



■ *E.-coli*-Bakterien können in der aggressiven chemischen Umgebung des Darms nur überleben, weil sie in der Lage sind, in das Zellinnere eindringende Gallensalze über einen Pumpmechanismus wieder hinauszubefördern. Mit diesen Pumpen in der Zellmembran sind auch andere Bakterien ausgestattet. Sie nutzen sie unter anderem dazu, sich gegen Antibiotika zu wehren.

# Antibiotika-Resistenz: Die Tricks der Bakterien

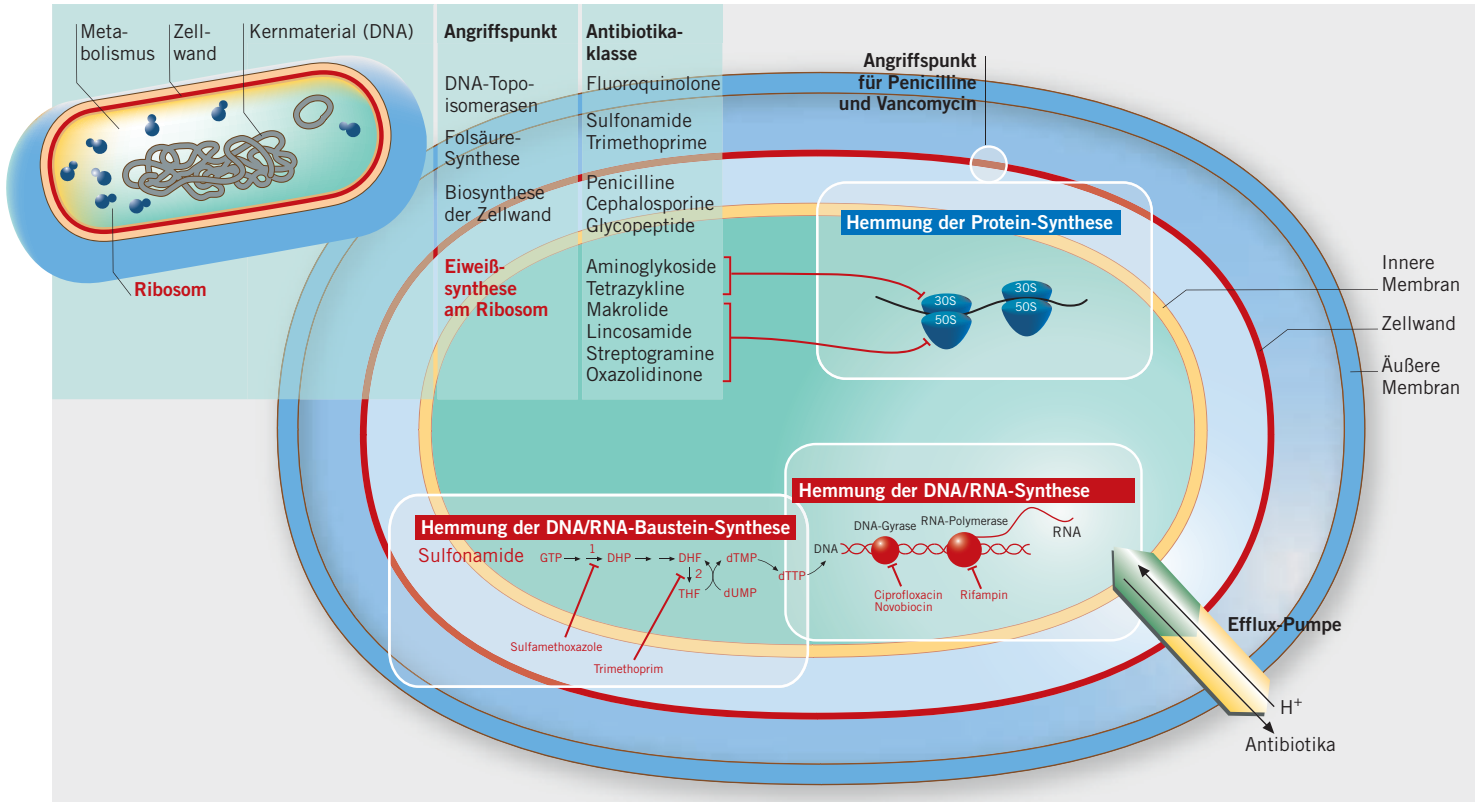
## Pumpsysteme werfen die Arzneistoffe aus der Zelle

von **Klaas  
Martinus Pos**

Der schottische Bakteriologe Sir Alexander Fleming entdeckte 1928 durch Zufall das Antibiotikum Penicillin, eine Substanz, die ab 1941 das erste Mal als Medikament eingesetzt wurde und seit 1943 in Massenproduktion hergestellt wird. Fleming erhielt für seine Entdeckung, die als Durchbruch im Kampf der Menschheit gegen bakterielle Infektionen galt, 1945 den Nobelpreis für Medizin. Doch schon drei Jahre nach Beginn der Massenproduktion wurden Penicillin-resistente

Immer häufiger sind Bakterien resistent gegen ein bestimmtes Antibiotikum, oft auch gleich gegen mehrere. Eine Infektion, die von solchen multiresistenten Bakterien verursacht wird, kann nicht mehr mit Antibiotika bekämpft werden. Im schlimmsten Fall führt sie bei immungeschwächten Patienten zum Tod. Um zielgerichtet neue und wirkungsvolle Medikamente entwickeln zu können, ist es wichtig zu wissen, wie die Bakterienzelle sich gegen die Zerstörung durch Antibiotika wehrt. Ein inzwischen genau entschlüsselter Mechanismus ist die Efflux-Pumpe, die für die Zelle schädliche Substanzen wieder hinausbefördert.

Bakterien gefunden. Im Laufe der Zeit wurden immer neue Antibiotika entdeckt und entwickelt, die auf verschiedene lebenswichtige Zielmoleküle in der Bakterienzelle hemmend wirken und diese töten. ■ So stört Penicillin den Aufbau der Zellwand von Bakterien so, dass sie sich nicht mehr teilen können. Auch Vancomycin, eine der letzten »Wunderwaffen« heutzutage, stört das Bakterium beim Aufbau der Zellwandsynthese – allerdings auf eine andere Weise als das Penicillin.



Zwei weitere lebenswichtige Prozesse des Bakteriums sind die DNA- und die Protein-Synthese. Synthetische Antibiotika wie die Fluoroquinolone greifen die Topoisomerase II (DNA-Gyrase) an, ein Enzym, das die dichte Verpackung der DNA lockert, damit sie repliziert werden kann. Sulfonamide, die schon vor den Antibiotika in den 1930er Jahren eingesetzt wurden, greifen in die Synthese der DNA-Bausteine ein. Ein weiterer Angriffspunkt ist das Ribosom. Darauf zielen viele Antibiotika wie Aminoglykoside, Tetracykline (sie wirken auf die kleinere 30S-Untereinheit des Ribosoms), Makrolide, Oxazolidone und Lincosamide (50S-Untereinheit).

dann zu niedrig, um einen Schaden am Zielort in der Bakterienzelle anzurichten.

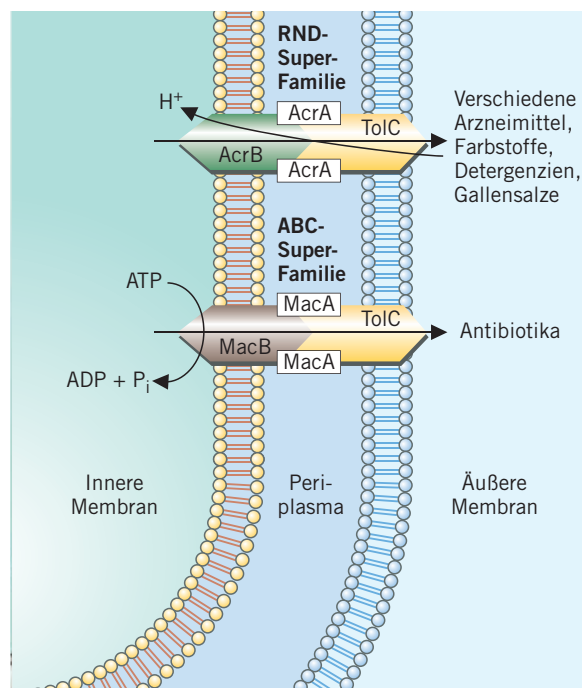
**Pumpsysteme**

Pumpsysteme sind keine neue Erfindung der Natur. Sie sind nicht aufgrund des Selektionsdrucks durch die breite Anwendung von Antibiotika entstanden, vielmehr besitzen Bakterien seit jeher Proteine, die die Aufgabe haben, das Bakterium vor einer breiten Palette schädlicher Substanzen zu schützen. Als Beispiel seien hier Darmbakterien (wie *Escherichia coli*) genannt, welche die im Darm allgegenwärtigen Gallensalze aus der Bakterien-

2 Antibiotika sind aufgrund ihrer Struktur in verschiedene Klassen eingeteilt. Sie greifen das Bakterium, hier ein Gram-negatives, an verschiedenen Stellen an.

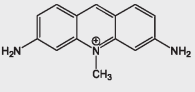
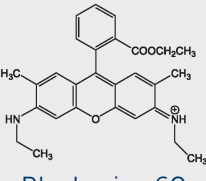
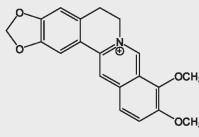
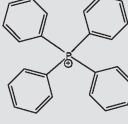
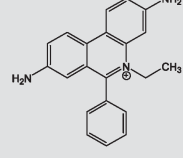
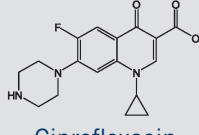
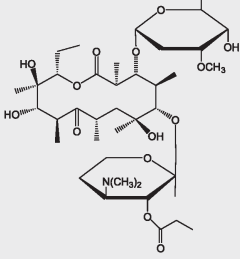
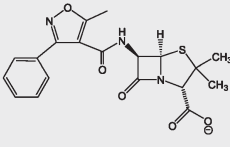
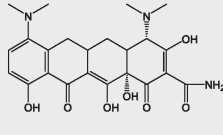
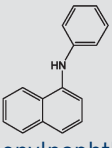
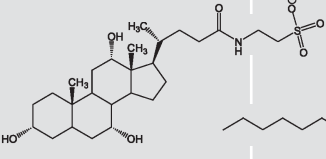
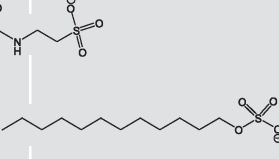
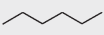


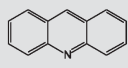
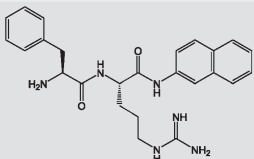
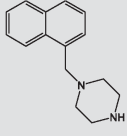
**Resistenz**

Zum Leidwesen vieler höherer Lebewesen, die Zellen mit einem Kern besitzen (Eukaryoten), finden die Bakterien immer wieder neue Wege, sich gegen Antibiotika zu wehren. Eine sehr effektive Strategie besteht darin, das innerhalb der Bakterienzelle angegriffene Zielmolekül zu verändern. So wird beispielsweise die Bindungsstelle des Antibiotikums Erythromycin an der 50S Untereinheit des Ribosoms durch Methylierung der 23S rRNA modifiziert; das Antibiotikum kann nicht mehr binden und seine hemmende Wirkung ausüben. Ein anderer Weg ist die enzymatische Modifikation des Antibiotikums durch das Bakterium; durch den Um- oder Abbau verliert es seine ursprünglich zerstörerische Wirkung. Beispiele sind der Abbau der Penicilline durch  $\beta$ -Lactamasen und die Phosphorylierung, Adenylierung oder Acetylierung der Aminoglykoside durch Phosphotransferasen, Nucleotidyltransferasen beziehungsweise Acetyltransferasen. Viele resistente Bakterien verfügen auch über Pumpsysteme, die Antibiotika effizient aus dem Zellinneren über die Zellmembran zurück nach außen transportieren. Die therapeutische Konzentration dieser Substanzen ist



3 In der Membran von Gram-negativen Bakterien findet man typischerweise dreiteilige Pumpsysteme, die verschiedene Substanzen aus der Zelle pumpen. Allen gemeinsam ist das TolC-Protein, mit dem sie einen Ausgang in der äußeren Membran schaffen.

Durch Pumpsysteme beförderte schädliche Substanzen

 <b>Acriflavine</b>	 <b>Rhodamine 6G</b>	 <b>Berberine</b>
 <b>Tetraphenylphosphonium</b>	 <b>Ethidium</b>	 <b>Ciprofloxacin</b>
 <b>Erythromycin</b>	 <b>Oxacillin</b>	 <b>Minocycline</b>
 <b>N-Phenyl-naphthylamine (NPN)</b>	 <b>Taurocholate</b>	 <b>Dodecylsulfate</b>
 <b>Hexane</b>	 <b>Cyclohexane</b>	 <b>Indole</b>
 <b>Acridine</b>	 <b>Phe-Arg-β-naphthylamide (PAβN)</b>	 <b>1-(1-naphthylmethyl)-piperazine (NMP)</b>

4 Mit Pumpsystemen wehren sich Bakterien gegen eine breite Palette schädlicher Substanzen wie Farbstoffe, verschiedene Klassen von Antibiotika, Waschmittel, Gallensalze und kleine organische Moleküle. Rechts unten die chemische Struktur zweier Efflux-System-Hemmstoffe.

terium eine massiv erhöhte Resistenz gegenüber einer ganzen Reihe von Antibiotika verleihen. Heute stellen multiresistente Pathogene, bei denen unter anderem Pumpsysteme eine zentrale Rolle spielen, ein sehr ernst zu nehmendes 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.

Antibiotikaresistenz in *Escherichia coli* ist häufig mit der Aktivität des AcrAB-TolC-Pumpsystems 5 assoziiert, das nicht nur eine Vielzahl von Antibiotika, sondern auch Gallensalze, Detergenzien und Farbstoffe aus der Zelle transportiert. 6 Dieses dreiteilige System besteht aus :

1. einem Substrat:Protonen-Antiporter in der inneren Membran, »Acridine resistance protein B« (AcrB),
2. einem Kanal in der äußeren Membran, »Tolerance colicin E1« (TolC),
3. einem Membranfusionsprotein im Raum zwischen den beiden Membranen (Periplasma), »Acridine 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 drastisch reduziert.

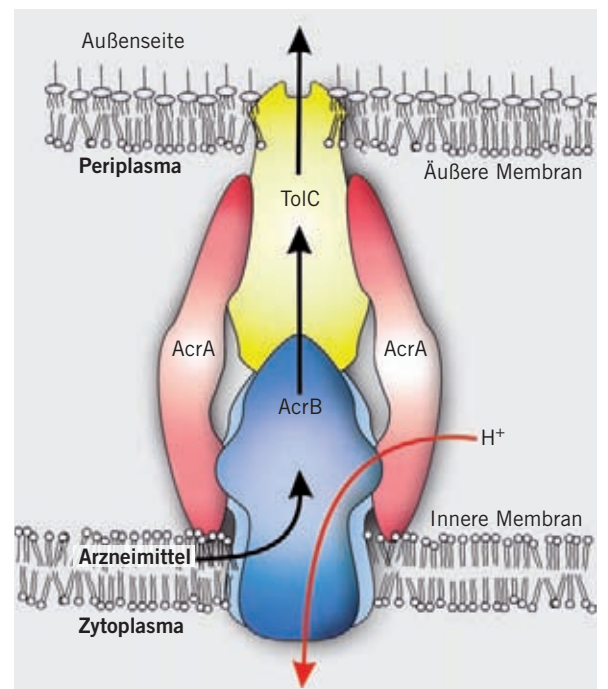
**Energie-Schaltstelle AcrB**

Innerhalb des dreiteiligen Komplexes ist die AcrB-Pumpkomponente für die Substratspezifität zuständig, das heißt, sie erkennt die zu transportierenden Substanzen. Außerdem ist AcrB die Energie-Schaltstelle für den Transport. Beiderseits der biologischen Membran herrscht eine ungleiche Verteilung von Anionen und Kationen. Das führt zu einem chemischen Konzentrationsgefälle und einem elektrischen Membranpotenzial. AcrB nutzt spezifisch das elektrochemische Gefälle

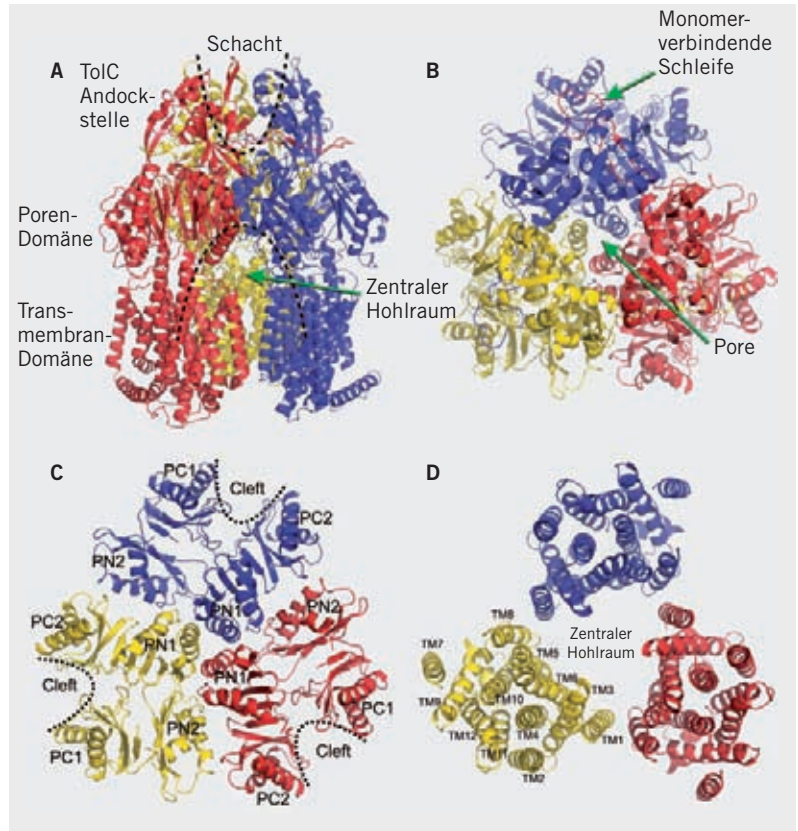
zelle herauspumpen und somit das Überleben in diesem Habitat sichern. Charakteristisch für solche Pumpsysteme ist die breite Substratspezifität, das heißt, eine Vielzahl strukturell sehr unterschiedlicher Moleküle kann von ein und demselben System transportiert werden.

Normalerweise ist die Tätigkeit dieser Pumpen durch Regulationssysteme gedrosselt, und es sind relativ wenige Pumpen vorhanden. Unter dem Selektionsdruck bei Anwesenheit von Antibiotika geschieht es jedoch häufig, dass diese Pumpen hochreguliert werden und dem Bak-

5 Schematische Darstellung des dreiteiligen AcrAB-TolC Efflux-Systems in *E. coli*. AcrB (blau) in der inneren Membran erkennt die Substanzen, die hinausbefördert werden sollen und überträgt die dazu notwendige Energie (die protonenmotorische Kraft, roter Pfeil). Arzneimittel werden von der äußeren Doppel-lipid-Schicht der inneren Membran gefangen genommen und mithilfe eines gekoppelten Austauschs von Protonen herausgepresst. TolC (gelb) formt eine Pore in der äußeren Membran, die zu einem langen periplasmatischen Kanal erweitert ist. AcrA (rot) vermittelt den Kontakt zwischen AcrB und TolC.



3 A: Seitenansicht des aus drei Untereinheiten (diese bilden ein Trimer) bestehenden AcrB. Die Andockstelle für TolC hat einen sich verengenden Schacht, der in eine zentrale Pore in der »Porter«-Domäne mündet. Entgegen den anfänglichen Vermutungen, werden keine Substanzen, das heißt auch keine Antibiotika, durch diese »Pore« transportiert. Die Transmembran-Domäne umschließt einen zentralen Hohlraum. B: Die Ansicht von oben zeigt, dass die drei Monomere von AcrB mitunter durch Schleifen zusammengehalten werden, die in den benachbarten Monomeren verankert sind. C: Querschnitt durch die Porter-Domäne D: Querschnitt durch die Transmembran-Domäne, deren Helizes einen großen Hohlraum umschließen.

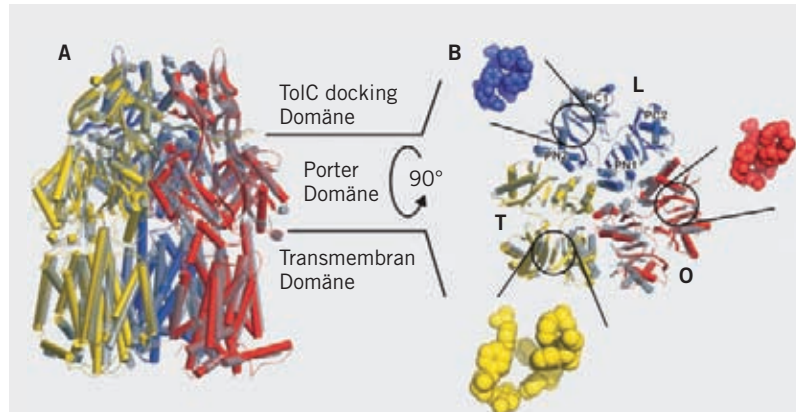


von Protonen, das heißt die protonenmotorische Kraft über die Membran, um den Antibiotikatransport durch Änderungen seiner Konformation voranzutreiben. Dieses System zu verstehen, verspricht einerseits, Angriffspunkte für die Entwicklung neuer Pump-Inhibitoren zu finden. Andererseits ist es aber auch ein ausgezeichnetes Forschungsobjekt, um die Kopplung zwischen dem Transport der Antibiotika und der protonenmotorischen Kraft auf molekularer Ebene zu verstehen.

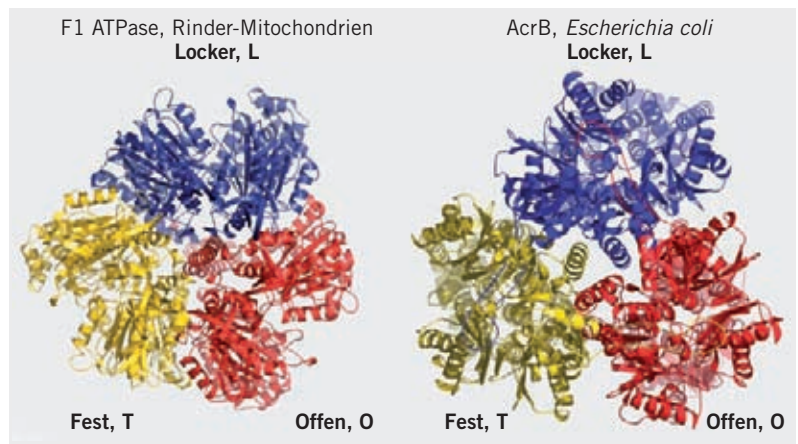
AcrB gehört zur Superfamilie der »Resistance-Nodulation-cell Division« (RND)-Transporter, zu der auch das menschliche »Niemann-Pick C1 disease Protein« (NPC1) und der »Hedgehog Rezeptor Patched« (Ptc) gehören. Das NPC1 spielt eine wichtige Rolle beim Transport von Cholesterin über die Membran von Endosomen und Lysosomen, in denen nicht mehr benötigte Proteine und Fette (Lipide) von der Zelle verdaut werden. Ein Defekt dieses Proteins führt zur Niemann-Pick-Krankheit, bei der sich Cholesterin und andere Lipide im endosomalen/lysosomalen System anhäufen. Die Folge ist eine schon in der frühen Jugend tödlich endende Zerstörung der Nervenzellen. Der Hedgehog-Rezeptor Patched ist am Hedgehog-Signalweg beteiligt, einem wichtigen Regulator von Wachstum, Differenzierung und Morphogenese, aber auch der Tumorentwicklung. Da eine strukturelle Verwandtschaft dieser Krankheiten verursachenden Proteine mit der AcrB-Pumpe aus *E. coli* besteht, könnten an diesem System gewonnene Einsichten in die Energie-Kopplung zwischen elektrochemischem Gradienten und Stofftransport auch als Leitfaden für das Verständnis der Transportmechanismen von Niemann-Pick C1 und Patched-Transportern dienen.

**Bauplan der Antibiotika-Pumpe AcrB**

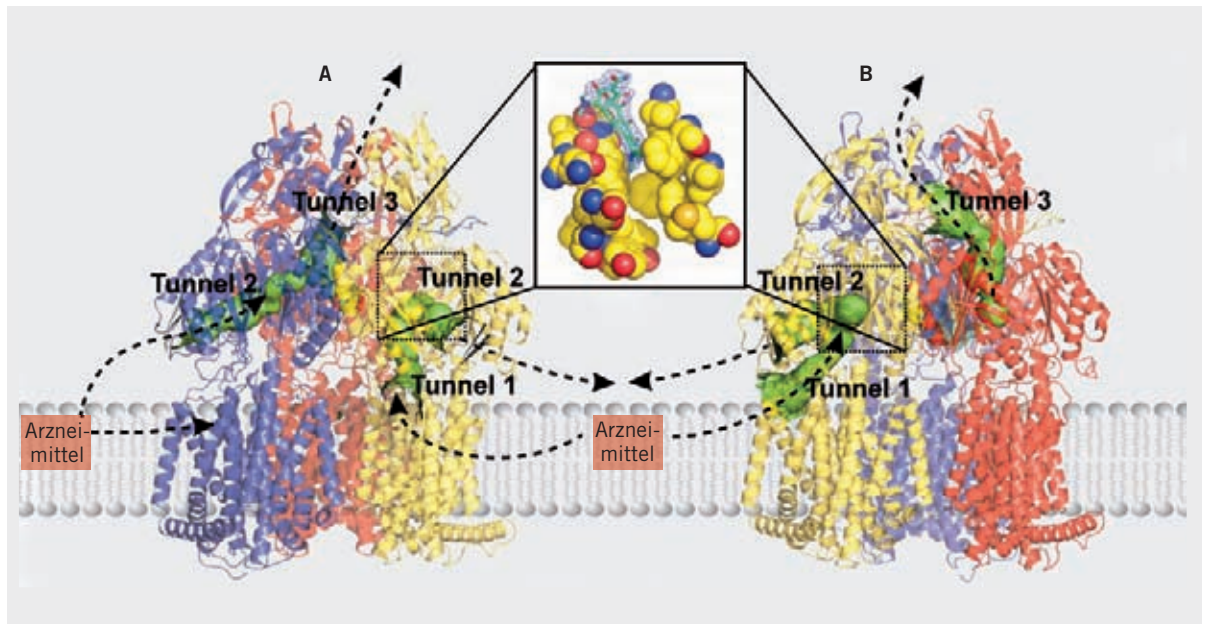
Die erste 3D-Struktur von AcrB wurde im Jahre 2002 mittels Röntgenkristallografie gelöst (Murakami et al., 2002). Sie zeigt die funktionelle Einheit des AcrB als symmetrisches Homotrimer. Diese Struktur vermochte jedoch die Wirkungsweise des Antibiotikatransporters nicht zu erklären. 2006 ist es uns in Kooperation mit der Gruppe von Kay Diederichs an der Universität Konstanz gelungen, eine neue, hoch auflösende Röntgen-Struktur des Transporters mit einer asymmetrischen Konformation aufzuklären (Seeger et al., 2006). Die Interpretation dieser Struktur brachte Erstaunliches zum Vorschein: Das AcrB weist bei der Energietransduktion Parallelen zu bekannten primären Transportsystemen auf. Diese beziehen



7 A: Seitenansicht des AcrB-Trimers. Die drei farblich unterschiedlichen Monomere befinden sich in drei verschiedenen Zuständen (Konformationen). Blau: locker; gelb: fest; rot: offen. B: Blick von oben auf die drei Monomere der Porter-Domäne. In dem T-Monomer (engl. tight, gelb) befindet sich eine Tasche, in der ein Antibiotikum-Molekül gefangen werden kann. Diese Tasche ist in den beiden anderen Monomeren (O und L) geschlossen. PN1, PN2, PC1 und PC2 sind Unterdomänen, die sich relativ zueinander bewegen, während der Zustand der Monomere von L nach T zu O und zurück zu L wechselt.



3 In seiner mechanischen Wirkungsweise besitzt das AcrB eine verblüffende Analogie zu einem der bedeutendsten Membranproteine, der F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPase, hier aus den Mitochondrien von Rindern. Obwohl diese Systeme nicht verwandt sind, hat die Natur offenbar einen konzeptionell ähnlichen Aufbau hervorgebracht.



☐ In AcrB wurde ein völlig neuer Transportmechanismus postuliert, bei dem Arzneistoffe ähnlich der Nahrung in der Speiseröhre oder im Darm durch die Erzeugung von Engstellen in den verschiedenen Tunneln (grün) aus der Pumpe hinausgequetscht werden. Die Grafik zeigt die Pumpe in drei verschiedenen Zuständen, die zeigen sollen, wie die Kanäle in den einzelnen Monomeren sich zyklisch im Dreiertakt öffnen und wieder zusammenziehen (Zustände der Monomere, blau: locker; gelb: fest; rot: offen). Der Zyklus führt über blau zu gelb nach rot (locker, fest, offen) wieder zu blau (locker).

ihre Energie aus Licht, Redoxreaktionen oder chemischer Hydrolyse. Diese Prozesse sind bereits aus den Photosynthese-Komplexen in Chloroplasten, der Atmungskette oder den Pumpsystemen in Krebszellen bekannt, die Chemotherapeutika herauspumpen (P-Glykoprotein). Auch in Bezug auf die mechanische Wirkungsweise zeigt das AcrB eine große Analogie zu einem der bedeutendsten Membranproteine, der  $F_1F_0$ -ATPase. ☐

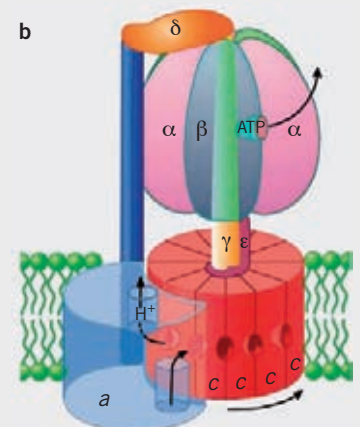
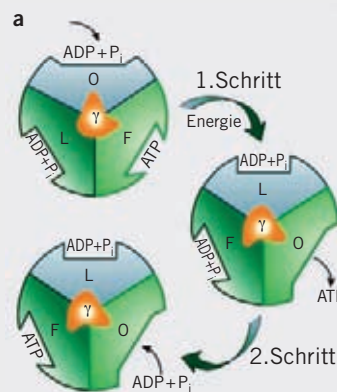
Der Chemie-Nobelpreisträger Paul Boyer postulierte schon 1973 (Boyer et al., 1973) für die  $F_1F_0$ -ATPase einen »binding change«-Mechanismus, der die Wirk-

ungsweise dieser molekularen Maschine sehr genau beschrieb, und zwar lange bevor die strukturellen Details bekannt waren (Abrahams et al., 1994). Bei der offensichtlichen strukturellen Analogie zwischen der  $F_1F_0$ -ATPase und AcrB ☐ lag eine funktionelle Analogie nahe. Wir und andere postulierten in Anlehnung zur  $F_1F_0$ -ATPase eine funktionelle (keine physikalische) Rotation für AcrB, die dazu führt, dass die Antibiotika schon abgefangen werden, bevor sie das Zellinnere erreichen. Dies implizierte notwendigerweise, dass Antibiotika zunächst in einer Untereinheit des AcrB Trimers gebunden werden.

### Der »binding change«-Mechanismus

Der »binding change«-Mechanismus wurde in den 1970er Jahren durch Paul Boyer formuliert, um die ATP-Synthese aus ADP und Phosphat durch die  $F_1F_0$ -ATPase zu erklären. Der Mechanismus (a) beruht auf drei Postulaten:

- 1) Die Energie aus der protonenmotorischen Kraft wird nicht benutzt, um ATP zu synthetisieren, sondern um ATP vom Enzym zu lösen.
- 2) Die  $F_1F_0$ -ATP-Synthase hat drei katalytische Stellen. ATP kann sich nicht vom Enzym lösen, bevor nicht an einer anderen Stelle ADP und Phosphat gebunden sind. Dies bewirkt eine katalytische Kooperativität.
- 3) Die  $F_1F_0$ -ATP-Synthase funktioniert durch Rotations-Katalyse. Eine Asymmetrie bewirkt die funktionelle Rotation der katalytischen Stellen, und im spezifischen Fall der  $F_1F_0$ -ATPase wird diese Asymmetrie erzeugt durch



eine physikalische Rotation, nämlich der um den im Vergleich zum Gesamtenzym kleinen asymmetrischen  $\gamma$ -Stab (in Abbildung b mit  $\gamma$  gezeichnet), der durch die protonenmotorische Kraft angetrieben wird.

## Der Autor



**Prof. Dr. Klaas Martinus Pos**, 41, studierte von 1987 bis 1992 Biologie an der Universität Groningen in den Niederlanden und promovierte 1997 an der Eidgenössischen Technischen Hochschule (ETH) Zürich. Während seiner Doktorarbeit in der Gruppe von Prof. Peter Dimroth isolierte er einen Zitronensäure-Transporter und analysierte das Transportverhalten dieses Membranproteins in künstlichen Membranen. Von 1998 bis 2000 verblieb er als Marie-Curie-Fellow in der Gruppe von Prof. Peter Henderson an der Universität von Leeds und befasste sich mit Methoden, Membranproteine zu kristallisieren. Zurück in Zürich, zuerst an der ETH und dann an der Universität Zürich in der Gruppe von Prof. François Verrey, entwickelte sich ein kleines Nebenprojekt, die strukturellen Untersuchungen am makromolekularen Efflux-Pumpsystem AcrB, zur primären Forschungsrichtung. 2007 wurde Pos für diese Arbeit mit dem Götze-Preis der Universität Zürich sowie mit dem Mercator-Preis ausgezeichnet. Anfang 2009 erhielt er die *Venia Legendi* auf dem Gebiet der Transportphysiologie der Medizinischen Fakultät der Universität Zürich. Martin Pos ist seit dem 1. Oktober 2008 im Rahmen des Exzellenzclusters »Makromolekulare Komplexe« Professor für »Membrane Transport Machineries« am Institut für Biochemie der Goethe-Universität.

pos@em.uni-frankfurt.de  
<http://www.biochem.uni-frankfurt.de/>

Die asymmetrische Struktur ließ auf eine potenzielle Antibiotika-Bindungsstelle schließen, die sich tatsächlich als solche herausstellte. □

Kurz nach den strukturellen Analysen konnten wir mithilfe von Transportexperimenten und dem Einsatz von reversiblen kovalenten Bindungen Hinweise auf die funktionelle Rotation bekommen (Seeger et al., 2008). Mehrere internationale Gruppen haben aufgrund der neuen asymmetrischen Struktur im Laufe von nur wenigen Jahren Daten gesammelt, die vermehrt darauf hinweisen, dass AcrB tatsächlich mittels eines »binding change«-Mechanismus Antibiotika transportiert.

### Literatur

- |   |   |  |
|---|---|--|
| Abrahams, J. P., A. G. Leslie, R. Lutter & J. E. Walker, (1994) Structure at 2.8 Å resolution of F <sub>1</sub> -ATPase from bovine heart mitochondria Nature 370: 621–628. | reactions Proc Natl Acad Sci U S A 70: 2837–2839.   | asymmetry of AcrB trimer suggests a peristaltic pump mechanism Science 313: 1295–1298.   |
| Boyer, P. D., R. L. Cross & W. Mommsen, (1973) A new concept for energy coupling in oxidative phosphorylation based on a molecular explanation of the oxygen exchange       | Murakami, S., R. Nakashima, E. Yamashita & A. Yamaguchi, (2002) Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB Nature 419: 587–593. | Seeger, M. A., C. von Ballmoos, T. Eicher, L. Brandstatter, F. Verrey, K. Diederichs & K. M. Pos, (2008) Engineered disulfide bonds support the functional rotation mechanism of multidrug efflux pump AcrB Nat Struct Mol Biol 15: 199–205. |
|   | Seeger, M. A., A. Schiefner, T. Eicher, F. Verrey, K. Diederichs & K. M. Pos, (2006) Structural   |  |

### Die Quetschpumpen-Hypothese

Die funktionelle Rotation war eine der wesentlichen Erkenntnisse aus den Daten des kristallografisch erhaltenen Bauplans dieses Membranproteins. Eine zweite, nicht weniger bedeutsame Erkenntnis ist, dass es Tunnel innerhalb des Transportproteins gibt. □ Dadurch konnte ein völlig neuer Transportmechanismus postuliert werden, bei dem das Substrat durch die einzelnen Untereinheiten gleitet. Wie die Nahrung in der Speiseröhre oder im Darm wird das Antibiotikum durch die Erzeugung von Engstellen aus der Pumpe hinausgequetscht. So pumpt es ein Antibiotikum-Molekül nach dem anderen aus der Zelle hinaus. Das Bakterium wird dadurch resistent gegen das Antibiotikum.

Die durch die Aufklärung des Bauplans gewonnenen Erkenntnisse können helfen, 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-operationellen Infektionen, die nicht mehr mit herkömmlichen Antibiotika bekämpft werden können. Die AcrB-Struktur bietet jetzt die Möglichkeit, zielgerichtet spezifische Inhibitoren dieser Pumpe zu entwickeln. ◆

### Anzeige

**Mein Leben, mein Vorteil, meine Frankfurter Sparkasse**

„Spielend in den Ruhestand gehen? Wer später nicht im Aus landen will, muss wie ich am Ball bleiben und rechtzeitig privat vorsorgen.“

Die Vorsorgekonzepte der Frankfurter Sparkasse – Spiel, Satz und Sieg in jeder Lebensphase.

**Frankfurter Sparkasse 1822**

Paul M. | Polizeibeamter | Kunde seit 1967