion von ROS wurde mithilfe eines $\cdot\text{OH}$ -spezifischen Farbstoffindikators (Hydroxyphenylfluorescein, HPF) nach Zugabe von H_2O_2 nachgewiesen. Die Oxidation des Farbstoffes wurde durch Zugabe eines typischen Radikalängers wie Thioharnstoff unterbunden. Die Autoren schlugen vor, dass die Produktion von ROS nach Schädigung von Fe-haltigen Enzymen und anschließender Freisetzung von



Schema 2. Antibiotika aus den Arbeiten von Kohanski et al., Imlay und Liu sowie Lewis et al.^[9,11,12]

Fe^{2+} -Ionen in die zelluläre Flüssigkeit erfolgte. Die erhöhte Produktion von $\cdot\text{OH}$ erfolgte durch die Fenton-Reaktion, die im Anschluss zur Schädigung von DNA und Proteinen und letztlich zum Zelltod führte. Die Zugabe von Fe^{2+} -Chelatoren hemmte den Zelltod. In einer Reihe weiterer differentieller Genexpressionsexperimente, auch mit Knock-out-Stämmen, konnten die Autoren zeigen, dass der katabolische Abbau von NADH als Folge einer metabolischen Antwort des Krebszyklus zu einer Freisetzung von Fe^{2+} -Ionen und somit zur Produktion von $\cdot\text{OH}$ in der Fenton-Reaktion führt. Das einfache Konzept der ROS-Theorie wurde auf ein weiteres wichtiges Feld der Wissenschaft übertragen und lieferte eine widerspruchsfreie Erklärung für den Wirkmechanismus bakterizider Antibiotika. Hoffnung wurde geweckt, dass diese Theorie zur Entwicklung neuer Antibiotika im Kampf gegen resistente Stämme führen würde. Die einzigen Kritikpunkte an den Arbeiten von Kohanski et al. waren, dass es zweifelhaft war, ob ein Farbstoff wirklich selektiv das hochreaktive $\cdot\text{OH}$ -Radikal nachweisen könnte, sowie die unrealistische Konzentration von 1 mM von eingesetztem H_2O_2 , die die experimentell ermittelte H_2O_2 -Konzentration von 0.15 μM in *E. coli* um den Faktor 6000 überschritt.^[10] Der letzte Punkt ist ein Fehler, der auch in ernährungsrelevanten Arbeiten zu Antioxidantien oft gemacht wurde und einige Verwirrung stiftete.

Zu Beginn dieses Jahres erschienen in *Science* zwei Arbeiten der Gruppen von Imlay^[11] und Lewis,^[12] die beide unabhängig voneinander in einer Reihe von gut durchdachten Experimenten demonstrierten konnten, dass das Konzept des durch ROS ausgelösten bakteriellen Zelltodes nicht haltbar ist. Beide Arbeitsgruppen setzten dieselben Antibiotika wie Kohanski et al. ein: Ampicillin, Kanamycin und Norfloxacin (allerdings in leicht unterschiedlichen Konzentrationen). Als Modellorganismus wurde in beiden Fällen *E. coli* eingesetzt,



Schema 1. Erzeugung von ROS und ihre Folgen für die menschliche Gesundheit.

wobei Lewis und Mitarbeiter noch zusätzliche Experimente mit *Pseudomonas aeruginosa* durchführten. Beide Gruppen konnten zeigen, dass bei Kultivierung der Bakterien unter anaeroben Bedingungen kein vermehrter Zelltod zu beobachten war. Somit konnte der Einfluss von Sauerstoff als Ausgangsmaterial für die vermehrte Produktion von H₂O₂ mit nachfolgendem Zelltod ausgeschlossen werden. Die Arbeitsgruppe von Imlay bestimmte EPR-spektroskopisch die intrazelluläre Fe²⁺-Konzentration und maß zudem die Konzentration von H₂O₂ im Wachstumsmedium im Anschluss an die Behandlung mit Antibiotika. Die Forscher fanden dabei keine Erhöhung der Konzentration beider Spezies nach Antibiotikazugabe. Weiterhin waren Mutanten, denen Catalase und SOD fehlten und die somit eine erhöhte intrazelluläre H₂O₂-Konzentration hatten, nicht empfindlicher gegen die eingesetzten Antibiotika. qRT-Polymerasekettenreaktionen (qRT = quantitative real time) des *oxyR*-Regulons, das bei H₂O₂-Konzentrationen oberhalb von 1 μM exprimiert wurde, zeigten weder einen Konzentrationsanstieg noch konnte eine Hypersensitivität von DNA-Reparaturmutanten beobachtet werden. Ein Anstieg der Überlebensrate im Anschluss an Thioharnstoffbehandlung konnte reproduziert werden, wogegen alternative Radikalfänger wie Ethanol keinen Einfluss auf die Überlebensrate der Bakterien hatten. Die Beobachtung von Kohanski et al., dass die Oxidation des HPF-Farbstoffes durch ·OH-Radikale erfolgte, wurde detailliert von der Arbeitsgruppe von Lewis untersucht. In einem Durchflussszytometrie-Experiment wurden fluoreszierende und nicht-fluoreszierende Zellen getrennt, und im Anschluss wurde beobachtet, dass beide getrennten Kolonien eine identische Überlebensrate aufwiesen. Zur Erklärung dieser Befundeschlugen Lewis et al. vor, dass sterbende Zellen andere Produkte als das ·OH-Radikal produzieren, die in der Lage sind, den Farbstoff zu oxidieren, während die Gruppe von Imlay auf Basis von In-vitro-Experimenten postulierte, dass FeO²⁺ – ein typisches Intermediat der Fenton-Reaktion – die Farbstoffoxidation verursacht.

Die Experimente der Arbeitsgruppen von Imlay und Lewis belegen überzeugend, dass ROS nicht für den Zelltod von Bakterien nach Antibiotikabehandlung verantwortlich sind. Das Konzept der ROS hat zweifelsohne seinen wertvollen Platz auf vielen Gebieten der biologischen Forschung, kann jedoch nicht verallgemeinert zur Erklärung des bakteriellen Zelltods herangezogen werden. Wie auch im Fall der

Antioxidantienhypothese wurde das ROS-Konzept, obwohl es einfach und elegant ist, im Bereich der Antibiotikafor schung widerlegt. Sowohl bei den „Antioxidantien“ als auch bei den bakteriziden Antibiotika beginnt die Suche nach dem Mechanismus ihrer biologischen Wirkung von Neuem.

Biologische Systeme sind von Natur aus komplex, und der vorliegende Fall zeigt: Auch wenn gut konzipierte Experimente eine oberflächlich betrachtet widerspruchsfreie neue Theorie zunächst zu bestätigen scheinen, bedarf es für deren zweifelsfreie Untermauerung dennoch einer größtmöglichen Zahl an Kontrollexperimenten. Bezüglich der Anwendung von Ockhams Rasiermesser in der Biologie darf man sich der Meinung von Francis Crick anschließen, der sagte: „Während Ockhams Rasiermesser ein nützliches Werkzeug in der Physik darstellt, ist es sehr gefährlich, es in der Biologie einzusetzen. Es ist unbesonnen, Einfachheit und Eleganz als Leitfaden für biologische Forschung einzusetzen“. [13]

Eingegangen am 27. Mai 2013

Online veröffentlicht am 3. September 2013

-
- [1] S. Roowi, A. Stalmach, W. Mullen, M. E. J. Lean, C. A. Edwards, A. Crozier, *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 1296–1304.
 - [2] B. Halliwell, J. M. C. Gutteridge, *Arch. Biochem. Biophys.* **1986**, *246*, 501–514.
 - [3] B. Halliwell, J. M. C. Gutteridge, C. E. Cross, *J. Lab. Clin. Med.* **1992**, *119*, 598–620.
 - [4] B. Halliwell, M. V. Clement, L. H. Long, *FEBS Lett.* **2000**, *486*, 10–13.
 - [5] P. C. H. Hollman, A. Cassidy, B. Comte, M. Heinonen, M. Richelle, E. Richling, M. Serafini, A. Scalbert, H. Sies, S. Vidry, *J. Nutr.* **2011**, *141*.
 - [6] A. Crozier, I. B. Jaganath, M. N. Clifford, *Nat. Prod. Rep.* **2009**, *26*, 1001–1043.
 - [7] P. C. H. Hollman, *Ann. Nutr. Metab.* **2013**, *62*, 149–150.
 - [8] H. Y. Khan, H. Zubair, M. F. Ullah, A. Ahmad, S. M. Hadi, *Curr. Drug Targets* **2012**, *13*, 1738–1749.
 - [9] M. A. Kohanski, D. J. Dwyer, B. Hayete, C. A. Lawrence, J. J. Collins, *Cell* **2007**, *130*, 797–810.
 - [10] B. Gonzalez-Flecha, B. Demple, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 13681–13687.
 - [11] Y. Liu, J. A. Imlay, *Science* **2013**, *339*, 1210–1213.
 - [12] I. Keren, Y. Wu, J. Inocencio, L. R. Mulcahy, K. Lewis, *Science* **2013**, *339*, 1213–1216.
 - [13] F. Crick, *What Mad Pursuit: A Personal View of Scientific Discovery*, **1988**, S. 138–146.
-