

Naturstoffe bei der Arbeit: strukturelle Einblicke in die Inhibition des bakteriellen Membranproteins MraY

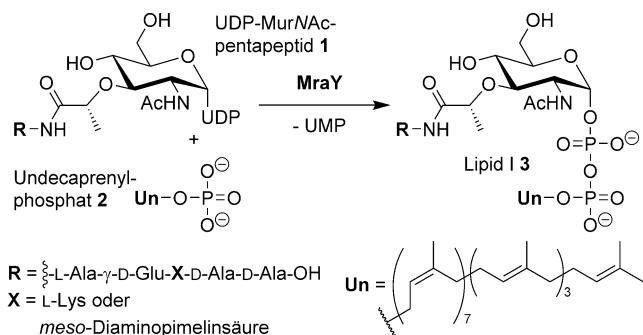
Stefan Koppermann und Christian DUCHO*

Antibiotika · Medizinische Chemie · Naturstoffe ·
Peptidoglycan · Protein-Kristallographie

Über Jahrzehnte hinweg konnten bakterielle Infektionen mit Antibiotika effektiv bekämpft werden. Zunehmend bedrohen jedoch Infektionen (multi)resistenter Bakterienstämme unsere Gesundheit.^[1] Es werden daher neue antibakterielle Substanzen, die neuartige oder bisher ungenutzte Wirkmechanismen aufweisen, benötigt, um diese Infektionen effektiv zu bekämpfen. Seit der Einführung der Penicilline in den 1940er Jahren hat sich die Biosynthese der bakteriellen Zellwand (also des Peptidoglycans) als nützliche Quelle für Targets antibakterieller Wirkstoffe erwiesen.^[2] Allerdings unterbinden die meisten dieser Wirkstoffe späte, extrazelluläre Schritte dieses mikrobiellen Prozesses. Die frühen intrazellulären oder membrangebundenen Schritte wurden hingegen nur vereinzelt zur Entwicklung von Antibiotika genutzt.

Einen Schlüsselschritt des intrazellulären Abschnitts der Peptidoglycan-Biosynthese stellt die Verankerung des löslichen cytosolischen Bausteins UDP-MurNAc-Pentapeptid („Parks Nucleotid“, **1**) in der Zellmembran dar. Dabei wird **1** mit dem lipophilen Membrananker Undecaprenylphosphat (**2**) zum Membran-assoziierten Intermediat Lipid I (**3**) verknüpft (Schema 1). Diese Reaktion wird von dem Membranprotein MraY (Translocase I) vermittelt, das oft als mögliches neues Wirkstoff-Target genannt wird.^[3] Das Enzym MraY gehört zur Superfamilie der PNPT (Polyprenylphosphat-N-acetyl-hexosamin-1-phosphat-Transferasen), die auch bei der Glycosylierung von Proteinen eine wichtige Rolle spielt. MraY wird von natürlich vorkommenden Uridin-abgeleiteten Sekundärmetaboliten, den „Nucleosid-Antibiotika“, inhibiert, zu denen unter anderem die strukturell verwandten Unterklassen der Muraymycine, Caprazamycine, Liposidomycine, Capuramycine und Mureidomycine zählen. Somit sind Nucleosid-Antibiotika und ihre synthetischen Analoga als Leitstrukturen für die Wirkstoff-Entwicklung von Interesse.^[4]

Die Struktur von MraY wurde mit einem Topologie-modell vorhergesagt. Danach besteht das Protein aus zehn



Schema 1. Reaktion, die durch das bakterielle Membranprotein MraY katalysiert wird. UDP = Uridindiphosphat, UMP = Uridinmonophosphat.

transmembranen Helices und fünf cytosolischen Schleifen, die das Aktivzentrum bilden.^[5] Auch mechanistische Untersuchungen an MraY, unter anderem Mutagenese-Studien, wurden durchgeführt, lieferten aber bisher keinen allgemein akzeptierten molekularen Mechanismus der MraY-vermittelten Reaktion.^[6] MraY-Homologe aus verschiedenen Bakterienstämmen konnten heterolog und auch in zellfreien Systemen überexprimiert werden.^[7] 2013 gelang Lee et al. ein Durchbruch mit der ersten Röntgenkristallstruktur eines MraY-Homologen aus dem extremophilen *Aquifex aeolicus*, die zahlreiche Vorhersagen des Topologiemodells bestätigte.^[8] Einen Einblick in die Hemmung von MraY durch Nucleosid-Antibiotika lieferte diese Struktur jedoch nicht, weshalb die Auswirkungen auf die Entwicklung von MraY-Inhibitoren begrenzt blieben.

Dieser aktuelle Stand der Forschung wurde durch eine neue Arbeit von Lee et al. erheblich erweitert.^[9] Es gelang ihnen, eine Röntgenkristallstruktur von MraY (erneut aus *Aquifex aeolicus*) im Komplex mit dem Inhibitor Muraymycin D2 (MD2, **4**; Abbildung 1) in einer Auflösung von 2.95 Å zu erhalten. Ebenso wie das Apoenzym ohne Ligand kristallisierte der MraY-MD2-Komplex als Dimer, bei dem jedes Monomer aus zehn Transmembran-Helices (TM1-10) und fünf cytosolischen Schleifen (A-E) besteht. Das aktive Zentrum von MraY befindet sich auf der cytosolischen Seite der Zellmembran (Abbildung 1 A,B). Frühere Studien identifizierten drei für die katalytische Aktivität wichtige Aminosäurereste (Asp117, Asp118, Asp265),^[6] die innerhalb der

[*] S. Koppermann, Prof. C. DUCHO

Fachrichtung Pharmazie, Pharmazeutische und Medizinische Chemie, Universität des Saarlandes
Campus C2 3, 66123 Saarbrücken (Deutschland)
E-Mail: christian.duch@uni-saarland.de

Die Identifikationsnummer (ORCID) eines Autors ist unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201606396> zu finden.

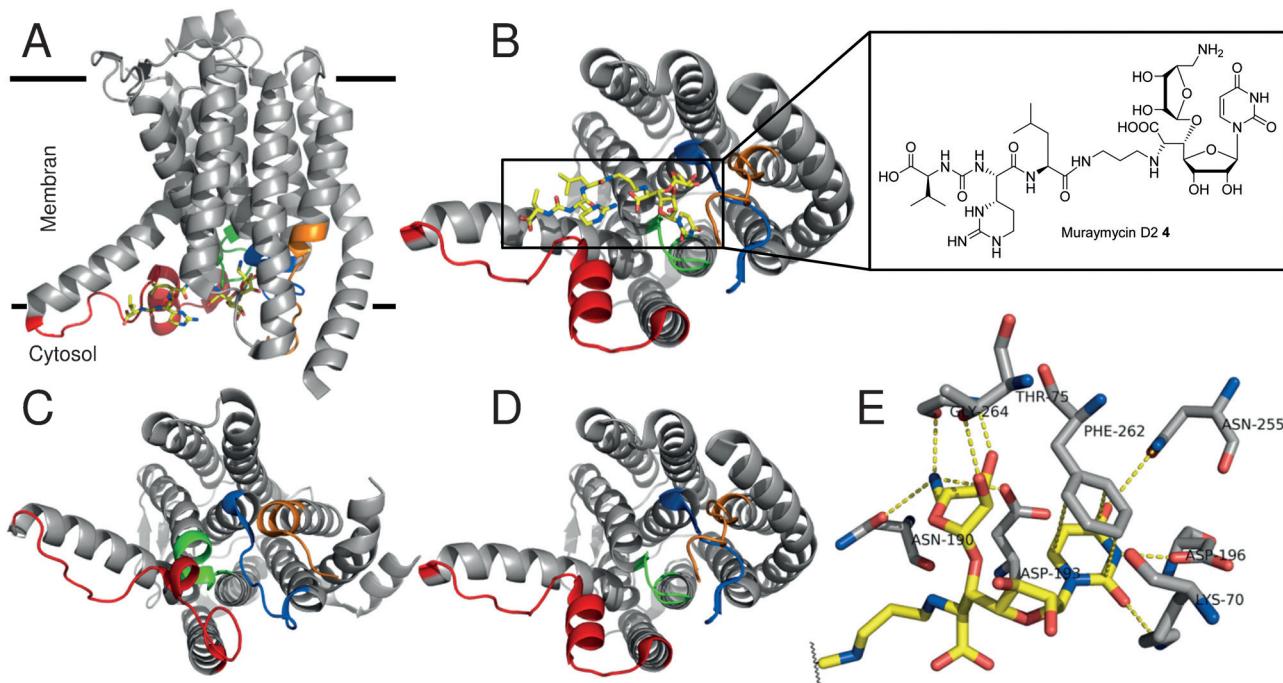


Abbildung 1. A) Röntgenkristallstruktur von MraY im Komplex mit Muraymycin D2 (MD2, 4; PDB 5CKR)^[9] und dessen schematisch gezeigte Position in der Zellmembran (Rückgrat des MD2-Liganden in Gelb). B) Ansicht des MraY-MD2-Komplexes von der cytosolischen Seite des Proteins sowie die Struktur von MD2. C) Röntgenkristallstruktur des ligandenfreien Apoproteins (PDB 4J72).^[8] Ansicht von der cytosolischen Seite. D) MraY-MD2-Komplex^[9] ohne den Liganden, Ansicht von der cytosolischen Seite. Für die Bindung von MD2 geht MraY erhebliche Konformationsänderungen ein, die durch den direkten Vergleich von (C) und (D) illustriert werden. Teile des Proteins, die infolge der Ligandbindung große Distanzen zurücklegen, sind in verschiedenen Farben hervorgehoben. E) Beispiel für die molekularen Einblicke in den MraY-MD2-Komplex: Wechselwirkungen der 5'-O-aminoribosylierten Uridin-abgeleiteten Kernstruktur von MD2 mit dem Protein.

PNPT-Enzym-Superfamilie hoch konserviert sind. MD2 interagiert jedoch mit keiner dieser Aminosäure-Seitenketten. Das Protein durchläuft hingegen durch die Ligandenbindung eine erhebliche Konformationsänderung, bei der einzelne Reste (vor allem die Uracil-bindenden Gruppen) große Distanzen zwischen 5 und 17 Å zurücklegen (Abbildung 1C,D). Die Schleifen C und D bilden die Bindetasche für die Uracil-Nucleobase und den 5'-O-Aminoribosyl-Rest von MD2 aus. Helix TM9 weist einen Knick auf und wird daher in TM9a und TM9b unterteilt. TM9b rotiert vom aktiven Zentrum weg und löst damit eine Konformationsänderung von Schleife E aus. Die dabei entstehende offene Struktur ermöglicht die Bindung des Peptidteils von MD2. Ein von der Lee-Gruppe angefertigtes Video (online zusammen mit der Originalarbeit veröffentlicht) illustriert eindrucksvoll diese Strukturänderung.^[9] Ferner bietet die Struktur des MraY-MD2-Komplexes detaillierte Einblicke in die Wechselwirkungen zwischen Inhibitor und Protein auf molekularer Ebene (Abbildung 1E).

Lee et al. führten auch Mutagenese-Studien und Experimente mit isothermer Titrationskalorimetrie (ITC) durch, um die MD2-Bindungsaffinität eingehender zu untersuchen. Auffallend war, dass einige Mutationen (z. B. Asp193Asn) funktionsfähige Proteine mit keiner oder sehr geringer Affinität zu MD2 lieferten. Dies deutet darauf hin, dass das natürliche Substrat **1** und MD2 **4** unterschiedliche Bindungsmodi aufweisen, obwohl MD2 MraY kompetitiv hemmt. Zusammengefasst interagiert MD2 weder mit den für die

katalytische Aktivität wichtigsten Aminosäuren, noch wirkt der 5'-O-Aminoribosyl-Rest als Pyrophosphat-Mimetikum. Während Mg²⁺ (als potenziell phosphatbindende Einheit) essenziell für die katalytische Aktivität von MraY ist, hatte es keinen Einfluss auf die Bindung von MD2. In der Entwicklung von Inhibitoren von PNPT-Enzymen wie MraY stellt die molekulare Imitation der Pyrophosphat-Einheiten eine große Herausforderung für die medizinische Chemie dar, vor allem im Hinblick auf Target-Affinität und Zellaufnahme. Die diskutierte Struktur des MraY-MD2-Komplexes zeigt eindrucksvoll, wie die Natur diese Aufgabe gelöst hat.

Die kürzlich publizierte Röntgenkristallstruktur von MraY (aus *Aquifex aeolicus*) im Komplex mit Muraymycin D2^[9] stellt insgesamt einen Meilenstein der Forschung an diesem bakteriellen Membranprotein und seiner natürlichen Inhibitoren dar. Sowohl die nachgewiesene konformative Plastizität von MraY als auch die molekularen Details der MraY-MD2-Wechselwirkung werden das zukünftige Design neuer MraY-Inhibitoren erleichtern. Daher ist zu erwarten, dass die Entwicklung von MraY-hemmenden antibakteriellen Wirkstoffkandidaten in großem Maße von dieser Arbeit profitieren wird.

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 11722–11724
Angew. Chem. **2016**, *128*, 11896–11898

[1] a) G. Taubes, *Science* **2008**, *321*, 356–361; b) M. A. Cooper, D. Shlaes, *Nature* **2011**, *472*, 32.

- [2] a) A. Gautam, R. Vyas, R. Tewari, *Crit. Rev. Biotechnol.* **2011**, *31*, 295–336; b) R. B. Hamed, J. R. Gomez-Castellanos, L. Henry, C. Ducho, M. A. McDonough, C. J. Schofield, *Nat. Prod. Rep.* **2013**, *30*, 21–107.
- [3] T. D. H. Bugg, A. J. Lloyd, D. I. Roper, *Infect. Disord.: Drug Targets* **2006**, *6*, 85–106.
- [4] a) M. Winn, R. J. M. Goss, K.-I. Kimura, T. D. H. Bugg, *Nat. Prod. Rep.* **2010**, *27*, 279–304; b) S. Ichikawa, M. Yamaguchi, A. Matsuda, *Curr. Med. Chem.* **2015**, *22*, 3951–3979; c) D. Wiegmann, S. Koppermann, M. Wirth, G. Niro, K. Leyerer, *Beilstein J. Org. Chem.* **2016**, *12*, 769–795.
- [5] A. Bouhss, D. Mengin-Lecreulx, D. Le Beller, J. van Heijenoort, *Mol. Microbiol.* **1999**, *34*, 576–585.
- [6] a) A. J. Lloyd, P. E. Brandish, A. M. Gilbey, T. D. H. Bugg, *J. Bacteriol.* **2004**, *186*, 1747–1757; b) B. Al-Dabbagh, X. Henry, M. E. Ghachi, G. Auger, D. Blanot, C. Parquet, D. Mengin-Lecreulx, A. Bouhss, *Biochemistry* **2008**, *47*, 8919–8928.
- [7] a) A. Bouhss, M. Crouvoisier, D. Blanot, D. Mengin-Lecreulx, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 29974–29980; b) E. Henrich, Y. Ma, I. Engels, D. Münch, C. Otten, T. Schneider, B. Henrichfreise, H.-G. Sahl, V. Dötsch, F. Bernhard, *J. Biol. Chem.* **2016**, *291*, 2535–2546.
- [8] B. C. Chung, J. Zhao, R. A. Gillespie, D.-Y. Kwon, Z. Guan, J. Hong, P. Zhou, S.-Y. Lee, *Science* **2013**, *341*, 1012–1016.
- [9] B. C. Chung, E. H. Mashalidis, T. Tanino, M. Kim, A. Matsuda, J. Hong, S. Ichikawa, S.-Y. Lee, *Nature* **2016**, *533*, 557–560.

Eingegangen am 1. Juli 2016

Online veröffentlicht am 11. August 2016