

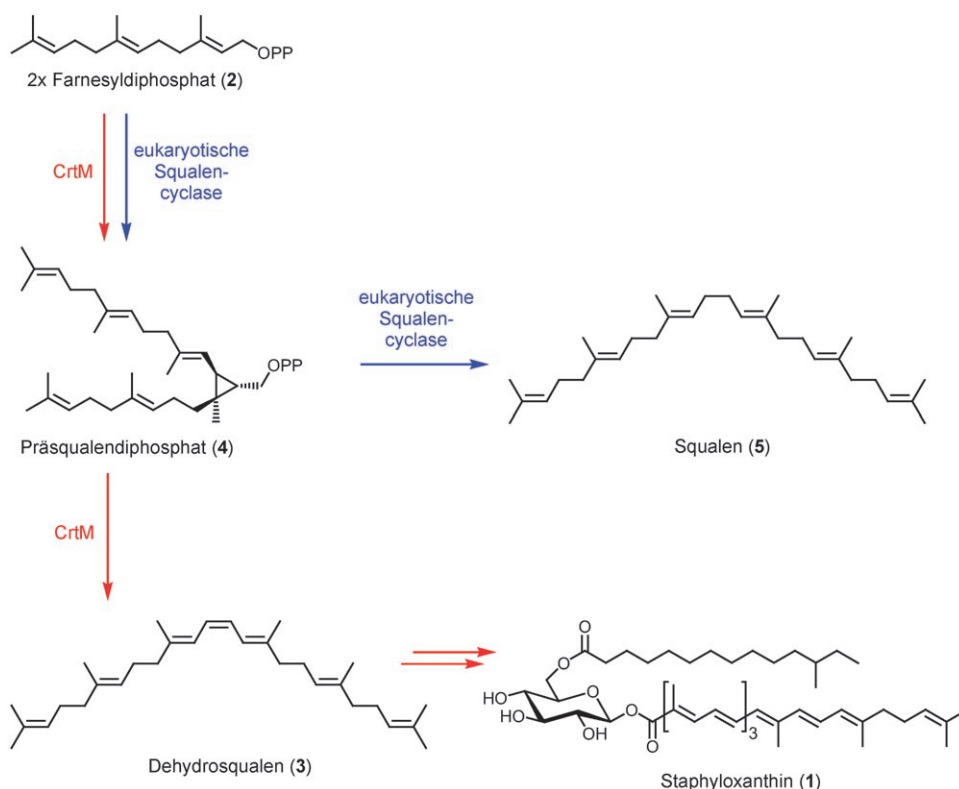
Inhibitoren der Sterolbiosynthese als Antibiotika gegen *Staphylococcus aureus***

Christopher T. Walsh und Michael A. Fischbach*

Antibiotika · Biosynthese · Carotinoide · Enzyme · Inhibitoren

Eine Binsenweisheit in der medizinischen Chemie von Antibiotika besagt, dass es nie genug Gerüste und Strukturen geben kann, gleich ob nun natürlichen oder synthetischen Ursprungs. Wie erfolgreich ein neues Antibiotikum in der klinischen Anwendung auch sein mag, die unvermeidliche Selektion resistenter Mikroben wird seinen Anwendungszeitraum begrenzen.^[1] Für alle wichtigen Klassen von Antibiotika wurde über Resistenzentwicklungen berichtet, und ein bakterieller Erreger mit besonders ausgeprägtem Resistenzverhalten ist *Staphylococcus aureus*. In Anbetracht einer hohen weltweiten Sterblichkeit wurde *S. aureus* als „professioneller Erreger“ beschrieben, der bisher jede Antibiotika-Kampagne überwunden hat. Besonders problematisch, sowohl im klinischen als auch im öffentlichen Bereich, sind Infektionen durch methicillinresistente *S. aureus* (MRSA).^[2]

Die Bezeichnung *aureus* (lateinisch für golden) leitet sich vom Pigment Staphyloxanthin (**1**) ab,^[3] einem glycosylierten Carotinoid, dessen anfänglicher Biosyntheseweg frühen Stufen der Sterolbiosynthese gleicht. Ansätze zur Entwicklung



Schema 1. Zur Rolle von CrtM in der Biosynthese von Staphyloxanthin: Die Squalen-cyclase CrtM aus *S. aureus* katalysiert die Kupplung von zwei Molekülen Farnesyl diphosphat (**2**) zu Dehydrosqualen (**3**), das anschließend in Staphyloxanthin (**1**) umgewandelt wird.

eines MRSA-Wirkstoffs durch Liu et al.^[4] konzentrierten sich auf einen ganz bestimmten Schritt dieses Mechanismus: die Kopf-Kopf-Kondensation von zwei Molekülen Farnesyl diphosphat (**2**) zum C₃₀-Kohlenwasserstoff Dehydrosqualen (**3**) unter Katalyse des *S. aureus*-Enzyms CrtM (Schema 1). Diese Transformation entspricht weitgehend dem eukaryotischen Biosyntheseweg von Cholesterin, inklusive des intermediären Cyclopropanderivats Präsqalendiphosphat (**4**).^[5] Einen Unterschied gibt es im letzten Schritt der Katalyse: Die eukaryotische Squalensynthese^[6] verwendet eine NADPH-abhängige Reduktion zum Abfangen eines allylischen Kations unter Bildung von Squalen (**5**); NADPH ist die reduzierte Form von Nicotinamidadenindinucleotidphosphat), während das Staphylococcenenzym wahrscheinlich ein Proton abstrahiert, um so die zentrale Doppelbindung in Dehydrosqualen

[*] Dr. C. T. Walsh, Dr. M. A. Fischbach
Department of Biological Chemistry and Molecular Pharmacology
Harvard Medical School
240 Longwood Avenue, Boston, MA 02115 (USA)
Fax: (+1) 617-432-0556
E-Mail: christopher_walsh@hms.harvard.edu

[**] Diese Arbeit wurde durch die NIH unterstützt (GM20011, GM49338, AI 47238).

(3) zu bilden. Nachfolgende enzymatische Dehydrierungsschritte erzeugen den konjugierten Chromophor, der für die goldene Farbe des Endprodukts Staphyloxanthin (**1**) verantwortlich ist.^[3]

Staphyloxanthin (**1**) fungiert als ein Virulenzfaktor für *S. aureus*. Es wird angenommen, dass das konjugierte Polysystem reaktive Sauerstoffspezies wie Superoxid, Peroxid und Hypochlorit abfängt, die von den weißen Zellen von Wirbeltieren während der Entzündungsreaktion zum Vernichten der Staphylococci gebildet werden.^[7] Demnach verleiht die Biosynthese von Staphyloxanthin dem *S.-aureus*-Erreger zwar keinen Wachstumsvorteil, sie erhöht aber die Überlebensrate während der Infektion und dient somit als Virulenzfaktor.

Jüngste Ansätze bei der Suche nach neuen Antibiotikagenerationen zielen zunehmend auf die Erregervirulenz ab und nicht, wie bisher üblich, auf essenzielle Genfunktionen.^[8] Ein aus Strukturbiologen, Chemikern und Mikrobiologen zusammengesetztes Forschungsteam hat vor kurzem entdeckt, dass die Inhibierung der Dehydrosqualensynthese in *S. aureus* die Überlebensrate der Bakterien während Infektionen vermindert, sodass die prinzipielle Wirksamkeit dieses virulenzbezogenen Ansatzes belegt ist.^[4]

Ausgangspunkt der Studie war die Röntgenkristallstrukturanalyse der Dehydrosqualensynthese CrtM aus *S. aureus* nach heterologer Expression in *E. coli* und nachfolgender Reinigung und Kristallisation. Da Prenyltransferasen an der Terpen- und Sterolbiosynthese sowie der posttranslationalen S-Prenylierung von Proteinen beteiligt sind, sind die Wirkungsweisen vieler dieser Enzyme im Detail studiert worden. Das eukaryotische Enzym Squalensynthase, eine potenzielle Zielstruktur für die cholesterinsenkende Therapie, war Gegenstand etlicher medizinisch-chemischer Ansätze zur Identifizierung von potenten und spezifischen niedermolekularen Inhibitoren. Mit dieser Grundlage konnte eine Vielzahl von bekannten Inhibitoren resynthetisiert und als inhibitorische Liganden für CrtM aus *S. aureus* getestet werden. Eines dieser Moleküle, das schwefelhaltige Farnesylanalogue **6** (Schema 2), ließ sich mit CrtM kokristallisieren. Die Röntgenkristallstruktur des Komplexes zeigt zwei Moleküle **6** im aktiven Zentrum, die wahrscheinlich die Ausrichtung der Prenylseitenketten des natürlichen CrtM-Intermediats Präsqalen-diphosphat festlegen.^[4]

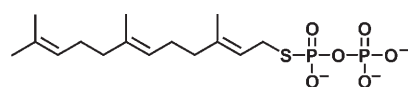
Die Untersuchung von mehreren Inhibitoren, darunter andere Farnesyl-diphosphatanaloga und aminhaltige Kohlenwasserstoffe, die bereits zuvor als künstliche kationische Zwischenprodukte der Squalen/Dehydrosqualensynthase-

reaktion hergestellt worden waren, ergab, dass Phosphonosulfonatgerüste submikromolare Inhibitoren von CrtM sind. Auch mit diesen Spezies gelang die Herstellung von Kokristallisaten. Das Biaryletherphosphonosulfonat **7** (Schema 2) wurde aus mehreren Gründen für die weitere Untersuchung ausgewählt: Es zeigte einen K_i -Wert von 1.5 nM gegen CrtM, es inhibierte die Staphyloxanthinproduktion, wenn es lebenden *S. aureus* ($IC_{50} = 110$ nM) verabreicht wurde, und es befand sich bereits in der klinischen Testphase als cholesterinsenkendes Medikament, nachdem präklinische toxikologische Studien keine Nebenwirkungen ergeben hatten. Liu et al. fanden, dass **7** keinen Einfluss auf das Wachstum von drei menschlichen Zelllinien im Serum hatte. Zwar bewirkte die Verabreichung von **7**, dass *S.-aureus*-Kolonien ihre goldene Farbe verloren, das Wachstum von *S. aureus* wurde aber nicht gehemmt, da Staphyloxanthin hierfür nicht essenziell ist.^[4]

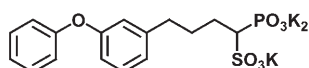
Die anschließende Untersuchung von CrtM als Virulenzfaktor erfolgte mit einem systemischen Infektionsmodell in Mäusen. Wenn 10^8 koloniebildende Einheiten des Wildtyps *S. aureus* oder einer *crtM*-Knockoutvariante intraperitoneal (ip) verabreicht wurden, war der *crtM*-defiziente Stamm nach 72 h beseitigt, während der Wildtypstamm, wie erwartet, weitaus resistenter gegen die oxidationsbasierte Abwehrreaktion der Mäuse war. Daraufhin wurden Mäuse vier Tage mit **7** behandelt und am zweiten Tag intraperitoneal infiziert, und am Ende des Tests wurden die in der Niere verbliebenen Bakterien ermittelt. Die Behandlung war erfolgreich, und die Autoren kamen zu dem Schluss, dass „dieses Ergebnis im Schnitt einer 98-proz. Verringerung der Zahl überlebender Bakterien in der Behandlungsgruppe entspricht“.^[4]

Eine Reihe von Erkenntnissen bleibt: 1) Die Annahme, dass die Inhibierung eines Virulenzfaktors in einem bakteriellen Erreger die Überlebensrate der Bakterien im Wirtorganismus drastisch beeinflusst, hat sich bestätigt. (Da aber *S. aureus* bekanntermaßen schwer zu „besiegen“ ist, wird es interessant sein zu sehen, ob wiederholte Behandlung des staphyloxanthindefizienten *S.-aureus*-Stamms zu kompensatorischen Mutationen führt, die das oxidative Verteidigungssystem des Wirts erneut umgehen können.) 2) Frühere medizinisch-chemische Studien von Squalensynthasen aus Säugetieren waren von enormem Nutzen für das hier vorgestellte Programm zur Entwicklung eines Antibiotikums. Dank dieser Vorarbeiten stand eine Sammlung von Inhibitormolekülen zur Verfügung, aus deren Daten wichtige Rückschlüsse bezüglich der Selektivität für das bakterielle Enzym gegenüber dem Wirtsenzym, der Fähigkeit zur Penetration in die *S.-aureus*-Zellen und der fehlenden Toxizität in Säugerzellen gezogen werden konnten. Die Festlegung auf eine neue Zielstruktur markiert nur den Beginn einer Wirkstoffentwicklung – maßgeblich ist aber, dass die Erfolgsaussichten steigen, wenn Verbindungen existieren, die bereits am Menschen getestet wurden.

Die hier vorgestellte Studie wirft die allgemeinere Frage nach der Zweckmäßigkeit von spezifischen gegenüber Breitbandantibiotika auf. Es ist wahrscheinlich, dass mögliche Inhibitoren der Staphyloxanthinbiosynthese auf die Behandlung von *S. aureus* beschränkt sind. Ist dieser Erreger so bedeutsam, dass er die Entwicklung eines speziellen Anti-



Farnesylthiodiphosphat (**6**)



BPH-652 (**7**)

Schema 2. Chemische Strukturen der CrtM-Inhibitoren.

biotikums rechtfertigt? Angesichts der hohen Sterblichkeit bei Infektionen mit *S. aureus* lautet die Antwort wahrscheinlich ja, und tatsächlich hat die US-amerikanische Food and Drug Administration kürzlich drei Antibiotika zugelassen, die primär auf MRSA abzielen (Quinupristin/Dalfopristin, Linezolid und Daptomycin).^[9] Zudem dürften mit Blick auf multiwirkstoffresistente Bakterien Kombinations-therapien immer häufiger werden, und ein Inhibitor der Staphyloxanthinbiosynthese könnte eine nützliche Zutat für solche antibakteriellen Cocktails sein.

Eine Empfehlung des US National Research Council aus 2006 umfasst die Entwicklung von spezifischen Antibiotika zur Minimierung der Störung der normalen mikrobiellen Flora und zur Minimierung der Resistenzentwicklung.^[10] Obwohl ökologisch stimmig, wird eine solche Entdeckungs- und Entwicklungsstrategie ihre eigenen Herausforderungen haben, man denke nur an Echtzeitdiagnostiktests für die rasche Erregeridentifizierung. Auch wird es unvermeidlich sein, dass Pharmafirmen ihre Einstellung bezüglich der Marktgröße neuer antibakterieller Medikamente überdenken – die Auf- findung eines bahnbrechendes Antibiotikums gegen Virulenz wäre hier sicher förderlich.

Online veröffentlicht am 24. Juni 2008

- [1] C. T. Walsh, *Antibiotics: Actions, Origins, Resistance*, ASM, Washington, **2003**.
- [2] R. M. Klevens, M. A. Morrison, J. Nadle, S. Petit, K. Gershman, S. Ray, L. H. Harrison, R. Lynfield, G. Dumyati, J. M. Townes, A. S. Craig, E. R. Zell, G. E. Fosheim, L. K. McDougal, R. B. Carey, S. K. Fridkin, *JAMA J. Am. Med. Assoc.* **2007**, 298, 1763.
- [3] A. Pelz, K. P. Wieland, K. Putzbach, P. Hentschel, K. Albert, F. Götz, *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 32493.
- [4] C. I. Liu, G. Y. Liu, Y. Song, F. Yin, M. E. Hensler, W. Y. Jeng, V. Nizet, A. H. Wang, E. Oldfield, *Science* **2008**, 319, 1391.
- [5] P. A. Edwards, J. Ericsson, *Annu. Rev. Biochem.* **1999**, 68, 157.
- [6] J. Pandit, D. E. Danley, G. K. Schulte, S. Mazzalupo, T. A. Pauly, C. M. Hayward, E. S. Hamanaka, J. F. Thompson, H. J. Harwood, Jr., *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 30610.
- [7] A. Clauditz, A. Resch, K. P. Wieland, A. Peschel, F. Götz, *Infect. Immun.* **2006**, 74, 4950.
- [8] D. T. Hung, E. A. Shakhnovich, E. Pierson, J. J. Mekalanos, *Science* **2005**, 310, 670.
- [9] R. H. Drew, *Pharmacotherapy* **2007**, 27, 227.
- [10] Committee on New Directions in the Study of Antimicrobial Therapeutics, *Treating Infectious Diseases in a Microbial World*, National Academies Press, Washington, **2006**.