

Direkte Identifizierung eines Siderophor-Importproteins durch synthetische Petrobactinliganden**

Nikolas Bugdahn, Florian Peuckert, Alexander G. Albrecht, Marcus Miethke, Mohamed A. Marahiel* und Markus Oberthür*

Die zunehmende Resistenz gegen nahezu alle klinisch genutzten Antibiotika wird zu einem immer größeren Problem im Gesundheitswesen. Während existierende Wirkstoffe an Einsatzbreite verlieren, wurden in den letzten Jahrzehnten nur einige wenige wirklich neue Antibiotika in die klinische Anwendung eingeführt. Die Inhibierung von biochemischen Prozessen, in die die bisher genutzten Antibiotika nicht eingreifen, ist daher eine vielversprechende Strategie zur Entwicklung neuer Wirkstoffe gegen resistente Keime. Ein Beispiel für einen solchen bisher nicht genutzten Angriffspunkt ist die siderophorgestützte Eisenaufnahme in Bakterien, die in den letzten Jahren intensiv untersucht wurde.^[1] Siderophore sind polare, niedermolekulare Stoffe mit außergewöhnlich hohen Eisenbindungsaffinitäten, die von Bakterien sekretiert und durch spezielle Transportsysteme wieder aufgenommen werden. Neben der Blockierung der Siderophor-Biosynthese bietet sich die Inhibierung der Export- und Importproteine als vielversprechender Ansatz zur Entwicklung neuer Antibiotika an, da die siderophorabhängige Eisenaufnahme sowohl für das Überleben als auch für die Virulenz von Pathogenen essenziell ist.^[2] Obwohl einige dieser Transport- und Bindungsproteine bereits charakterisiert wurden, sind weiterhin für viele Bakterien nur begrenzte Informationen über die jeweiligen Export- und Importsysteme verfügbar. Zudem wurden Siderophor-Bindungsproteine bisher nur indirekt entdeckt, indem nach Sequenzhomologien zu bekannten Transportern gesucht oder der Wachstumsphänotyp von Mutanten untersucht wurde.

Hier beschreiben wir die erste Isolierung eines Siderophor-Bindungsproteins aus einem Zellextrakt basierend auf der direkten Wechselwirkung mit seinem natürlichen Ligan-

den.^[3] Hierfür wurde die Affinitätschromatographie unter Verwendung des immobilisierten Siderophors genutzt, der sich die Identifizierung des zurückgehaltenen Proteins durch massenspektrometrische Analyse anschloss (Abbildung 1 A).

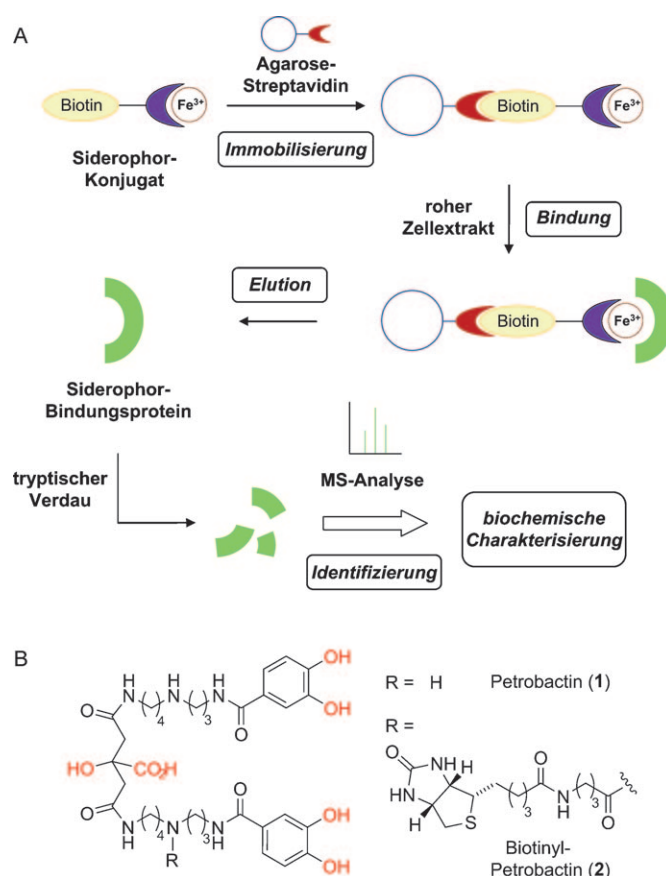


Abbildung 1. A) Identifizierung von Siderophor-Bindungsproteinen mittels Affinitätschromatographie und immobilisierten Siderophoren als Liganden. Die zurückgehaltenen Proteine werden massenspektrometrisch identifiziert und anschließend biochemisch charakterisiert. B) Chemische Struktur von Petrobactin (1) und Biotinyl-Petrobactin (2). Rot hervorgehoben sind die Gruppen, die an der Eisenbindung beteiligt sind.

Die Überproduktion in *Escherichia coli* und die anschließende Reinigung ermöglichten dann die biochemische Charakterisierung des rekombinanten Proteins. Dieser neuartige Ansatz erlaubt die Selektion von spezifischen Bindungsproteinen aus einer Vielzahl von Siderophor-Importsystemen, wie sie in Zellextrakten vorliegen können.

[*] N. Bugdahn,^[+] Dr. M. Oberthür
Fachbereich Chemie, Philipps-Universität Marburg
Hans-Meerwein-Straße, 35032 Marburg (Deutschland)
Fax: (+49) 6421-282-2021
E-Mail: oberthuer@chemie.uni-marburg.de

F. Peuckert,^[+] A. G. Albrecht, Dr. M. Miethke, Prof. Dr. M. A. Marahiel
Fachbereich Chemie, Philipps-Universität Marburg
Hans-Meerwein-Straße, 35032 Marburg (Deutschland)
Fax: (+49) 6421-282-2191
E-Mail: marahiel@staff.uni-marburg.de

[+] Diese Autoren trugen in gleichem Maße zu dieser Arbeit bei.

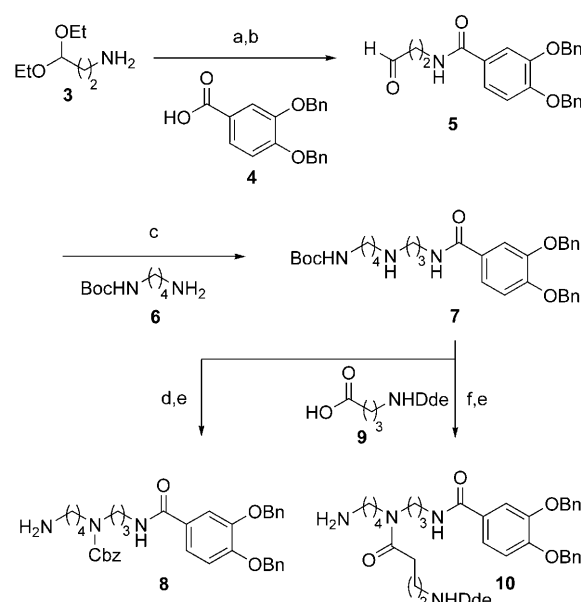
[**] Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für finanzielle Unterstützung, Dr. Uwe Linne und Natalia Fritzler für massenspektrometrische Analysen sowie Tanja Ellenberger und Michael Kock (Forschungsstudenten) für hervorragende technische Unterstützung.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201005527> zu finden.

Für die Isolierung eines Siderophor-Bindungsproteins wählten wir das Siderophor Petrobactin, das insbesondere von den beiden Pathogenen *Bacillus cereus* und *Bacillus anthracis* produziert wird.^[4] Basierend auf Sequenzhomologien wurden kürzlich zwei Petrobactin-Bindungsproteine für *B. cereus* identifiziert,^[5] ebenso konnten durch genetische Studien verwandte Petrobactin-Importsysteme in *B. anthracis* bestimmt werden.^[6] *B. anthracis* sekretiert Petrobactin (**1**; Abbildung 1B) als Virulenzfaktor, da das zweite von ihm produzierte Siderophor, Bacillibactin, während einer Infektion von einem Protein des angeborenen Immunsystems, Siderocalin, abgefangen wird.^[7] Petrobactin (**1**) ist daher essenziell für die Eisenaufnahme von *B. anthracis* im menschlichen Wirt. Demzufolge könnte die Inhibierung dieses Prozesses die Möglichkeit bieten, Anthraxinfektionen zu behandeln.

Petrobactin enthält zwei 3,4-Dihydroxybenzoateinheiten, die über einen Spermidinlinker mit einem Citratrückgrat verbunden sind. Die beiden Catecholreste und die zentralen Carboxy- und Hydroxygruppen der Citrateinheit (rot in Abbildung 1B) agieren als Liganden bei der Bildung eines oktaedrischen Eisenkomplexes. Da die Spermidin-Aminogruppen nicht direkt an der Bildung des Eisenkomplexes beteiligt sind, wurden sie für die Derivatisierung mit einer Biotin-Gruppe ausgewählt, um so eine Immobilisierung des Siderophors auf Streptavidin-derivatisierter Agarose als festem Träger für die Affinitätschromatographie zu ermöglichen. Daher synthetisierten wir das biotinylierte Petrobactin **2** (Abbildung 1B) mit dem über γ -Aminobuttersäure als Linker verknüpften Biotinrest an der zentralen Aminogruppe eines der Spermidinlinker; zudem erzeugten wir für eine biochemische Charakterisierung ausreichende Mengen an Petrobactin (**1**).

Unser Weg zur benötigten Petrobactin-Spermidinseitenkette **8** und zur modifizierten Seitenkette **10** mit einem Dde-geschützten γ -Aminobuttersäurerest ausgehend vom kommerziell erhältlichen Diacetal von 3-Aminopropanal, **3**, und von der bekannten Benzoesäure **4**^[8] ist in Schema 1 beschrieben. Verglichen mit bereits bekannten Synthesen^[8,9] ist unsere optimierte Route zu den Petrobactin-Seitenketten operativ einfach und effizient. Darüber hinaus zeigte sich in den nachfolgenden Kupplungsreaktionen, dass das Schützen der zentralen Aminogruppe verbesserte Ausbeuten zur Folge hatte (Schema 2). Für die Synthese von Petrobactin (**1**) wurde das *tert*-Butylcitrat **11** als *N*-Hydroxysuccinimidester (NHS) aktiviert^[8] und nachfolgend mit der Seitenkette **8** zum geschützten Petrobactinderivat **12** gekuppelt (87%). Die anschließende Abspaltung der *tert*-Butylgruppe wurde von der Bildung geringer Mengen des bekannten Imid-Nebenprodukts begleitet^[8,10] (siehe Hintergrundinformationen). Hydrierung und Reinigung des Rückstands mittels Umkehrphasen-HPLC lieferten **1** in 30% Ausbeute. Die Synthese des biotinylierten Petrobactins **2** begann mit der Reaktion von *tert*-Butylzitronensäureanhydrid **13** mit der linkertragenden Seitenkette **10** in exzellenter Ausbeute zum Monoamid **14**. NHS-Aktivierung und Reaktion mit der Petrobactin-Seitenkette **8** lieferten schließlich das vollständig geschützte Petrobactinderivat **15** (82%). Die Biotin-Gruppe wurde anschließend durch selektive Abspaltung der Dde-Schutzgruppe mit

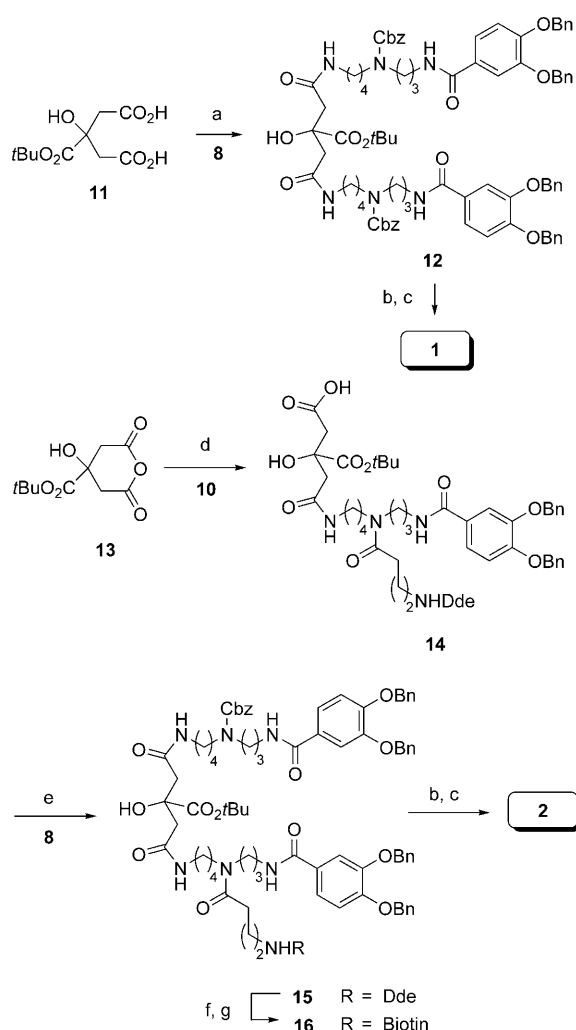


Schema 1. Synthese der Spermidinseitenketten **8** und **10**. Reagentien und Bedingungen: a) **4**, EDC, HOBT, Et₃N, DMF, 92%; b) PPTS, Aceton/H₂O, 40°C, 96%; c) **6**, NaBH(OAc)₃, Et₃N, MeOH, 71%; d) CbzCl, Et₃N, MeOH, 94%; e) TFA, CH₂Cl₂, 0°C, 95% (**8**); 97% (**10**); f) **9**, EDC, HOBT, Et₃N, DMF, 96%. EDC = 1-(3-Dimethylamino-propyl)-3-ethylcarbodiimid-Hydrochlorid, HOBT = 1-Hydroxybenzotriazol, DMF = *N,N*-Dimethylformamid, PPTS = Pyridinium-*para*-toluolsulfonat, Boc = *tert*-Butoxycarbonyl, Cbz = Benzyloxycarbonyl, Dde = 1-(4,4-Dimethyl-2,6-dioxocyclohexylen)ethyl, TFA = Trifluoressigsäure.

Hydrazin und nachfolgende Biotinylierung des freigesetzten Amins eingeführt (84%). Die Entfernung aller Schutzgruppen und die Reinigung mittels HPLC lieferten schließlich das biotinylierte Petrobactin **2**.

Wenn eine wässrige Lösung des biotinylierten Petrobactins **2** mit FeCl₃ bei pH 8 versetzt wird, ist die Eisenkomplexierung deutlich durch die starke Farbänderung zu violett erkennbar. Die Bildung des Siderophor-Eisen(III)-Komplexes konnte auch massenspektrometrisch bestätigt werden. Nach Inkubation der mit Streptavidin derivatisierten Agarose mit dem eisenbeladenen Siderophor wurden die lilafarbenen Kügelchen in eine Säule überführt und mit PBS-Puffer (PBS: phosphatgepufferte Kochsalzlösung) äquilibriert. Um zu testen, ob das immobilisierte Petrobactinderivat **2** relevante Bindungsproteine aus Zellextrakten isolieren kann, wählten wir *Bacillus subtilis* als Modellorganismus. *B. subtilis* produziert selbst kein Petrobactin (**1**), kann dieses Siderophor aber aus der Umwelt unter Verwendung eines Importsystems aufnehmen,^[11] das zu Beginn unserer Untersuchung noch unbekannt war. Das Zelllysate einer *B. subtilis*-Kultur wurde auf die Affinitätssäule aufgegeben und diese anschließend gewaschen. Nach der Elution wurden die erhaltenen Fraktionen tryptisch verdaut und die Proteinfragmente massenspektrometrisch mit der MASCOT-Software und der MSDB-Datenbank untersucht (siehe Hintergrundinformationen).^[12]

In den ersten Experimenten wurde eine größere Zahl an Proteinen auf der Säule zurückgehalten. Eine Negativkontrolle mit unbeladenen Streptavidin-Agarosekügelchen zeigte allerdings, dass die meisten Proteine von der Matrix



Schema 2. Synthese von 1 und 2. Reagentien und Bedingungen:

a) 1. NHS, DCC, THF; 2. **8**, Et₃N, 1,4-Dioxan; 87%; b) AcOH, konz. HCl; c) H₂ (45 bar), Pd-C, EtOH/H₂O, danach Reinigung durch Umkehrphasen-HPLC, 30% (**1**, 2 Stufen); 26% (**2**, 2 Stufen); d) **10**, Et₃N, DMF, 84%; e) 1. NHS, DIC, THF; 2. **8**, Et₃N, 1,4-Dioxan; 82%; f) N₂H₄, EtOH; g) Biotin-NHS-Ester, iPr₂EtN, DMF, 84% (2 Stufen). DCC = Dicyclohexylcarbodiimid, DIC = Diisopropylcarbodiimid.

selbst zurückgehalten wurden. Nach einer Reihe von Experimenten konnten wir unspezifische Bindungen durch vorherige Inkubation der siderophorbeladenen Säule mit Rinderserumalbumin deutlich verringern. Danach war YclQ das einzige Protein, das wiederholt durch eine spezifische Interaktion mit der Petrobactin-derivatisierten Säule zurückgehalten wurde (siehe Hintergrundinformationen). YclQ ist das Substratbindungsprotein eines ABC-Transporters und Teil des *yclNOPQ*-Genclusters. Es wurde kürzlich – basierend auf Sequenzhomologien – durch die Gruppe von Raymond als Petrobactin-Bindungsprotein in *B. subtilis* identifiziert,^[13] was die Tauglichkeit unseres Ansatzes bestätigt. Wegen dieser Funktion schlagen wir vor, den Gencluster in *fpiBCDA* (*fpi*: ferric petrobactin import) und entsprechend YclQ in FpiA umzubenennen.

Um die Rolle des identifizierten Proteins auf dem Genniveau aufzuklären, wurde eine *B. subtilis*- Δ *fpiA*-Mutante

hergestellt, die aufgrund ihres Δ *dhbC*-Hintergrunds ebenfalls nicht in der Lage ist, die endogenen, hochaffinen Eisenchelatoren 2,3-Dihydroxybenzoesäure und Bacillibactin zu produzieren.^[14] Die resultierende Δ *dhbC* Δ *fpiA*-Doppelmutante und die Δ *dhbC*-Mutante (als Kontrolle) wurden unter Eisenlimitation und Zugabe von FeCl₃, Bacillibactin oder Petrobactin angezogen (Abbildung 2). Bei beiden Mutanten war die Wachstumsgeschwindigkeit in Gegenwart von FeCl₃ oder Bacillibactin gegenüber derjenigen unter Eisenlimitationsbedingungen erhöht, was auf eine siderophorunabhängige bzw. Bacillibactin-vermittelte Eisenaufnahme zurückzuführen ist.

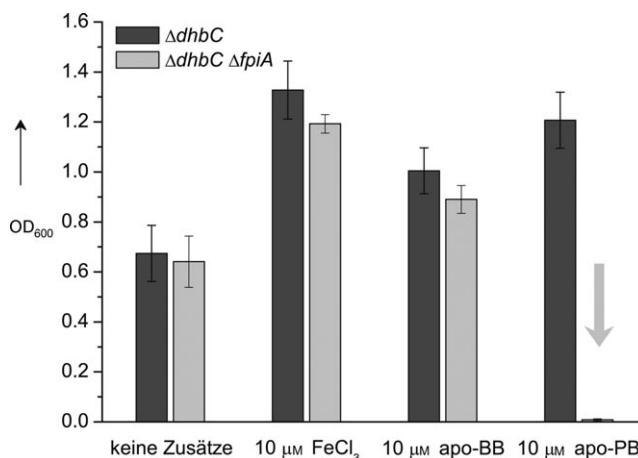


Abbildung 2. Endgültige OD₆₀₀-Werte (nach 18 h) der Δ *dhbC*- und Δ *dhbC* Δ *fpiA*-Kulturen mit verschiedenen Additiven. Der graue Pfeil verdeutlicht die vollständige Inhibierung des Wachstums der Doppelmutante bei Zugabe von apo-Petrobactin. apo-BB = Bacillibactin (eisenfrei), apo-PB = Petrobactin (eisenfrei).

Im Gegensatz zum Δ *dhbC*-Stamm wuchs die Δ *dhbC* Δ *fpiA*-Doppelmutante in Gegenwart von eisenfreiem Petrobactin nicht. Dies belegt, dass FpiA in der Tat das einzige Petrobactin-Bindungsprotein von *B. subtilis* ist. Die Wachstumshemmung im Fall der Δ *dhbC* Δ *fpiA*-Doppelmutante kann durch eine antibiotische Wirkung von Petrobactin erklärt werden, das die verbleibenden Eisenspuren im Medium bindet.

Die Bindung des nativen Liganden Petrobactin (**1**) und seines biotinylierten Analogons **2** sowie einiger weiterer möglicher Liganden durch rekombinant produziertes FpiA wurde mittels Fluoreszenzspektroskopie untersucht (siehe Hintergrundinformationen). Die erhaltene Bindungskonstante von FpiA für Petrobactin (51 nM) stimmt gut mit den Daten der Raymond-Gruppe^[13] überein. Der Eisenkomplex des biotinylierten Petrobactins **2** wird von FpiA um etwa drei Größenordnungen schwächer gebunden. Doch offenbar ist diese geringere Bindungsaffinität immer noch ausreichend für ein erfolgreiches Zurückhalten des Bindungsproteins FpiA durch die derivatisierte Säule.^[15]

Die Stöchiometrie der Bindung zwischen FpiA und seinem nativen Liganden **1** ist eher ungewöhnlich. Wir bestimmten in unseren Fluoreszenztitrationsexperimenten ein

Protein-Ligand-Verhältnis von 1:4. Um die Messungen der intrinsischen Proteinfluoreszenz zu untermauern, untersuchten wir die Protein-Siderophor-Interaktion zusätzlich mittels ligandenabhängiger Schmelzpunktanalyse.^[16] Der Anstieg des Schmelzpunkts aufgrund der ligandeninduzierten Stabilisierung des Komplexes war bei einem Protein-Ligand-Verhältnis von 1:4 oder höher maximal (Abbildung 3). Dieselbe

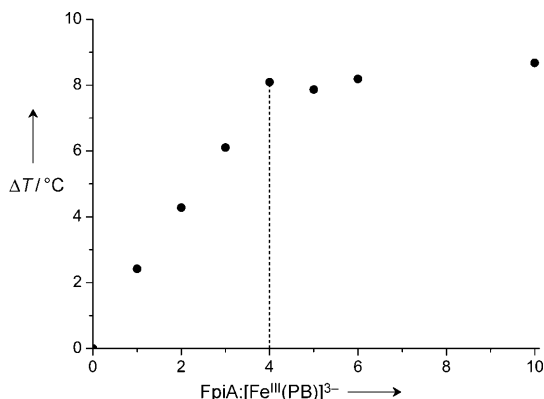


Abbildung 3. Petrobactin-abhängige thermische Stabilisierung von FpIA. Die Schmelzpunkte wurden durch CD-Spektroskopie bestimmt. Maximal war die Stabilisierung (ΔT) bei einem Protein-Ligand-Verhältnis von 1:4 und höher.

Stöchiometrie wurde kürzlich für die Petrobactin-Bindungsproteine FatB und FpuA aus *B. cereus* erhalten.^[5] Doch die meisten Siderophor-Bindungsproteine interagieren mit ihrem Liganden in einem Verhältnis von 1:1, was eine weitergehende Untersuchung der FpIA-Petrobactin-Interaktion interessant erscheinen lässt.

Wir haben hier demonstriert, dass das biotinylierte Petrobactinderivat **2** ein nützliches Werkzeug für die direkte Identifizierung von Siderophor-Bindungsproteinen mittels Affinitätschromatographie ist. Die Robustheit unserer Methode zeigt sich in der erfolgreichen Retention und Identifizierung des membrangebundenen Proteins FpIA, dem einzigen Petrobactin-Bindungsprotein in *B. subtilis*. Dieser neuartige Ansatz wird gegenwärtig auf die Isolierung von Petrobactin-Bindungsproteinen pathogener Bakterien wie *B. anthracis* ausgeweitet. Von größter Wichtigkeit ist die Tatsache, dass dieser Ansatz vor allem für die Isolierung von Bindungsproteinen, die keine Homologien zu bekannten Siderophor-Transportern aufweisen, nützlich sein sollte. Die Identifizierung und anschließende biochemische und strukturelle Charakterisierung solcher Transportproteine sind erste Schritte in der Entwicklung von Antibiotika, die die bakterielle Eisenaufnahme verhindern.

Eingegangen am 3. September 2010
Online veröffentlicht am 29. November 2010

Stichwörter: Affinitätschromatographie · Siderophore · Siderophor-Importproteine · Immobilisierung · Petrobactin

- [1] a) M. Miethke, M. A. Marahiel, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2007**, *71*, 413–415; b) K. D. Krewulak, H. J. Vogel, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2008**, *1778*, 1781–1804; c) R. C. Hider, X. Kong, *Nat. Prod. Rep.* **2010**, *27*, 637–657.
- [2] Bisher wurde nicht vorrangig die Inhibierung der Siderophoraufnahme untersucht, sondern es wurden Siderophoraufnahmesysteme zum Einschleusen von Siderophorkonjugaten mit antibiotisch wirksamen Gruppen (Sideromycin oder „Trojanisches-Pferd-Antibiotikum“) in Bakterien genutzt (siehe Lit. [1] für einen Überblick).
- [3] Ein verwandter Ansatz, unter Verwendung des auf goldbeschichteten Glasplättchen immobilisierten Siderophors Pyoverdin, diente kürzlich zur Isolierung und Identifizierung des Bakteriums *Pseudomonas aeruginosa* (nicht jedoch eines spezifischen Importsystems): D. D. Doorneweerd, W. A. Henne, R. G. Reifemberger, P. S. Low, *Langmuir* **2010**, *26*, 15424–15429.
- [4] a) M. K. Wilson, R. J. Abergel, K. N. Raymond, J. E. Arceneaux, B. R. Byers, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, *348*, 320–325; b) K. Hotta, C. Y. Kim, D. T. Fox, A. T. Koppisch, *Microbiology* **2010**, *156*, 1918–1925; c) A. T. Koppisch, C. C. Browder, A. L. Moe, J. T. Shelley, B. A. Kinkel, L. E. Hersman, S. Iyer, C. E. Ruggiero, *BioMetals* **2005**, *18*, 577–585.
- [5] A. M. Zawadzka, R. J. Abergel, R. Nichiporuk, U. N. Andersen, K. N. Raymond, *Biochemistry* **2009**, *48*, 3645–3657.
- [6] P. E. Carlson, Jr., S. D. Dixon, B. K. Janes, K. A. Carr, T. D. Nusca, E. C. Anderson, S. E. Keene, D. H. Sherman, P. C. Hanna, *Mol. Microbiol.* **2010**, *75*, 900–909.
- [7] R. J. Abergel, M. K. Wilson, J. E. Arceneaux, T. M. Hoette, R. K. Strong, B. R. Byers, K. N. Raymond, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 18499–18503.
- [8] R. A. Gardner, R. Kinkade, C. Wang, O. Phanstiel IV, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 3530–3537.
- [9] R. J. Bergeron, G. Huang, R. E. Smith, N. Bharti, J. S. McManis, A. Butler, *Tetrahedron* **2003**, *59*, 2007–2014.
- [10] Die Neigung von citratbasierten Siderophoren zur Bildung von Imiden ist seit langem bekannt: B. H. Lee, M. J. Miller, *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 24–31, zit. Lit.
- [11] R. J. Abergel, A. M. Zawadzka, K. N. Raymond, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 2124–2125.
- [12] D. N. Perkins, D. J. Pappin, D. M. Creasy, J. S. Cottrell, *Electrophoresis* **1999**, *20*, 3551–3567.
- [13] A. M. Zawadzka, Y. Kim, N. Maltseva, R. Nichiporuk, Y. Fan, A. Joachimiak, K. N. Raymond, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 21854–21859.
- [14] M. Miethke, O. Klotz, U. Linne, J. J. May, C. L. Beckering, M. A. Marahiel, *Mol. Microbiol.* **2006**, *61*, 1413–1427.
- [15] FpIA könnte auch eine höhere Affinität für das biotinylierte Petrobactin **2** auf der festen Phase aufgrund eines multivalenten Bindungsmodus aufweisen.
- [16] F. Peuckert, M. Miethke, A. G. Albrecht, L.-O. Essen, M. A. Marahiel, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 8066–8069; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 7924–7927.