

Listeria monocytogenes – Ein Beispiel für die gezielte Inhibition lebensmittelpathogener Mikroorganismen

Sarge, Sonja; Schüssler, Sonja; Wegner, Katrin; Anamoa-Wallace, Effie; Haase, Ilka; Gräwert, Tobias; Fischer, Markus
HAMBURG SCHOOL OF FOOD SCIENCE, Institut für Lebensmittelchemie, Universität Hamburg, www.hsfs.org, www.chemie.uni-hamburg.de/lc
Ansprechpartner: Sonja.Sarge@chemie.uni-hamburg.de

Die Kontamination von Lebensmitteln mit humanpathogenen Mikroorganismen stellt ein ständiges Risiko für den Verbraucher dar. Zu den häufig übertragenen Infektionen gehört neben der Salmonellose und der Campylobacteriose auch die Listeriose, deren häufigster Erreger das psychrophile Bakterium *Listeria monocytogenes* ist. Diese Infektion nimmt eine Sonderposition unter den lebensmittelübertragenen Krankheiten ein, da sie vor allem für Schwangere bzw. das Ungeborene eine besondere Gefährdung darstellt. Dies ist darin begründet, dass die Listerien in der Lage sind die Plazenta-Barriere zu überwinden und so Früh- und Totgeburten hervorrufen können. Die Listeriose kann bisher noch mit verschiedenen Antibiotika behandelt werden, wobei jedoch eine Resistenzentwicklung der Listerien als wahrscheinlich gilt. Des Weiteren kann der Erreger intrazellulär vorkommen, was eine Therapie zusätzlich erschwert. Für die Entwicklung alternativer Wirkstoffe gegen die Listeriose sollen gezielt Inhibitoren für ein ausgewähltes, essentielles Enzym des wichtigsten Erregers *L. monocytogenes* gesucht werden. Da *L. monocytogenes* einen unvollständigen Citratcyclus besitzt, wird das wichtige Stoffwechselintermediat Oxalacetat ausschließlich über die Carboxylierung von Pyruvat gebildet. Diese Reaktion wird von der Pyruvatcarboxylase (PYC) katalysiert, welche folglich essentiell für *L. monocytogenes* ist und sich daher als Drugtarget eignet. Im Rahmen des High Throughput Verfahrens wurden einige tausend Verbindungen auf ihre Hemmwirkung gegen die Pyruvatcarboxylase untersucht.



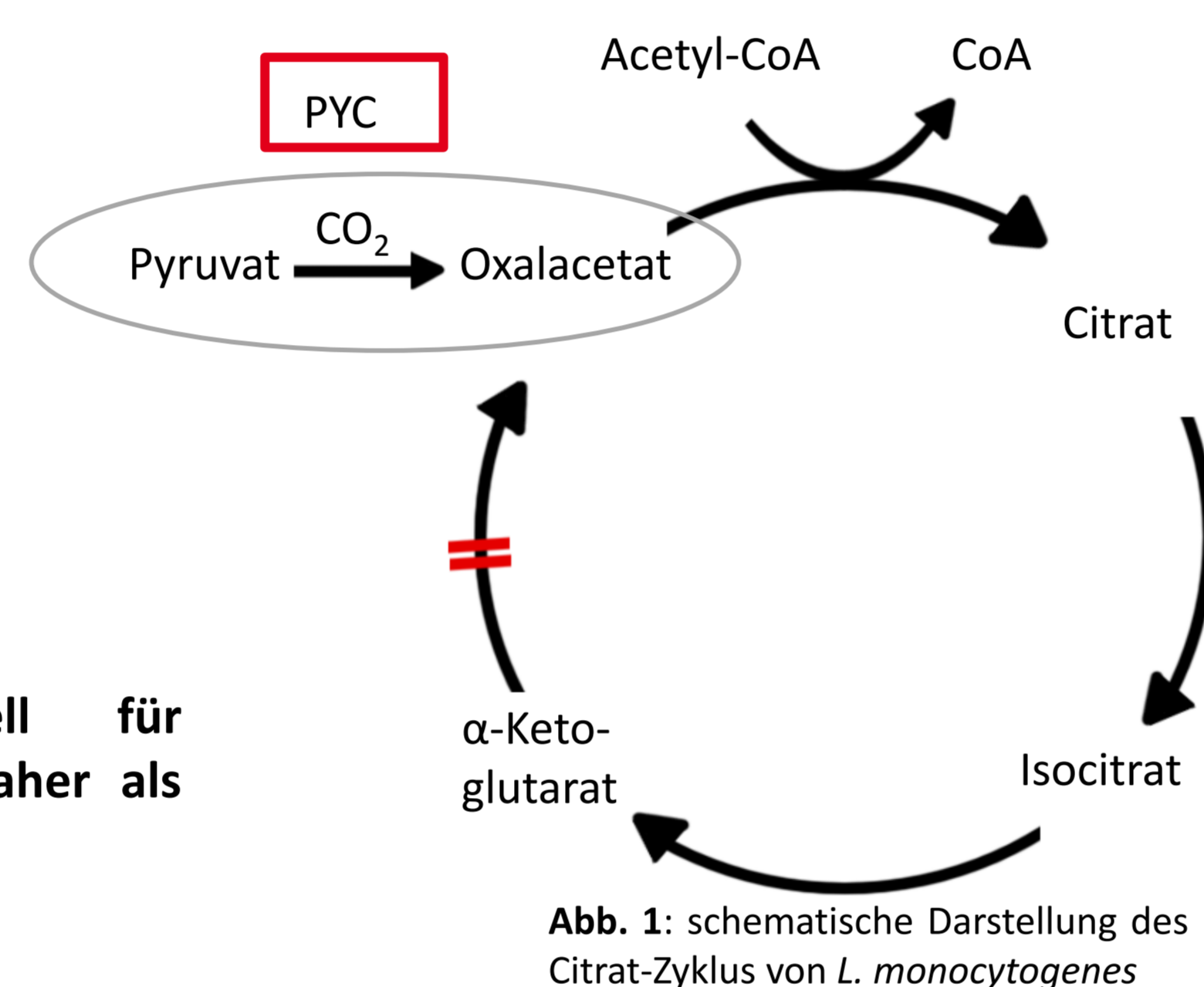
Relevanz in der Lebensmittelindustrie – einige Listeriosefälle der letzten Jahre:[1]

- 2000 sterben in Frankreich zehn Menschen nach dem Verzehr von kontaminierten Lebensmitteln
- 2009 sterben in Österreich und Deutschland sechs Menschen nach dem Verzehr von mit Listerien belastetem Harzer Käse
- 2011 wird in deutschen Supermärkten belasteter Räucherlachs und belastete Salami gefunden
- 2012 muss ein deutscher Hersteller mit Listerien belasteten Speck zurückrufen



Citrat-Zyklus und Pyruvatcarboxylase (PYC):

L. monocytogenes besitzt einen unvollständigen Citrat-Zyklus, da kein Gen für die α -Ketoglutarat-Dehydrogenase existiert. Aus diesem Grund wird das wichtige Stoffwechselintermediat Oxalacetat ausschließlich über die Carboxylierung von Pyruvat hergestellt (Abb. 1). [2]; [3]; [4]

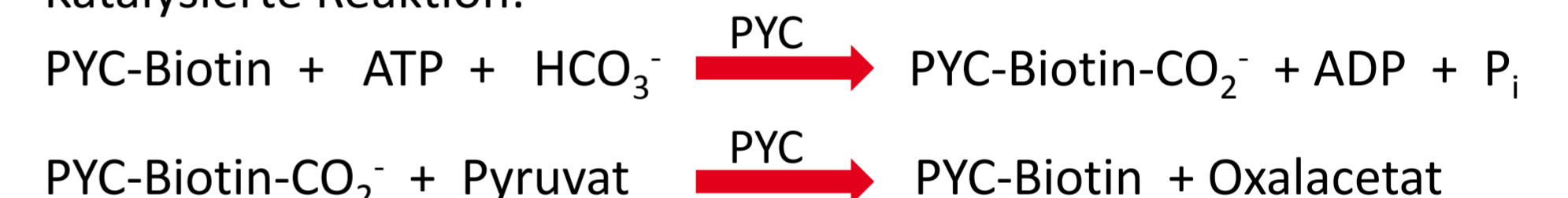


die PYC ist folglich essentiell für *L. monocytogenes* und eignet sich daher als Drugtarget

PYC besitzt Biotin als Cofaktor [5]

Co-Expression der Biotin-Ligase notwendig, um eine vollständige Biotinylierung der PYC zu gewährleisten

Katalysierte Reaktion:



Da die Edukte und Produkte der Reaktion der PYC keine messbaren Größen darstellen, wird die Reaktion mit Hilfe des Hilfsenzym Malatdehydrogenase (MDH) über den Abbau von NADH zu NAD⁺ verfolgt:



Methoden und Ergebnisse:

Die Gene der PYC und der Biotin-Ligase wurden zunächst in einen *Escherichia coli*-Expressionsstamm kloniert und rekombinant exprimiert. Anschließend erfolgte eine Reinigung der PYC über verschiedene chromatographische Verfahren (Nickelaffinitäts- und Gelfiltrationschromatographie). Die Reinigungen wurden elektrophoretisch über SDS-PAGE kontrolliert. Die vollständige Biotinylierung der PYC wurde mittels Avidin Binding Gel Shift Assay nachgewiesen (Abb. 2).

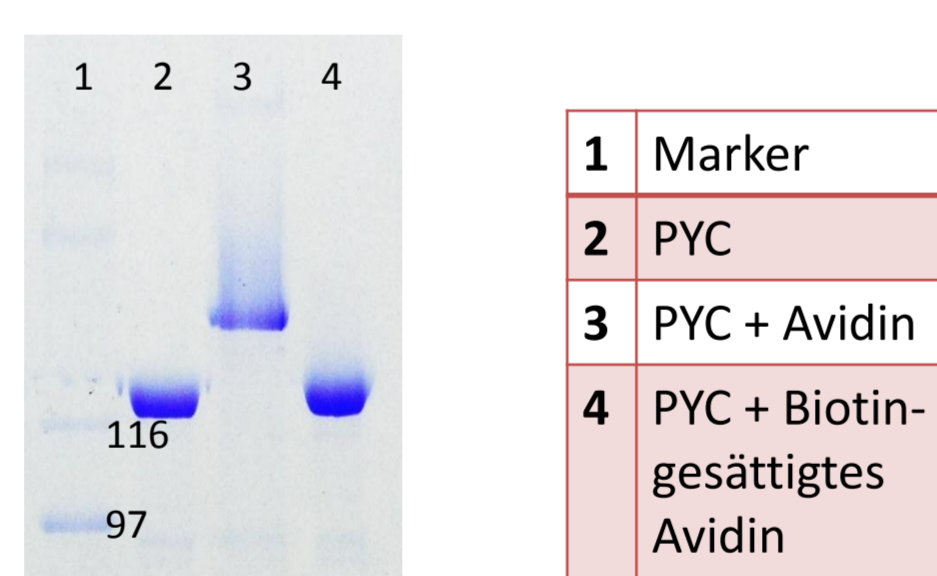


Abb. 2: Avidin Binding Gel Shift Assay der PYC (5%iges PA-Gel)

Die Aktivitätsbestimmung erfolgte photometrisch über eine Hilfsenzym-gekoppelte Reaktion. An die Entwicklung eines geeigneten Assays schloss sich die Bestimmung kinetischer Kenndaten an (siehe Abb. 3 und Tab. 1).

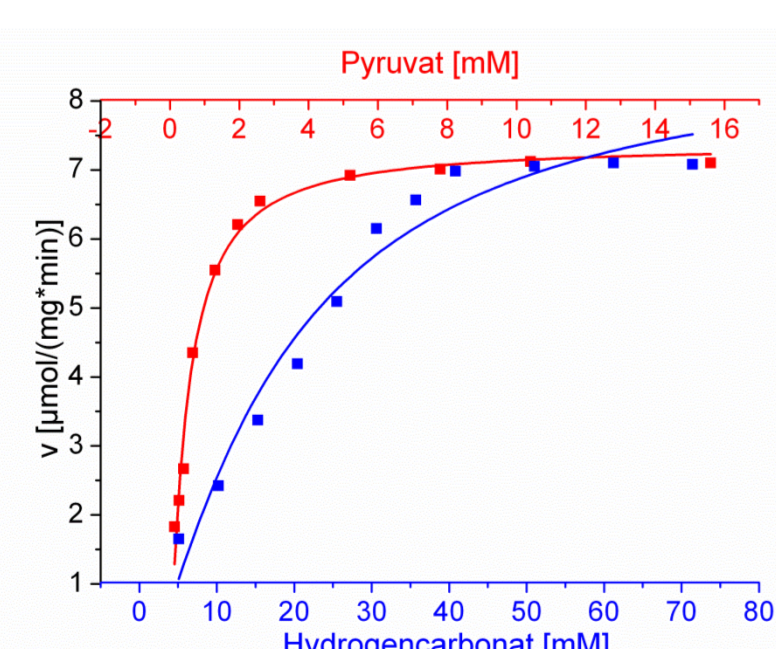


Abb. 3: Kinetik der PYC mit Pyruvat (rot) und mit Hydrogencarbonat (blau) als Substrat

Tab. 1: Ergebnisse der Untersuchungen zur Kinetik

	Pyruvat	Hydrogencarbonat
k [mM]	1	18
v _{max} [nmol/(mg*min)]	8400	
Hill-Koeffizient n	1,1	1,3

Für das anschließende High Throughput Screening (HTS) wurde der Aktivitäts-Assay in das 384-Well Format übertragen. Im Rahmen des HTS wurden ca. 5000 potentiell inhibierende Verbindungen auf ihre Hemmwirkung gegen die PYC aus *L. monocytogenes* untersucht (es wurden jeweils Blindwerte und Positivkontrollen mitvermessen). Die Auswertung erfolgte über die relativen Restaktivitäten der Ansätze mit Inhibitoren. Sechs der besten Hits (Substanz A – F) sind vergleichend mit Blindwert und Positivkontrolle in Abb. 4 und Tab. 2 dargestellt.

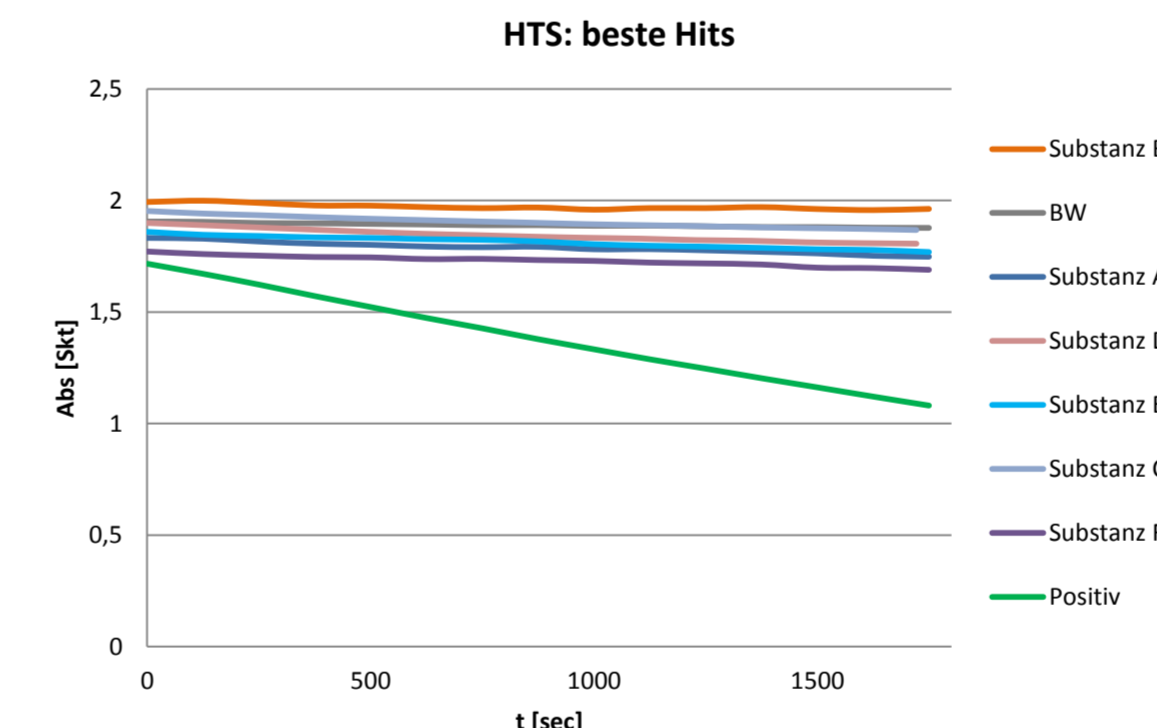


Abb. 4: vergleichende Darstellung einiger Hits des HTS

Tab. 2: Charakterisierung der Hits aus dem HTS

Substanz	Restaktivität [%]	Inhibition der MDH	IC ₅₀ -Werte [µM]
A	4,3	nein	23
B	2,8	ja	-
C	5,7	nein	17
D	6,9	nein	25
E	5,0	nein	26
F	1,3	nein	25

Um sicherzustellen, dass tatsächlich die PYC und nicht das Hilfsenzym inhibiert wird, wurde ein Counterscreen gegen die MDH durchgeführt (Abb. 5 und Tab. 2). Es zeigte sich, dass die MDH nur durch die Substanz B inhibiert wurde. Für alle weiteren Treffer wurden daher IC₅₀-Werte zur näheren Charakterisierung der Affinität der gefundenen Treffer zum Targetenzym bestimmt (Abb. 6 und Tab. 2).

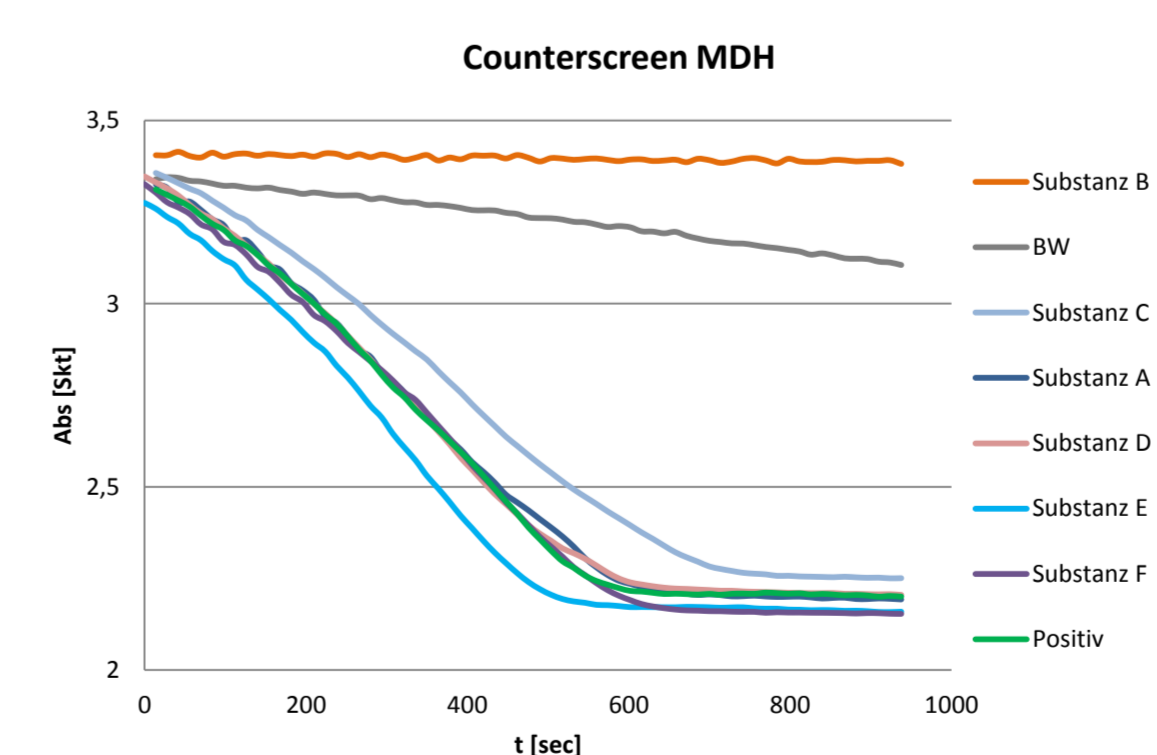


Abb. 5: Counterscreen der Hits des HTS gegen die MDH

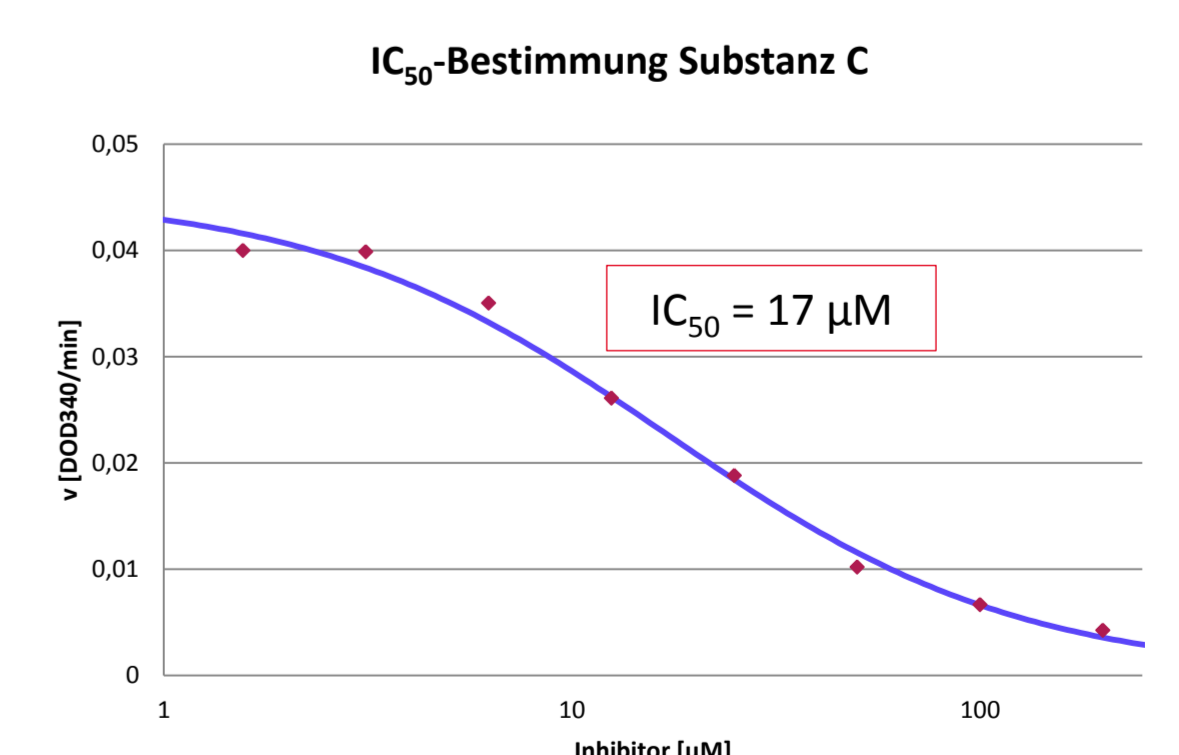


Abb. 6: Exemplarische Darstellung der Bestimmung des IC₅₀-Wertes von Substanz C

Die gefundenen Inhibitoren müssen im Anschluss einem weiteren Counterscreen gegen die humane Pyruvatcarboxylase unterworfen werden. Neben dem Listerien-Enzym soll daher auch das humane Analogon exprimiert, gereinigt und charakterisiert werden. Abschließend soll mit den gewonnenen Erkenntnissen über die Pyruvatcarboxylase aus *L. monocytogenes* und deren Inhibitoren ein Drug Development erfolgen, um antibiotisch wirksame Arzneistoffe entwickeln zu können.

Literatur:

- [1]: Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, Stand Februar 2013; [2]: Eisenreich, et al. (2006), *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(7): 2040-2045; [3]: Schaer, et al. (2010), *J Bacteriol* 192(7): 1774-1784
[4]: Glaser, et al. (2001), *Science* 294(5543): 849-852; [5]: Bruce and Hegarty (1970), *Proc Natl Acad Sci U S A* 65(4): 805-809

