1 Einleitung und Zielsetzung

Pseudomonas aeruginosa ist ein weitverbreitetes opportunistisches Pathogen. Aufgrund seiner metabolischen Vielfältigkeit und seiner physiologischen Anpassungsfähigkeit ist das Bakterium in diversen Habitaten vorzufinden. Es ist die Ursache zahlreicher akuter und chronischer Infektionen [6], in Eukaryoten, wie dem Menschen, aber auch in Wirbeltieren, Pflanzen, Insekten oder Amoebien [157, 201, 205, 220]. In Krankenhäusern verursacht der Organismus 10 bis 15 % aller nosokomialen Infektionen [11]. *P. aeruginosa* ist verantwortlich für 16 % der nosokomialen Lungenentzündungen [208], 12 % der krankenhausassoziierten Harnwegsinfektionen [154], 10 % der Blutkreislaufinfektionen [57] sowie 8 % der chirurgischen Wundinfektionen [92]. Der Krankheitserreger weist eine Vielzahl an Virulenzfaktoren auf, dazu gehören zellassoziierte Faktoren, Exoenzyme und sekretorische Faktoren. Mehrere dieser Faktoren, als einzelne oder in Kombination, können schwere Gewebeschäden und Nekrosen im menschlichen Wirt verursachen [51, 94, 199]. Das Risiko einer Infektion wird durch die Anzahl der Virulenzfaktoren erhöht und ist insbesondere bei immungeschwächten Patienten eine häufige Todesursache [10, 41]. Die Behandlung einer *Pseudomonas*-Infektion wird insbesondere durch dessen intrinsische Resistenz erschwert.

Die beschriebenen Eigenschaften verdeutlichen wie wichtig die Forschungsarbeiten an diesem Krankheiterreger sind, vor allem in Hinblick auf dessen Virulenz- [6], Resistenz- [28] und Adaptationeigenschaften [77], sowie bei der Entwicklung von therapeutischen Behandlungsstrategien. Mikroevolution führt zu resistenzvermittelten Mutationen im Resistom des Bakteriums und bewirkt ein großes genetisches Repertoire und ein komplexes metabolisches Stoffwechselnetzwerk. Dies befähigt den Organismus zur adaptiven Resistenz und zu einem adaptiven Metabolismus [17, 45, 74]. Die Rate der Antibiotikaresistenzen in *P. aeruginosa* wächst weltweit an und es wird immer bedeutender diesen Organismus intensiv zu untersuchen [73]. Hierbei ist ein systemorientiertes Verständnis des metabolischen Netzwerks, das die Pathogenität von *P. aeruginosa* verursacht, wichtig, um auf dieser Grundlage neue Therapieansätze zu entwickeln [6]. Gebräuchliche und gut etablierte experimentelle Methoden, die zelluläre Prozesse eines Organismus auf systembiologischer Ebene untersuchen, sind die „Omics“-Technologien: Transkriptom-, Proteom- und Metabolomanalysen. Eine weitere „Omics“-Technologie, die stetig an Bedeutung zunimmt, ist die metabolische Flussanalyse (Fluxomics), die Untersuchungen der *in vivo*-Reaktionsaktivitäten des zentralen Kohlenstoffwechsels ermöglicht. Unter der Anwendung von ^{13}C-metabolischen

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

Flussanalysen lassen sich übliche und spezifische Stoffwechselwege untersuchen, die in pathogenen Organismen vorhanden sind. Es ist somit möglich, Targets im Stoffwechselweg für Behandlungsstrategien zu identifizieren [87, 135]. Die derzeit am häufigsten eingesetzte Behandlungsmethode gegen *P. aeruginosa*-Infektionen ist der Einsatz von Antibiotika. Es gibt unterschiedliche Wirkklassen von Antibiotika. So sind die Fluorochinolone Ciprofloxacin und Norfloxacin Gyrasehemmer, das ß-Lactamantibiotikum Ampicillin ist ein Zellwandsynthesehemmer und Kanamycin, ein Aminoglycoside, das die Proteinbiosynthese beeinflusst. Die Gemeinsamkeit aller dieser Antibiotika ist es, dass sie als oxidative Stressagenzien fungieren [67, 131].

Der Co-Faktor NADPH ist bei der Bekämpfung von toxischen und reaktiven Sauerstoffspezien beteiligt und wird in Reaktionen des zentralen Kohlenstoffmetabolismus generiert. Die metabolische Flussanalyse eignet sich als Hilfsmittel, um den NADPH-Stoffwechsel von Organismen zu charakterisieren. *P. aeruginosa* enthält vier Enzyme im Zentralstoffwechsel, die NADPH produzieren. Die NADPH-generierenden Enzyme Glucose-6-phosphatdehydrogenase und 6-Phosphogluconatdehydrogenase sind im Glucosekatabolismus involviert. Weiterhin fungiert das Malatenzym als Teil der anaplerotischen Reaktionen als NADPH-Lieferant sowie die Isocitratdehydrogenase, die im Citratzyklus agiert. Frühere Studien haben gezeigt, dass der zentrale Kohlenstoffmetabolismus in der adaptiven Evolution [74] und in der Erwerbung von Resistenzen involviert ist [56, 86]. Für den Citratzyklus ist bekannt, dass er an der adaptiven Evolution beteiligt ist [74]. Er kann nun mit Hilfe der metabolischen Flussanalyse in Hinblick auf oxidativen Stress näher untersucht werden.

Das Ziel dieser Arbeit besteht darin, mit Hilfe der systemorientierten metabolischen Flussanalyse, Stoffwechselwege von *P. aeruginosa* aufzudecken und zu charakterisieren, die mögliche Targets für neue Behandlungsstrategien darstellen. Die Vorgehensweise und Zusammenführung von experimentellen und Modellierungsarbeiten zu einer metabolischen Analyse ist in **Abbildung 1.1** dargestellt.

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

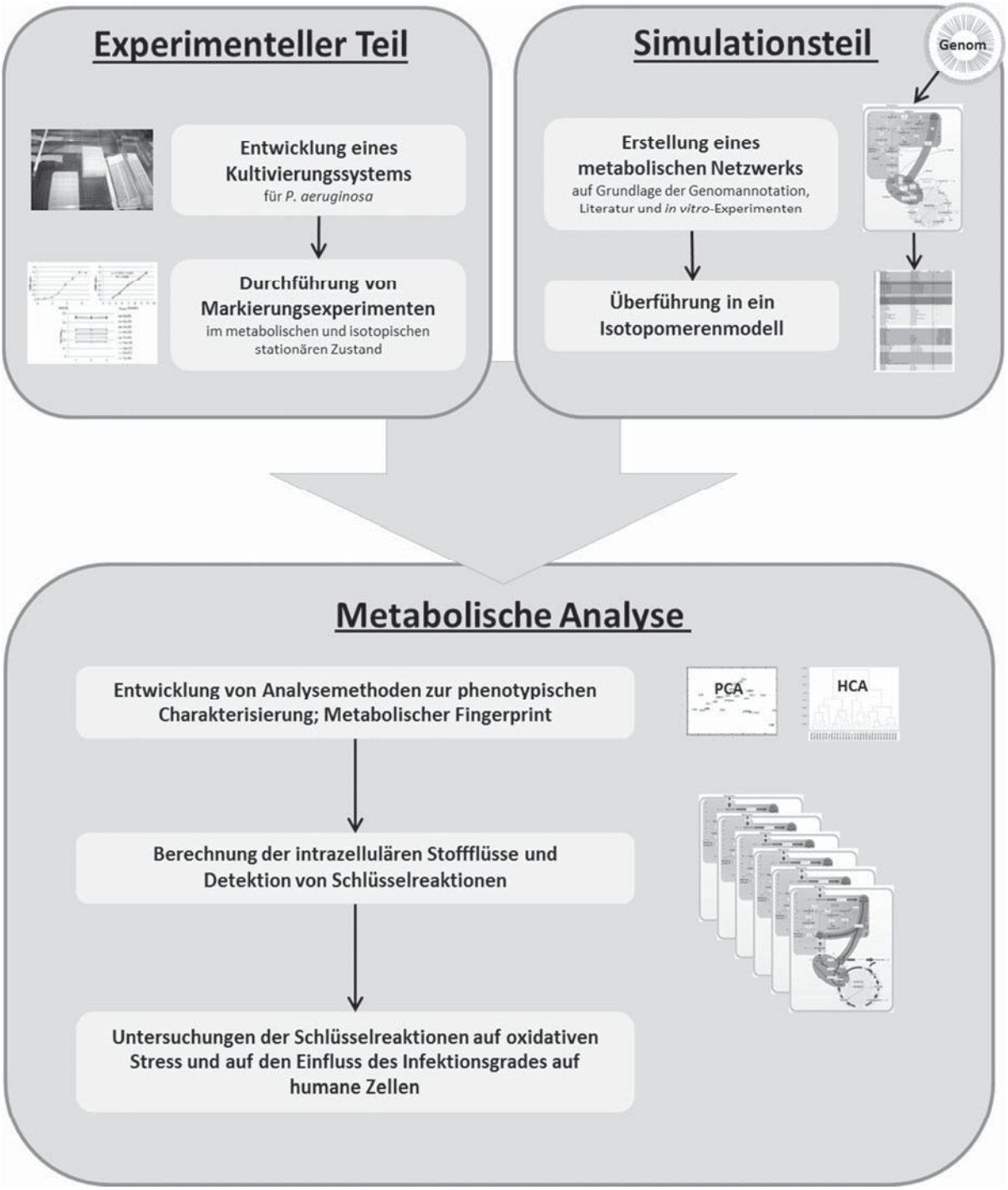

Abbildung 1.1: Das Fließschema zeigt die Verknüpfung von experimentellen Arbeiten und Simulationsanalysen zur Etablierung einer metabolischen Flussanalyse und zur Detektion von Schlüsselreaktionen des zentralen Kohlenstoffwechsels für mögliche Behandlungsstrategien (HCA: Hierachische Clusteranalyse, PCA: Hauptkomponentenanalyse).

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

Im experimentellen Teil wird zunächst ein Kultivierungssystem für *P. aeruginosa* etabliert, um somit die Grundlage für Markierungsexperimente zu schaffen. Parallel dazu wird im Simulationsteil ein metabolisches Netzwerk auf der Grundlage von Genomannotationen, Literatur und *in vitro*-Experimenten erstellt und dieses in ein Isotopomerenmodell überführt. Anschließend werden Analysemethoden zur phenotypischen Charakterisierung der untersuchten *P. aeruginosa*-Stämme entwickelt sowie intrazelluläre Stoffflüsse berechnet. Die Analyse der metabolischen Flüsse soll zur Detektion von Schlüsselreaktionen führen, die mit Hilfe von oxidativen Stresstests näher untersucht werden und eine Beurteilung des Einflusses auf den Infektionsgrad auf humanen Zellen erlaubt.

Um die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit zu erreichen, werden folgende Teilaspekte nähergehend untersucht:

- Etablierung eines Kultivierungssystems für *P. aeruginosa* – „scale-down“ für High-Throughput-Screening auf metabolischer Flussebene

  Da Markierungsexperimente vergleichsweise kostenintensiv sind und auf eine Vielzahl von klinischen *P. aeruginosa*-Isolaten angewendet werden sollen, muss zunächst ein miniaturisiertes Kultivierungssystem etabliert werden, das den Standardbedingungen einer metabolischen Flussanalyse entspricht.

- High-Throughput-Screening auf physiologischer Ebene

  Unter Anwendung des Kultivierungssystems sollen *P. aeruginosa*-Isolate aus Harnwegsinfektionen und katheterassoziierten Harnwegsinfektionen im Hinblick auf ihren physiologischen Eigenschaften charakterisiert werden.

- Entwicklung des metabolischen Reaktionsnetzwerks und des Isotopomerenmodells

  Für die Etablierung einer metabolischen Flussanalyse muss zunächst ein Reaktionsmodell des zentralen Kohlenstoffwechsels erarbeitet werden. Dies soll auf Basis der Genomannotierung von *P. aeruginosa* PAO1 [144], der *Pseudomonas*-Datenbank, sowie mit *in vitro*-Experimenten entwickelt werden. Anschließend wird ein Isotopomerenmodell auf Grundlage des metabolischen Netzwerks abgeleitet.

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

- High-Throughput-Screening auf metabolischer Ebene

  Die metabolische Flussanalyse wird im High-Throughput-Verfahren auf klinische *P. aeruginosa*-Isolate angewendet, um die Isolate phenotypisch zu charakterisieren. Hierfür müssen Analysemethoden entwickelt werden. Weiterhin sollen Schlüsselreaktionen des zentralen Kohlenstoffwechsels herausgearbeitet und der NADPH-Metabolismus untersucht werden.

- Einfluss der Schlüsselreaktionen auf den Infektionsgrad

  In weiteren Studien wird der Einfluss der *in vivo*-Aktivitäten der NADPH-produzierenden Enzyme auf die oxidativen Stresstoleranz betrachtet und Schlüsselenzyme detektiert. Abschließend wird der Einfluss dieser Enzyme auf den Infektionsgrad auf humanen Zellen untersucht.

Die erhaltenen Ergebnisse sollen einerseits sensitive Charakterisierungsmethoden zur Unterscheidung von *P. aeruginosa*-Isolaten aus unterschiedlichen Infektionsorten auf metabolischer Ebene aufzeigen und andererseits Schlüsselreaktionen identifizieren, die in zukünftigen möglichen nachhaltigen Behandlungsstrategien berücksichtigt werden können.

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

2 Aktueller Stand der Wissenschaft und Forschung

2.1 Harnwegsinfektion und dessen Erreger

Uropathogene Mikroorganismen sind Erreger von Harnwegsinfektionen. Unter einer Harnwegsinfektion versteht man eine entzündliche Erkrankung der unteren ggf. auch der oberen Harnwege, die vor allem durch einen bakteriellen Befall ausgelöst wird [155]. Mit 24,8 % sind Harnwegsinfektionen in Deutschland nach einer Studie des Bundesgesundheitsministerium die zweithäufigste nosokomiale Form der Erkrankung in Krankenhäusern (Tabelle 2.1) [9]. Bis zu 90 % der Fälle von Harnwegsinfektionen werden durch den Einsatz von Harnwegskathetern verursacht [122, 166]. Ist eine Harnwegsinfektion auf den Einsatz von Kathetern zurückzuführen, dann werden diese als katheterassoziierte Harnwegsinfektionen bezeichnet. Das Risiko einer Infektion steigt mit jeden Tag um 3 bis 10 % im Verlauf einer Katheterisierung [72].

Tabelle 2.1: Die häufigsten nosokomialen Infektionen (NI). Die Daten stammen aus einer nationalen Prävalenzstudie zu NI in Deutschland [9].

Infektionsart	Anteil Patienten mit NI (%)
Postoperative Wundinfektion	25,7
Harnwegsinfektion	24,8
Untere Atemwegsinfektion	23,0
Clostridium difficile-Infektion	6,8
andere	19,7

In der Medizin wird von einer Harnwegsinfektion gesprochen, wenn sich mehr als 1 x 10^5 Keime pro mL im Urin des Patienten befinden, wobei häufig vorkommende Bakterien (Tabelle 2.2), wie *Escherichia coli, Klebsiella pneumonia* oder *Proteus mirabilis* meist zur normalen Darmflora gehören. So sind z. B. lediglich 20 % der *E. coli*-Harnwegserreger tatsächlich an einer Infektion beteiligt [130]. Andere Mikroorganismen, wie *Pseudomonas aeruginosa*, nehmen in Harnwegsinfektionen eine größere Bedeutung ein. Die Sterblichkeitsrate von Patienten mit Antibiotika-sensitiven Erregern liegt bei 23 %. Handelt es sich bei dem Erreger um einen multiresistenten Keim, d. h. ist er gegen mindestens drei antipseudomonalen Antibiotika resistent, so steigt die Sterblichkeitsrate auf 67 % an [145]. Zu den antipseudomonalen

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

Antibiotika werden β-Lactame (z. B. Piperacilina oder Imipenem), Fluorchinolone (z. B. Ciprofloxacin) und Aminoglycoside (Gentamycin oder Tobramycin) gezählt.

Tabelle 2.2: Die häufigsten Erreger bei Patienten mit Harnwegsinfektionen. Die Daten stammen aus einer nationalen Prävalenzstudie zu NI in Deutschland [9].

Erreger	Anteil (%)
Escherichia coli	36,7
Enterococcus faecalis	9,2
Enterococcus faecium	7,2
Klebsiella pneumonia	5,1
Pseudomonas aeruginosa	5,1
Proteus mirabilis	4,1
andere	32,6

2.2 Bedeutung von *Pseudomonas aeruginosa* als Krankheitserreger

P. aeruginosa ist ein opportunistisches Human-, Pflanzen- und Tierpathogen. Es ist Gram-negativ, nicht sporenbildend, stäbchenförmig und monotrich polar begeißelt. Das Bakterium wurde in die Familie der Gammaproteobacteria eingeordnet [112] und ist ubiquitär in terrestrischen und aquatischen Habitaten zu finden [59]. Die ökologische Vielseitigkeit und Anpassungsfähigkeit des Organismus ist auch am großen Genom mit 6,3 Mb von *P. aeruginosa* PAO1 wiederzuerkennen [189]. Es umfasst einen hohen Anteil von regulatorischen Genen, die in der transkriptionellen Regulation, wie z.B. im Zweikomponentensystem, involviert sind. Weiterhin sind im Genom eine Vielzahl an Genen für den Katabolismus und Transport sowie für Effluxpumpen annotiert [189]. Unter den *P. aeruginosa*-Stämmen variiert die Genomgröße zwischen 5 bis 7 Mb [118, 175]. Dies ist auf eine Vielzahl von genomischen Inseln und hypervariablen Regionen zurückzuführen. Die genetischen Charakteristiken befähigen den Organismus sich an verschiedene Umweltbedingungen, verbunden mit der Ausbildung von Virulenzfaktoren und Antibiotikaresistenzen, anzupassen [84]. Der Anteil von antibiotikaresistenten *P. aeruginosa*-Erregern ist aufgrund der gängigen Verabreichung von Antibiotika gegen Harnwegsinfektionen sehr hoch und nimmt stetig zu (Tabelle 2.3).

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

Tabelle 2.3: Antibiotikaresistenz von *P. aeruginosa* isoliert aus verschiedenen klinischen Proben (2012) [158].

Antibiotikum	Resistenz (%)
Piperacilin	50
Imipenem	14
Ciprofloxacin	49
Gentamycin	63
Tobramycin	68

2.2.1 Resistom von *P. aeruginosa*

Mit der Entdeckung von Antibiotika zu Beginn des 20. Jahrhunderts und ihrer Einführung in die pharmazeutische Anwendung in den 1940-er und 1950-er Jahren wurde angenommen, dass die Ursache von Infektionskrankheiten besiegt sei. Mikroorganismen entwickelten jedoch zelluläre Mechanismen, die eine Resistenz gegen Antibiotika und damit ein Überleben erlauben.

Das sogenannte Resistom umfasst alle Gene, die für die Antibiotikaresistenz eines Organismus verantwortlich sind [218]. *P. aeruginosa* hat über die Jahre eine Vielzahl an Resistenzmechanismen entwickelt, die eine Behandlung des Pathogens erschweren. Die Mechanismen lassen sich in die drei Klassen der intrinsischen, adaptiven und erworbenen Resistenz einteilen (Tabelle 2.3).

Tabelle 2.4: Überblick über die unterschiedlichen Arten der Resistenzen, die *P. aeruginosa* enthält [17].

Resistenz-klasse	Stabil/ vererbbar	Umwelt-abhängig	Mechanismen
Intrinsisch	+	-	• Geringe äußere Membranpermeabilität • ß-Laktamaseproduktion • Efffluxpumpenüberproduktion
Erworben	+	-	• Horziontaler Gentransfer • Mutationen, die zur Reduktion der Antibiotikaaufnahme und Effluxpumpenüberexpression führen
Adaptiv	-	+	• Faktoren, die die Expression von regulatorischen Genen triggern und zu Genexpressionsänderungen von ß-Lactam und Effluxpumpenüberexpression führen

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

Die intrinsische Resistenz ist ein spezifischer Phenotyp, der Einfluss auf die Antibiotikaempfänglichkeit nimmt. Dieser Phenotyp wirkt nicht spezifisch durch einen selektiven Druck von z.B. Antibiotika, sondern bakterienspezifisch [182]. So ist die Permeabilität der äußeren Membran von *P. aeruginosa* 12- bis 100-mal geringer als die von *E. coli* [65]. Die äußere Membran agiert bei Gram-negativen Bakterien als selektive Barriere für die Aufnahme von Antibiotika [142]. Die Fähigkeit β-Laktamase zu exprimieren oder schnelle Effluxpumpen zu besitzen, ist ebenfalls für *P. aeruginosa* spezifisch [2, 31].

Bei der adaptiven oder phenotypischen Resistenz erfolgt eine vorübergehende Abwehr nicht durch genetische Änderungen, sondern durch Anpassung der Genexpression [104]. Die adaptive Resistenz ist induzierbar und abhängig von der Anwesenheit eines Antibiotikums oder eines Umweltreizes. Das Genom von *P. aeruginosa* umfasst ein großes Repertoire an regulatorischen Genen (9,4 % von allen Genen) [189]. Ein bekannter adaptiver Resistenzmechanismus ist die Induktion der β-Laktamase (kodiert durch das Gen *ampC*) in Anwesenheit eines β-Laktamantibiotikums, wie beispielsweise Piperacilin [167]. Ein weiterer Mechanismus ist die Überexpression von Genen, die für Effluxpumpen kodieren. Aminoglycoside (Gentamycin, Tobramycin) induzieren die MexXY-Effluxpumpe [75]. Durch die Hochregulation der Pumpenexpression werden die Antibiotika schneller aus dem Organismus ausgeschleust und können ihre Wirkung nicht entfalten.

Neben adaptiven und intrinsischen Resistenzmechanismen, kann *P. aeruginosa* auch Antibiotikaabwehrsysteme durch horizontalen Gentransfer oder durch Mutation erwerben bzw. dessen Effizienz steigern. DNA-Elemente, wie Plasmide, Transposons, Integrons oder Prophagen, die Antibiotikaresistenzgene tragen, können durch Konjugation, Transformation oder Transduktion erworben werden. Dies kann dazu führen, dass ein Erreger resistent oder sogar multiresistent wird. Ein Beispiel sind aminoglycosidmodifzierende Enzyme, die auf mobilen Genelementen liegen. Durch eine enzymatische Modifikation der verabreichten Aminoglycoside wird die Affinität des Antibiotikums zur 30S-ribosomalen Untereinheiten, die Hauptbindestelle der Aminoglycoside, herabgesetzt [198]. Eine weitere Erwerbung von Resistenzeigenschaften kann durch spontante Mutationen erfolgen. Die Häufigkeit mit der eine Mutation auftritt, variiert zwischen den unterschiedlichen Antibiotika und Behandlungsbedingungen zwischen 10^{-6} und 10^{-9} sehr stark. So ist die Mutationsrate in Anwesenheit von DNA-schädlichen Agentien oder während des Wachstums in Biofilmen stark erhöht [32, 193].

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.