

Die Terpenbiosynthese als Angriffspunkt für die Entwicklung neuer Antiinfektiva

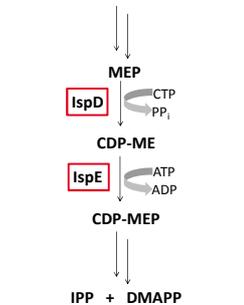
A. Schädling¹, A. Hoppe¹, T. Gräwert¹, B. Illarionov¹, M. Fischer¹

¹HAMBURG SCHOOL OF FOOD SCIENCE, Institut für Lebensmittelchemie, Universität Hamburg, www.hsfs.org

Human- und lebensmittelpathogene Mikroorganismen haben die Fähigkeit Antibiotikaresistenzen auszubilden, es ist daher stets von großem Interesse neue Wirkstoffe zu entwickeln. Die Terpenbiosynthese stellt dafür einen geeigneten Angriffspunkt dar, da es sich um einen essentiellen Stoffwechselweg für alle Lebewesen handelt. Es sind jedoch nicht alle Organismen mit der gleichen Enzymausstattung versehen. Die Vorstufen der Terpene Isopentenyl-Pyrophosphat (IPP) und Dimethylallyl-Pyrophosphat (DMAPP) können vielmehr über zwei unterschiedliche Wege synthetisiert werden – den Mevalonat-abhängigen Biosyntheseweg und den Mevalonat-unabhängigen Biosyntheseweg. Während Pflanzen und wenige Mikroorganismen, wie z. B. das lebensmittelpathogene Bakterium *Listeria monocytogenes* (Erreger der Listeriose), die genetischen Anlagen für beide Wege haben, beschränkt sich die enzymatische Ausstattung bei den meisten Organismen auf einen Weg. Säugetiere und die meisten grampositiven Mikroorganismen beschreiten ausschließlich den Mevalonat-abhängigen Biosyntheseweg, während viele gramnegative Mikroorganismen, wie die lebensmittelübertragenden Keime *Salmonella typhimurium* und *Campylobacter jejuni*, sowie Protozoen, wie *Plasmodium falciparum* (Erreger der humanen Malaria), IPP und DMAPP nur über den Mevalonat-unabhängigen Biosyntheseweg synthetisieren können. Durch die Inhibition eines Enzyms dieses Biosyntheseweges, wie zum Beispiel IspD (4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol Synthase) und IspE (4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol-Kinase) können keine Terpene synthetisiert werden. Da diese u.a. Vorstufen für einige Vitamine und Hormone sind, kommt es zu einer Hemmung des Wachstums der Mikroorganismen. [1,2]

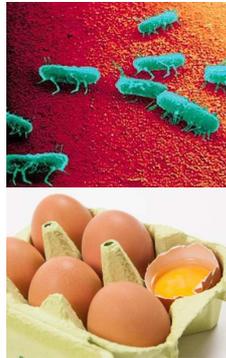
Mevalonat-unabhängige Terpenbiosynthese

Pyruvat + Glycerin-3-phosphat

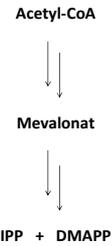


Viele (lebensmittel-) pathogene Mikroorganismen

Bei den Enzymen IspD und IspE handelt es sich um das 3. bzw. das 4. Enzym der Mevalonat-unabhängigen Terpenbiosynthese. Das IspD-Protein katalysiert die Reaktion von 2C-Methyl-D-erythritol-4-Phosphat (MEP) und Cytidintriphosphat (CTP) zu 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol (CDP-ME). Das CDP-ME wird anschließend durch das IspE-Protein zu 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol-2-phosphat (CDP-MEP) phosphoryliert.



Mevalonat-abhängige Terpenbiosynthese



Mensch

Methoden und Ergebnisse

Die an die *codon usage* von *Escherichia coli* angepassten Zielgene *ispD* und *ispE* wurden in ein geeignetes *E. coli*-Expressionssystem kloniert und anschließend rekombinant exprimiert. Die IspD- und IspE-Proteine konnten über die Nickelaffinitätschromatographie (Abb. 1 A) und die Größenausschluss-Chromatographie angereichert werden. Die einzelnen Reinigungsschritte wurden mittels SDS-PAGE überprüft (Abb. 1 B). Das theoretische Molekulargewicht des *ispE* Genproduktes mit Affinitäts-tag beträgt 53 kDa und stimmt somit gut mit der rot markierten Bande auf dem Polyacrylamid-Gel in Abb. 1 B überein.

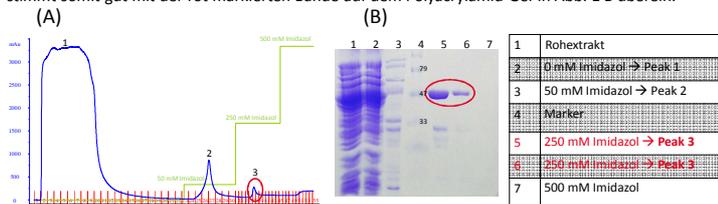


Abb. 1: (A) Chromatogramm der Anreicherung von IspE mittels Nickelaffinitätschromatographie (B) Elektropherogramm (12% iges Polyacrylamid-Gel) zur Nickelaffinitätschromatographie

Die spezifische Aktivität der gereinigten Enzyme wurden über einen photometrischen Assay bestimmt, indem über eine Kopplung mit zwei Hilfsenzymen ein NADH-Verbrauch gemessen wurde. Mithilfe des photometrischen Assays wurden die kinetischen Kenndaten der Isp-Proteine bestimmt. Die kinetischen Parameter für das IspE-Protein sind in Abb. 2 mit Tab. 1 dargestellt.

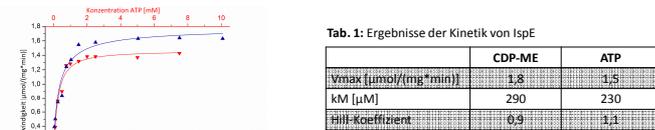


Abb. 2: Kinetik vom IspE-Protein mit verschiedenen Substrat- und Cosubstrat-Konzentrationen

Für das anschließende Highthroughput-Screening (HTS) wurden die photometrischen Aktivitätsassays in ein robotertaugliches 384-Well Format übertragen. Im Rahmen des HTS wurden für das IspD-Protein ca. 50.000 und für das IspE-Protein ca. 25.000 Substanzen auf ihre Hemmwirkung gegen die Enzyme getestet (Abb. 3 A). Ein Counterscreening gegen die Hilfsenzyme des photometrischen Assays wurde im Anschluss an das HTS durchgeführt, um eine Hemmung der Hilfsenzyme auszuschließen (Abb. 3 B).

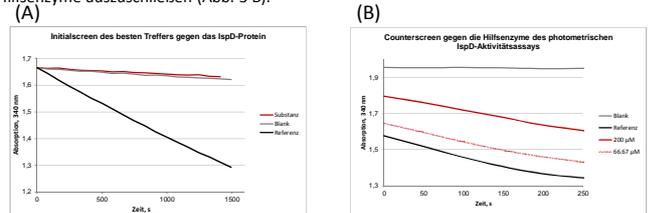


Abb. 3: (A) Initialscreen des besten Treffer gegen das IspD-Protein (B) Counterscreen gegen die Hilfsenzyme des photometrischen IspD-Aktivitätsassays

Zur näheren Charakterisierung der Affinität der Treffer zum jeweiligen Targetenzym wurden IC_{50} -Werte bestimmt (Abb. 4). Der IC_{50} -Wert entspricht der Inhibitorkonzentration, die die Aktivität des entsprechenden Enzyms um 50 % senkt.

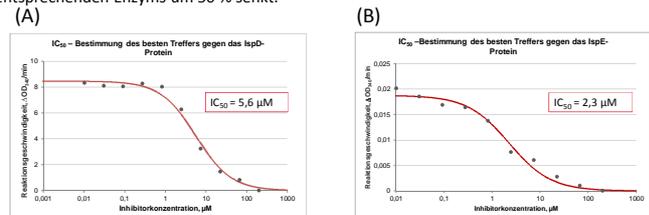


Abb. 4: (A) Bester IC_{50} -Wert für den besten Treffer gegen das IspD-Protein (B) Bester IC_{50} -Wert für den besten Treffer gegen das IspE-Protein

Für die Targetenzyme IspD und IspE soll insgesamt eine Bibliothek von 100.000 Inhibitoren getestet und die besten Treffer mittels IC_{50} -Wert charakterisiert werden. Abschließend soll mit den gewonnenen Erkenntnissen über die Enzyme IspD und IspE und deren Inhibitoren ein Drug Development erfolgen, um antibiotisch wirksame Arzneistoffe entwickeln zu können.

Literatur:
 [1]: Gräwert, T.; Groll, M.; Rohdich, F.; Bacher, A.; Eisenreich, W. (2011), *Cellular and Molecular Life Sciences* 68(23): 3797-3814 ;
 [2]: Heuston, S.; Begley, M.; Gahan, C.; Hill, C. (2012), *Microbiology* 158(6): 1389-1401