

Antibiotikaaufnahme über Eisentransportsysteme

Volkmar Braun, Mikrobiologie/Membranphysiologie, Universität Tübingen

► Die meisten Antibiotika gelangen über Diffusion in Bakterien^[1]. Dazu müssen sie die Cytoplasmamembran überwinden und bei Gram-negativen Bakterien zusätzlich die äußere Membran. Die äußere Zellwand der Gram-positiven Bakterien behindert in der Regel den Eintritt der Antibiotika nicht. Gram-negative Bakterien sind daher gegen viele Antibiotika resistenter als Gram-positive, etwa gegen β -Lactamantibiotika und andere Antibiotika, die die späten Schritte der Mureinbiosynthese außerhalb der Cytoplasmamembran hemmen. Dies gilt vor allem für solche Antibiotika, die zu groß oder zu hydrophob sind, um schnell durch die Poren der Porine zu diffundieren^[2]. Jedoch lässt sich die äußere Membran vorteilhaft nutzen, wenn aktive Transportsysteme für Nährstoffe als Antibiotikatransporter missbraucht werden. Die Umwandlung von diffundierenden Antibiotika in aktiv transportierte Antibiotika erhöht die Empfindlichkeit der Bakterien um mehr als das Hundertfache^[3].

Eisentransport von Bakterien

Die Unlöslichkeit dreiwertigen Eisens unter physiologischen Bedingungen stellt Bakterien (wie alle aeroben Bedingungen ausgesetzte Organismen) vor das Problem, ihren Eisenbedarf zu decken, um vor allem Eisen

enthaltende Redoxenzyme zu synthetisieren. Bakterien bilden niedermolekulare Eisenkomplexbildner, die Siderophore, und/oder verwenden Eisenverbindungen ihrer Wirtsorganismen, wie freies Häm, Häm in Hämoglobin, Hämopexin oder Fe^{3+} in Transferrin und Lactoferrin. Die Siderophore werden ausgeschieden, komplexieren Fe^{3+} mit Bindekonstanten in der Größenordnung von 10^{20} und werden über spezifische Transportsysteme aktiv in die Zellen transportiert. Gram-negative Bakterien binden alle Eisenkomplexverbindungen an hochspezifische Rezeptorproteine der äußeren Membran. Die Rezeptorproteine dienen als Transporter durch die äußere Membran, die alle über das TonB-Protein an die Protonen-motorische Kraft der Cytoplasmamembran gekoppelt sind. Schon in den 60er-Jahren wurden in einem breit angelegten „Screening“ nach Antibiotika Siderophore als schwach wirksame Antibiotika identifiziert. Unter den antibiotisch wirksamen Siderophorverbindungen waren aber auch echte Antibiotika, die hoch wirksam waren und als Sideromycine bezeichnet wurden^[4].

Sideromycintransport

Das am besten untersuchte Sideromycin ist Albomycin (ursprünglich isoliert aus *Ac-*

tinomyces subtropicus). Es gelangt über das Ferrichromtransportsystem aktiv durch beide Membranen. Im Cytoplasma muss der Träger vom antibiotisch aktiven Thioribosyl-Pyrimidinderivat gespalten werden, damit letzteres wirksam wird^[5,6]. Das Thioribosyl-Pyrimidinderivat hemmt *in vitro* die Seryl-tRNA-Synthetase. Es wirkt gegen lebende Zellen schwächer als Albomycin^[7].

Albomycin konnte zusammen mit dem FhuA-Transportprotein kristallisiert werden^[8]. Die Kristallstruktur (Abb. 1) zeigt bei einer Auflösung von 3,1 Å, dass der Ferrichrom-ähnliche Träger von den gleichen zehn Aminosäureresten gebunden wird wie Ferrichrom. Der Thioribosyl-Pyrimidinrest kann zwei unterschiedliche Konformationen einnehmen – eine kompakte und eine ausgedehnte (Abb. 2), die über jeweils vier zusätzliche Reste fixiert sind, von denen einer gemeinsam ist. Der Thioribosyl-Pyrimidinrest sitzt in der FhuA-Tasche über der Zelloberfläche, durch die der Träger Zugang zur Ferrichrom-Bindestelle gewinnt. Die Bindung von Albomycin induziert Strukturänderungen im FhuA-Transporter. FhuA besteht aus zwei unterschiedlichen Struktur- und Funktionsdomänen. Das „ β -Barrel“ wird von der Sequenz 161–714 gebildet und ist aus 22 antiparallelen β -Strängen zusammengesetzt. Der Kanal im β -Barrel wird vom globulären Korken hermetisch verschlossen. Bei der Bindung von Albomycin bewegt sich der Korken etwa 2 Å auf die Bindestelle zu. Im N-proximalen Teil des Korkens, der dem Periplasma zugewandt ist, löst sich eine kurze Helix auf, die Fixierung in einer Tasche des β -Barrels wird aufgehoben, und die Reste Ser20 und W22 schwingen um 17 Å auf die gegenüber liegende Seite (deshalb auch „Switch Helix“ genannt). Man nimmt an, dass durch diese Bewegung die Region von FhuA, die an TonB bindet, die TonB-Box (Reste 7–11)^[9], besser an TonB binden kann. In der Tat wird FhuA durch kovalente Fixierung der Switch Helix über eingeführte Disulfidbrücken an das β -Barrel inaktiviert^[10]. Die Bewegungen des Korkens relativ zum β -Barrel öffnen den Kanal nicht. Vermutlich ist hierzu Energie notwendig, die von der Protonen-motorischen Kraft der Cytoplasmamembran über TonB auf FhuA in Form potenzieller Konformationsenergie übertragen wird.

Sideromycine vom Hydroxamattyp wie Ferrichrom sind Ferrimycin A und Salmycin. Ferrimycin und Salmycin werden über das Ferrioxamintransportsystem in Bakterien transportiert. Der antibiotisch aktive Teil von Salmycin ist ein Disaccharid, das die Proteinsynthese hemmt^[11]. Die Wirkungsweise von Ferrimycin ist unbekannt.

In einer weiteren Klasse von Siderophoren wird Fe^{3+} über Catecholate gebunden.

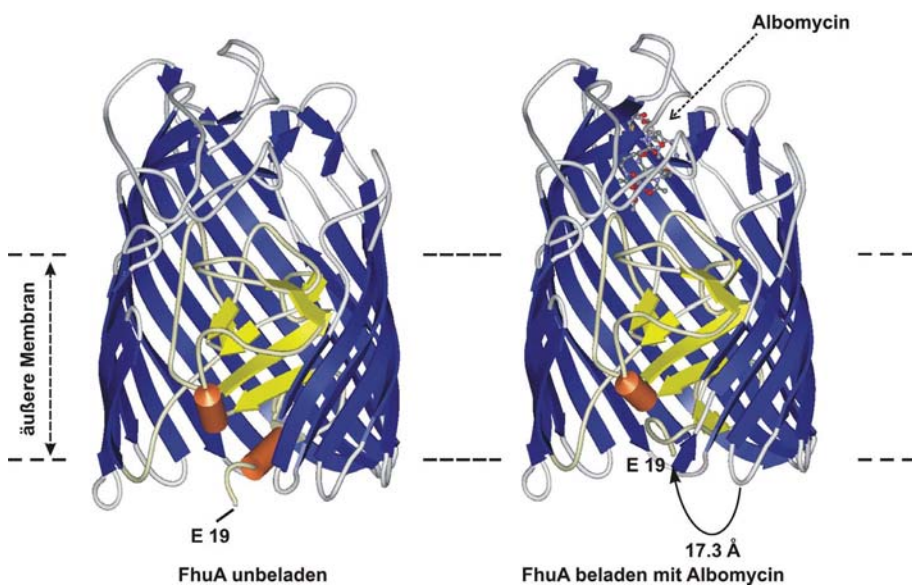


Abb. 1: Kristallstruktur des FhuA-Transportproteins ohne und mit gebundenem Albomycin. Ein Teil des blau markierten β -Barrels wurde weggelassen, um den gelb markierten globulären Korken im Kanal des β -Barrels besser sichtbar zu machen. Der Pfeil zeigt die Bewegung des Glutamatrests E19 um 17,3 Å bei der Bindung von Albomycin

Der Prototyp ist Enterobactin (Enteroche-
lin) aus Enterobacteriaceen. Natürlich vor-
kommende Sideromycine sind nicht be-
kannt. Jedoch wurden semisynthetische Ce-
phalosporine gewonnen (Abb. 2), deren mehr
als 100fach gesteigerte Aktivität dem akti-
ven Transport durch die äußere Membran
von *E. coli* zugeschrieben wurde^[12]. Für Ce-
phalosporine als Hemmstoffe der im Peri-
plasma stattfindenden Quervernetzung des
Mureins genügt zur Aktivitätssteigerung der
energiegekoppelte Transport durch die
äußere Membran.

Transport eines Rifamycin-Derivats

CGP 4832 ist ein semisynthetisches Rifamy-
cinderivat, das gegen *E. coli* zweihundert
Mal aktiver ist als Rifamycin. Die gesteigerte
Aktivität von CGP 4832 wurde durch
den aktiven Transport über das FhuA-Pro-
tein in das Periplasma erklärt^[13]. Da keine
weiteren Transportmutanten isoliert wurden,

geht man davon aus, dass der steile Kon-
zentrationgradient von dem im Periplasma
angehäuftes CGP 4832 in das Cytoplasma
ausreicht, um die Diffusion zu beschleu-
nigen. Merkwürdig ist, dass CGP 4832 ohne
chemische Strukturähnlichkeit zu Fer-
richrom von FhuA transportiert wird (Abb. 2).
Dies gab Anlass zur Bestimmung der Raum-
struktur von CGP 4832, gebunden an
FhuA^[13]. CGP 4832 bindet an die selbe Ste-
lle wie Ferrichrom (9 von 10 identische Bin-
destellen) und interagiert mit acht weiteren
Resten, bevorzugt mit den Strukturelemen-
ten, mit denen es sich von Rifamycin unter-
scheidet.

Transportsysteme für Antibiotika

Die Verwendung aktiver Transportsysteme,
um Antibiotika an ihren Wirkort zu bringen,
erweist sich als geeignet, die Eindringungs-
resistenz zu umgehen, die minimale Hemm-
konzentration um mehr als das Hundertfa-

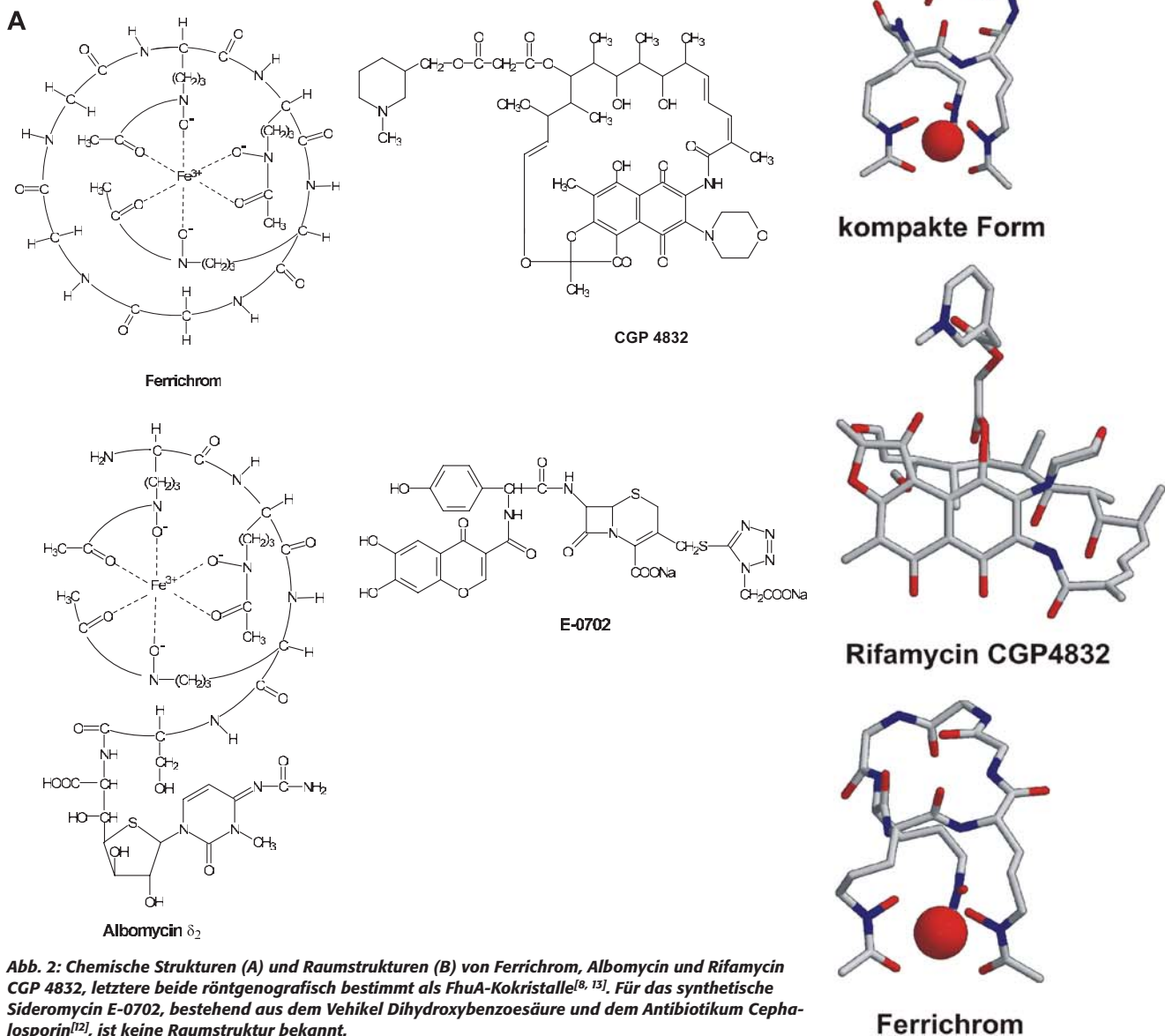


Abb. 2: Chemische Strukturen (A) und Raumstrukturen (B) von Ferrichrom, Albomycin und Rifamycin CGP 4832, letztere beide röntgenografisch bestimmt als FhuA-Kokristalle^[8, 13]. Für das synthetische Sideromycin E-0702, bestehend aus dem Vehikel Dihydroxybenzoesäure und dem Antibiotikum Cephalosporin^[12], ist keine Raumstruktur bekannt.

che zu steigern und damit auch deutlich unter die toxische Konzentration zu gelangen. Die Transportsysteme tolerieren in einem erheblichen Maß die Anheftung strukturfremder Moleküle an die transportierten Moleküle und, wie das Beispiel Rifamycin CGP 4832 zeigt, auch ganz andere Moleküle, so lange sie Strukturelemente enthalten, die in das aktive Zentrum der Transporter passen. Tierversuche und klinische Studien werden zeigen müssen, ob Bakterien rasch durch Mutationen in den Transportgenen resistent werden und wie lang Resistenze überleben und sich verbreiten.

Danksagung

Die Deutsche Forschungsgemeinschaft und der Fonds der Chemischen Industrie unterstützten dankenswerterweise unsere Arbeiten. Die Abbildungen wurden von Michael Braun zusammengestellt.

Literatur

- [1] **Nikaido, H.** (1994): Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Science* 264: 382–388.
- [2] **Benz, R.** (1994): Uptake of solutes through bacterial outer membranes. In: Ghuyen J.-M. and Hakenbeck R. (Hrsg.). *Bacterial cell wall*. Elsevier, Amsterdam, 397–423.
- [3] **Braun, V.** (1999): Active transport of siderophore-mimicking antibacterials across the outer membrane. *Drug Res. Updates* 2: 363–369.
- [4] **Bickel, J., Gäumann, E., Keller-Schierlein, W., Prelog, V., Vischer, E., Wettstein A., Zähler, H.** (1960): Über eisenhaltige Wachstumsfaktoren, die Sideramine und ihre Antagonisten, die eisenhaltigen Antibiotika Sideromycine. *Experientia* 16: 128.
- [5] **Hartmann, A., Fiedler, H.-P., Braun, V.** (1979): Uptake and conversion of the antibiotic albomycin by *Escherichia coli* K-12. *Eur. J. Biochem.* 99: 517–524.
- [6] **Braun, V., Günther, K., Hantke, K., Zimmermann, L.** (1983): Intracellular activation of albomycin in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 156: 308–315.
- [7] **Stefanska, A. L., Fulston, M., Houge-Frydrych, C., S., V., Jones, J., J., Warr, S., R.** (2000): A potent seryl tRNA synthetase inhibitor SB-217452 isolated from a *Streptomyces* species. *J. Antibiotics* 53: 1346–1353.
- [8] **Ferguson, A. D., Braun, V., Fiedler, H.-P., Coulton, J. W., Diederichs, K., Welte, W.** (2000): Crystal structure of the antibiotic albomycin in complex with the outer membrane transporter FhuA. *Protein Science* 9: 956–963.
- [9] **Schöffler, H., Braun, V.** (1989): Transport across the outer membrane of *Escherichia coli* via the FhuA receptor is regulated by the TonB protein of the cytoplasmic membrane. *Mol. Gen. Genet.* 217: 378–383.
- [10] **Endriß, F., Braun, M., Killmann, H., Braun, V.** Mutant analysis of the *Escherichia coli* FhuA protein uncovers important sites of FhuA activity. *Bacteriol* 185: August 2003.
- [11] **Vertesy, L., Aretz, W., Fehlhaber, H.-W., Kogler, H.** (1995): Salmycins A-D, antibiotics from *Streptomyces violaceus* DSM 8286 having a siderophore-aminoglycoside structure. *Helv. Chim. Acta.* 78: 46–60.
- [12] **Curtiss, N., A., C., Eisenstadt, R., L., East, S. J., Cornford, R.J., Walker, R.A., White, A.J.** (1988): Iron regulated outer membrane proteins of *Escherichia coli* K-12 and mechanisms of action of catechol-substituted cephalosporins. *Antimicrobial Agents Chemother.* 32: 1879–1886
- [13] **Ferguson, A.D., Ködding, J., Walker, G., Bös, C., Coulton, J.W., Diederichs, K., Braun, V., Welte, W.** (2001) Crystal structure of a semisynthetic rifamycin derivative in complex with the active outer membrane transporter FhuA from *Escherichia coli* K-12. *Structure* 9: 707–716.

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Volkmar Braun
Mikrobiologie /
Membranphysiologie
Universität Tübingen
Auf der Morgenstelle 28
D-72076 Tübingen
Tel. 07071-2972096
Fax 07071-295843
volkmar.braun@mikrobio.uni-tuebingen.de