

Strukturbiologie

Peristaltischer Antibiotika-Transport durch ein Multidrug-Resistenzprotein

KAY DIEDERICH¹ UND KLAAS M. POS²

¹UNIVERSITÄT KONSTANZ, ²UNIVERSITÄT ZÜRICH

Bakterien verwenden Transportproteine, um schädliche Substanzen (etwa Antibiotika) aus der Zelle zu pumpen. Wir zeigen, dass AcrB aus *E. coli* diese Aufgabe mithilfe eines Mechanismus analog zu dem einer Quetschpumpe bewältigt.

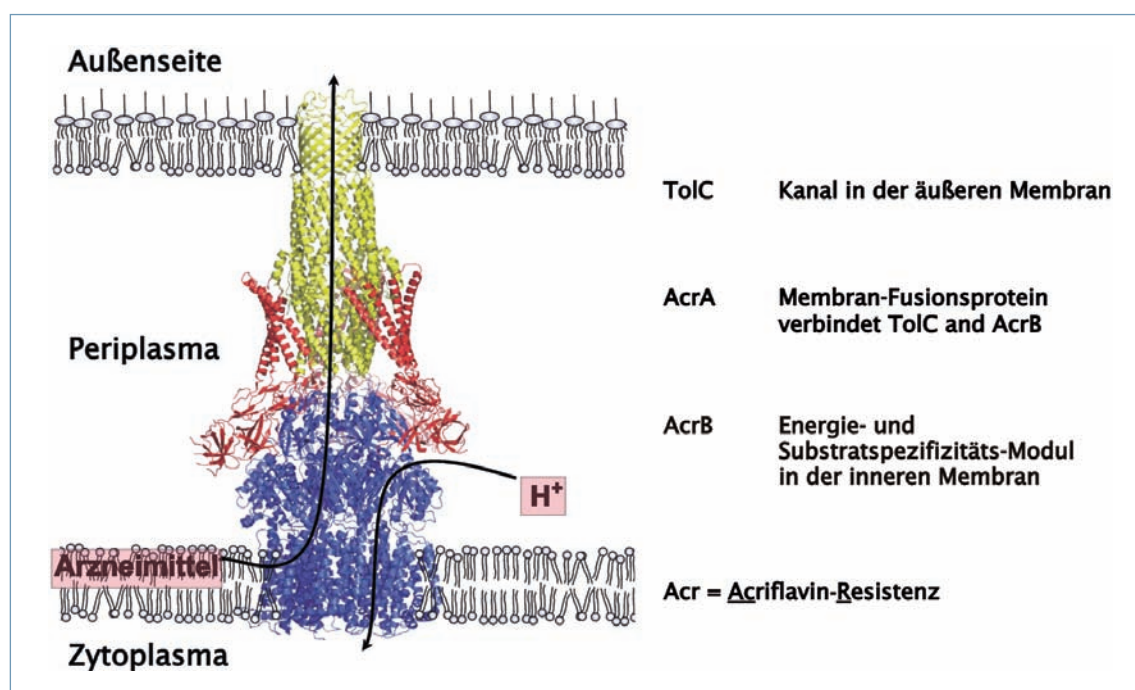
■ Der schottische Bakteriologe Sir Alexander Fleming (Nobelpreis für Physiologie oder Medizin 1945) entdeckte im Jahre 1928 durch Zufall das Antibiotikum Penicillin, das 1941 erstmals als Medikament eingesetzt und seit 1943 in Massenproduktion hergestellt wurde. Doch schon drei Jahre nach Beginn der Massenproduktion wurden Penicillin-resistente Bakterien gefunden. Im Laufe der Zeit wurden weitere Antibiotika entdeckt und entwickelt, die auf verschiedene lebenswichtige Zielmoleküle in der Bakterienzelle hemmend wirken und somit die Bakterien töten. Die Bakterien wiederum finden immer neue Wege, um sich gegen die Antibiotika zu weh-

ren: So mutieren z. B. die Zielproteine wie die DNA-Gyrase oder das Ribosom, damit das Antibiotikum nicht mehr binden und seine hemmende Wirkung ausüben kann. Ein anderer Weg ist die enzymatische Modifikation des Antibiotikums durch das Bakterium; durch den Um- oder Abbau verliert es seine ursprünglich schädliche Wirkung. Beispiele sind der Abbau der Penicilline durch β -Lactamasen und die Phosphorylierung, Adenylierung oder Azetylierung der Aminoglykoside durch Phosphotransferasen, Nukleotidyltransferasen bzw. Azetyltransferasen. Viele resistente Bakterien verfügen auch über Pumpsysteme, welche effizient Antibiotika

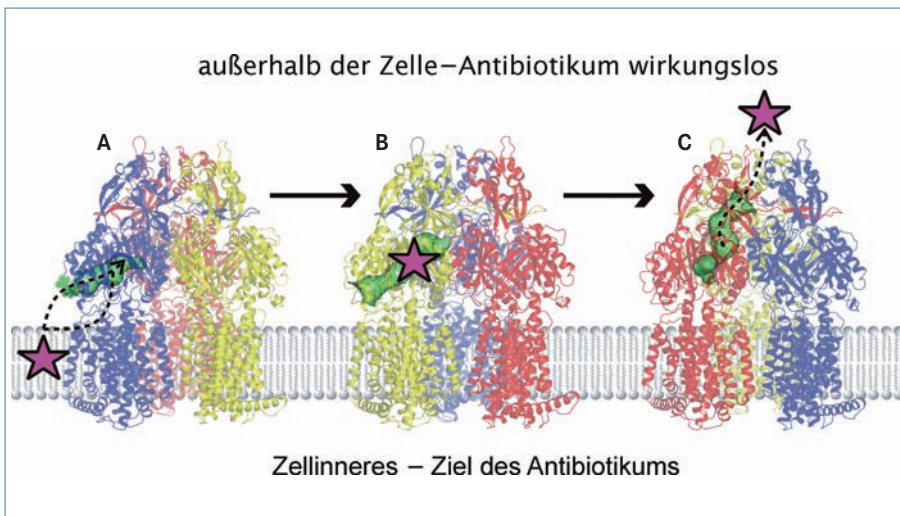
aus dem Zellinnern über die Zellmembran zurück nach außen transportieren. Die therapeutische Konzentration dieser Substanzen ist dann zu niedrig, und sie können ihre schädigende Wirkung am Zielort in der Bakterienzelle nicht ausüben.

Ein solches Pumpsystem ist keine neue Erfindung der Natur, die aufgrund des Selektionsdrucks durch die breite Anwendung von Antibiotika entstanden ist, sondern vielmehr besitzen Bakterien seit jeher Proteine, die die Aufgabe haben, das Bakterium vor einer breiten Palette von schädlichen Substanzen zu schützen. Als Beispiel seien hier Darmbakterien (wie *E. coli*) genannt, welche die im Darm allgegenwärtigen Gallensalze aus der Bakterienzelle herauspumpen und somit das Überleben in diesem Habitat ermöglichen. Charakteristisch für solche Pumpsysteme ist die breite Substratspezifität, das heißt, eine Vielzahl strukturell sehr unterschiedlicher Moleküle kann von ein und demselben System transportiert werden.

Normalerweise ist die Produktion dieser Pumpen durch Regulationssysteme gedros-



◀ **Abb. 1:** Schematische Darstellung des Antibiotikum-Pumpsystems AcrAB-TolC von *E. coli*.



▲ **Abb. 2:** A, Ein Antibiotikum-Molekül (Stern) versucht durch die Zellmembran (grau) ins Zellinnere des Bakteriums (unten) zu gelangen. Die AcrB-Pumpe (die Farben entsprechen unterschiedlichen Konformationen der Monomere) fängt es ab und leitet es in den Tunnel (grüner Schlauch). B, Das Antibiotikum ist gefangen im Tunnel. C, Durch Schließen des Tunnel-Eingangs und gleichzeitiges Öffnen des Tunnels an der Außenseite wird das Antibiotikum nach außen (oben) transportiert.

selt und es sind relativ wenige Pumpen vorhanden. Unter dem Selektionsdruck bei Anwesenheit von Antibiotika jedoch geschieht es häufig, dass diese Pumpen hochreguliert werden und dem Bakterium eine massiv erhöhte Resistenz gegenüber einer ganzen Reihe von Antibiotika verleihen. Heute stellen multi-resistente Pathogene, bei denen unter anderem Pumpsysteme eine zentrale Rolle spielen, ein sehr ernstzunehmendes Problem bei Patienten mit einer Immunschwäche (bedingt beispielsweise durch Chemotherapie oder HIV) dar, und es existieren Bakterien, die man mit keinem Antibiotikum mehr bezwingen kann.

Die AcrB-Pumpe

Das Antibiotikumpumpensystem AcrAB-TolC des Darmbakteriums *E. coli* besteht aus drei Komponenten (**Abb. 1**): einem Substrat/Protonen-Antiporter in der inneren Membran, genannt *acriflavine resistance protein B* (AcrB), einem Kanal in der äußeren Membran, *tolerance to colicin E1* (TolC), sowie einem Membranfusionsprotein im Raum zwischen den beiden Membranen (Periplasma), *acriflavine resistance protein A* (AcrA). Jede Komponente ist unerlässlich für die Funktion des Systems. Bei Fehlfunktion eines der drei Proteine ist die natürliche Widerstandsfähigkeit des Bakteriums gegenüber Antibiotika, Gallensalzen, Detergenzien und Farbstoffen drastisch reduziert.

Unsere Forschung ist auf die strukturelle und biochemische Untersuchung des Trans-

porters AcrB fokussiert, welcher die zentrale Rolle bezüglich der Substratspezifität sowie der Energetisierung des Transportprozesses spielt. AcrB gehört zur Superfamilie der *Resistance Nodulation Cell Division* (RND)-Transporter, zu der auch das menschliche *Niemann-Pick C1 Disease Protein* (NPC1) und der Hedgehog-Rezeptor Patched (Ptc) gehört. Die erste 3-D-Struktur von AcrB wurde im Jahre 2002 mittels Röntgenkristallographie gelöst^[1, 2]. Sie zeigt die funktionelle Einheit des AcrB als symmetrisches Homotrimer. Diese Struktur vermochte jedoch die Wirkungsweise des Antibiotikatransporters nicht zu erklären.

Es ist uns in den letzten Jahren gelungen, eine neue, hochauflösende Röntgenstruktur des Transporters in einer asymmetrischen Konformation zu lösen^[3]. Aufgrund der Asymmetrie konnte ein völlig neuer Transportmechanismus postuliert werden, bei dem das Substrat durch die einzelnen Monomere gleitet. Im kristallographisch erhaltenen Bauplan dieses Membranproteins sind in den Monomeren Tunnel zu erkennen, die verschiedene Engstellen aufweisen (**Abb. 2**).

Die Quetschpumpen-Hypothese

Ein Antibiotikum-Molekül, das in die Bakterienzelle eindringt, wird von der AcrB-Pumpe eingefangen und gleitet in den Tunnel hinein. Wie die Nahrung in der Speiseröhre oder im Darm wird das Antibiotikum durch die Erzeugung von Engstellen aus der Pumpe hinaus gequetscht. Hat das Antibiotikum den

Tunnel verlassen, schließt das AcrB-Protein wieder den Tunnel an der Außenseite und öffnet ihn erneut nach innen. So pumpt es ein Antibiotikum-Molekül nach dem anderen aus der Zelle hinaus. Das Bakterium wird dadurch resistent gegen das Antibiotikum (**Abb. 2**).

Für den Transport von Antibiotika über die bakterielle Membran durch AcrB wird somit ein Mechanismus ähnlich wie bei einer peristaltischen (Quetsch-)Pumpe postuliert.

Wissenschaftlicher und medizinischer Wert

Der wissenschaftliche Wert dieser Arbeit liegt darin, dass jetzt molekulare Einsichten verfügbar sind, die helfen, eine der grundlegenden Fragen in der Membranbiologie – die Umwandlung von elektrochemischer Energie in den Transport von Stoffen über die Membran – zu beantworten. Überraschenderweise weist das AcrB bei der Energietransduktion Parallelen zu bekannten primären Transportsystemen auf, die den Transport von Stoffen mit Energie aus Licht, Redoxreaktionen oder chemischer Hydrolyse beziehen. Auch in Bezug auf die mechanische Wirkungsweise zeigt AcrB eine große Analogie zu einem der bedeutendsten Membranproteine, der F_1F_0 -ATPase.

Der medizinische Wert kann darin gesehen werden, dass die durch die Aufklärung des Bauplans gewonnenen Erkenntnisse helfen können, das Phänomen „Antibiotika-Resistenz durch Efflux-Pumpen“ besser zu bekämpfen. Das AcrAB-TolC und verwandte Systeme, beispielsweise in *Pseudomonas aeruginosa*, sind vermehrt Ursache von post-operativen Infektionen, die nicht mehr mit herkömmlichen Antibiotika bekämpft werden können. Die AcrB-Struktur bietet jetzt die Möglichkeit, rationell spezifische Inhibitoren dieser Pumpe zu entwickeln.

Reichweite der Erkenntnisse: bis zu homologen Transportern im Menschen

Ein nicht zu vernachlässigender Punkt ist die Homologie des AcrBs mit humanen Proteinen wie dem Niemann-Pick-Protein C1 und dem Hedgehog-Rezeptor Patched. Das Niemann-Pick-Transporter-Protein C1 spielt eine wichtige Rolle bei dem Transport von Cholesterin über die endosomale/lysosomale Membran. Ein Defekt dieses Proteins führt zu der Niemann-Pick-Krankheit, einer Akkumulation von Cholesterin und anderen Lipiden im endosomalen/lysosomalen System,

die eine letale Neurodegeneration in den frühen Jugendjahren verursacht. Der Hedgehog-Rezeptor Patched ist am Hedgehog-Signalweg beteiligt, einem wichtigen Regulator von Wachstum, Differenzierung und Morphogenese, aber auch der Tumorentwicklung. Die Einsichten in die Energie-Kopplung zwischen elektrochemischen Gradienten und Stofftransport beim AcrB können als Leitfaden zum Verständnis der Transportmechanismen von Niemann-Pick C1 und Patched-Transportern dienen. ■

Literatur

- [1] Murakami, S., Nakashima, R., Yamashita, E., Yamaguchi, A. (2002): Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB. *Nature* 419: 587–593.
- [2] Pos, K. M., Schiefner, A., Seeger, M. A., Diederichs, K. (2004): Crystallographic analysis of AcrB. *FEBS Lett.* 564: 333–339.
- [3] Seeger, M. A., Schiefner, A., Eicher, T., Verrey, F., Diederichs, K., Pos, K. M. (2006): Structural asymmetry of AcrB trimer suggests a peristaltic pump mechanism. *Science* 313: 1295–1298.

Korrespondenzadressen:

Prof. Dr. Kay Diederichs
 Universität Konstanz
 Fachbereich Biologie
 Box M647
 D-78457 Konstanz
 Tel.: 07531-884049
 Fax: 07531-883183
 Kay.Diederichs@uni-konstanz.de

Dr. Klaas Martinus Pos
 Physiologisches Institut
 Universität Zürich
 Winterthurerstrasse 190
 CH-8057 Zürich
 Tel.: +41-(0)44-635 5046
 Fax: +41-(0)44-635 6814
 kmpos@access.uzh.ch

AUTOREN



Kay Diederichs

1990 Promotion an der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Universität Freiburg, 1990–1991 Postdoc bei Prof. Dr. P. Andrew Karplus an der Cornell-University (Ithaca, New York), 1999 Habilitation an der Universität Konstanz, seit 2004 Professor für Molekulare Bioinformatik an der Universität Konstanz.



Klaas Martinus Pos

1997 Promotion am Institut für Mikrobiologie, ETH Zürich, 1998–2000 Postdoc bei Prof. Dr. Peter J.F. Henderson an der University of Leeds, Großbritannien, 2000–2004 Gruppenleiter am Institut für Mikrobiologie, ETH Zürich (Gruppe Prof. Dr. Peter Dimroth), Seit 2004 Oberassistent am Physiologischen Institut der Universität Zürich (Gruppe Prof. Dr. François Verrey).