

KLAAS M. POS, INSTITUT FÜR BIOCHEMIE

Membrane Transport Machineries: Das Antibiotika Auswärtspump- system AcrA/AcrB/TolC

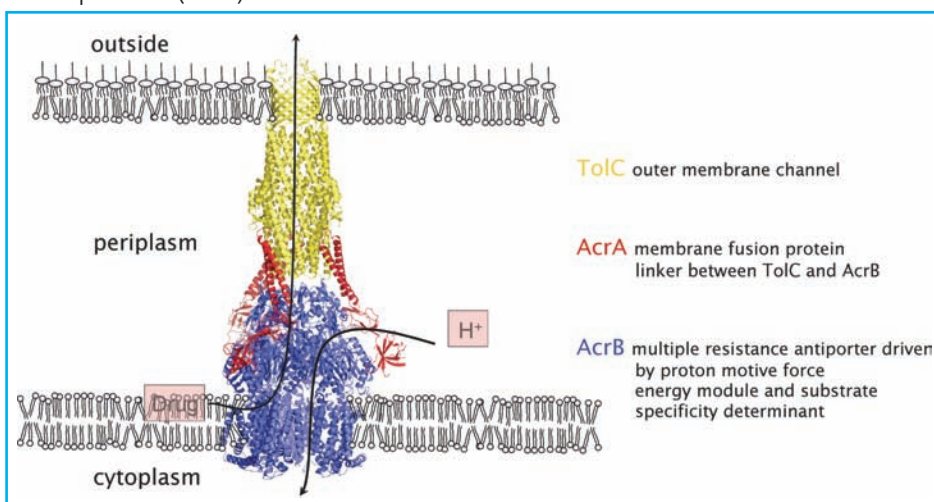
Bakterien haben eine Vielzahl von Möglichkeiten, um sich gegen schädliche Substanzen wie Antibiotika zu wehren. Viele von ihnen verfügen über Pumpen, mit denen Arzneimittel aus der Zelle hinaus befördert werden. Die therapeutische Konzentration dieser Substanzen innerhalb der Bakterienzelle ist dann zu niedrig und sie können ihre schädigende Wirkung nicht ausüben. Heute stellen multi-resistente Krankheitserreger, bei denen u. A. solche Pumpsysteme eine zentrale Rolle spielen, ein sehr ernstzunehmendes Problem bei Patienten mit einer Immunschwäche (bedingt z.B. durch Chemotherapie oder HIV) dar und es existieren Bakterien, die man mit keinem Antibiotikum mehr bezwingen kann.

Der Arbeitskreis „Membrane Transport Machineries“ am Institut für Biochemie beschäftigt sich mit der Entschlüsselung der Baupläne dieser Pumpen, um die genauen Transportmechanismen zu erforschen (Pos, 2009). Ein Verständnis dieser Mechanismen kann bei der Entwicklung spezifischer Inhibitoren, welche die Funktion der Pumpen hemmen oder lahm legen, genutzt werden.

DIE ACRB PUMPE

Das Antibiotikumpumpsystem AcrAB-TolC des Darmbakteriums *Escherichia coli* besteht aus drei Komponenten (Bild 1):

Bild 1: Schematische Darstellung des dreiteiligen AcrAB-TolC Efflux-Systems in *E. coli*. AcrB (blau) in der inneren Membran erkennt die Substanzen, die hinaus befördert werden sollen und überträgt die dazu notwendige Energie. Arzneimittel werden von der äußeren Doppellipid-Schicht der inneren Membran gefangen genommen und mithilfe eines gekoppelten Austauschs von Protonen heraus gepresst. TolC (gelb) formt eine Pore in der äußeren Membran, die zu einem langen periplasmatischen Kanal erweitert ist. AcrA (rot) vermittelt den Kontakt zwischen AcrB und TolC.



einem Antibiotikum: Protonen Antiporter in der inneren Membran (genannt „Acriflavine resistance protein B“ oder AcrB), einem Kanal in der äusseren Membran („Tolerance colicin E1“ oder TolC), sowie einem Membranfusionsprotein („Acriflavine resistance protein A“ bzw. AcrA)

KLAAS M. POS, INSTITUTE OF BIOCHEMISTRY

Membrane Transport Machineries: The Antibiotic Efflux Pump AcrA/AcrB/TolC

Bacteria have a plethora of mechanisms to protect themselves against noxious compounds like antibiotics. Many of them possess drug efflux pumps to extrude drugs out of the cell and keep the therapeutic concentration below the toxic threshold so the bacteria will survive. These drug efflux systems play key roles in many multi-resistant pathogens causing serious problems especially for those of us which are immunocompromised (through e.g. chemotherapy or HIV-infection).

The research group “Membrane Transport Machineries” at the Institute of Biochemistry focuses on the structural elucidation of these pumps, in order to obtain molecular information on their transport mechanisms (Pos, 2009). These consolidated findings might be useful for the development of antibiotic efflux inhibiting compounds.

THE ACRB PUMP

The AcrA/AcrB/TolC antibiotic efflux pump from *Escherichia coli* is a tripartite system which spans not only the inner membrane, but also the periplasm and outer membrane of this Gram-negative bacterium (Figure 1).

Figure 1: Schematic Drawing of the AcrAB-TolC antibiotic efflux pump of *Escherichia coli*. The inner membrane component AcrB (blue) is both the substrate specificity determinant and the energy module of the AcrA/AcrB/TolC efflux system. Drugs are transported from the outer leaflet of the inner membrane via a coupled drug/proton antiport mechanism. TolC (yellow) forms a channel in the outer membrane. AcrA (red) is an adaptor connecting AcrB and TolC.

This three component system is comprised of an inner membrane located substrate/proton antiporter, designated “Acriflavine resistance protein B” (AcrB), a channel located in the outer membrane “Tolerance



im Raum zwischen den beiden Membranen (Periplasma). Jede Komponente ist unerlässlich für die Funktion des Systems. Bei Fehlfunktion eines der drei Proteine ist die natürliche Widerstandsfähigkeit des Bakteriums gegenüber Antibiotika, Gallensalzen, Detergenzien und Farbstoffen drastisch reduziert.

AcrB spielt die zentrale Rolle hinsichtlich Substratspezifität und Energisierung des Transportprozesses. Es gehört zur Superfamilie der „Resistance-Modulation-cell Division“ (RND) Transporter, zu der auch das menschliche „Niemann-Pick C1 disease Protein“ (NPC1) und Hedgehog Rezeptor Patched (Ptc) gehören.

Es ist uns in Kooperation mit der Gruppe von Prof. Diederichs aus Konstanz gelungen, eine neue, hochauflösende Struktur des Transporters in einer asymmetrischen Konformation aufzuklären (Seeger et al., 2006). Aufgrund der Asymmetrie konnte ein völlig neuer Transportmechanismus postuliert werden, bei dem das Substrat durch die einzelnen Monomere gleitet. Im mittels Kristallographie erarbeiteten Bauplan dieses Membranproteins sind in den Monomeren Tunnel zu erkennen, die verschiedene Engstellen aufweisen (Bild 2). Für den Transport von Antibiotika über die bakterielle Membran durch AcrB wird ein Mechanismus ähnlich wie bei einer peristaltischen (Quetsch-) Pumpe postuliert.

Bild 2: In AcrB wurde ein völlig neuer Transportmechanismus postuliert, bei dem Arzneistoffe ähnlich der Nahrung in der Speiseröhre oder im Darm durch die Erzeugung von Engstellen in den verschiedenen Tunneln (grün) aus der Pumpe hinausgequetscht werden. Die Grafik zeigt die Pumpe in drei verschiedenen Zuständen, die zeigen sollen, wie die Kanäle in den einzelnen Monomeren sich zyklisch im Dreiertakt öffnen und wieder zusammen ziehen (Zustände der Monomere, blau: loose, gelb: tight; rot: open). Der Zyklus führt über blau zu gelb nach rot (loose, tight, open) wieder zu blau (loose).

Gemäß der aktuellen Hypothese wird der Transport von Substrate durch funktionelle Rotation bewerkstelligt: analog zur funktionellen Rotation der katalytischen Untereinheit der F_1F_0 -ATPase nimmt jeder der drei Monomere in einer abgestimmten Art und Weise nacheinander die Zustände „loose“, „tight“ und „open“ an (Seeger et al., 2008). Es wird angenommen, dass in AcrB die protonenmotorischen Kraft durch Protonierung und Deprotonierung von titrierbaren Aminosäureresten in der Transmembrandomäne umgewandelt wird zu den beobachteten grossen konformationellen Änderungen in der periplasmatischen Domäne welche zu Substrat-Transport führen (Pos, 2009).

Colicin E1“ (TolC), as well as an adapter protein located in the periplasm called “Acriflavine resistance protein A” (AcrA). Dysfunction of any of the components leads to a drastic reduction of the natural resistance of the bacterium towards antibiotics, bile salts, detergents and dyes.

AcrB plays a central role for both substrate specificity and energy transduction. It is a member of the Resistance Modulation and cell Division (RND) Superfamily, which includes the human Niemann-Pick C1 (NPC1) and Hedgehog Receptor Patched (Ptc).

We were able in a collaborative effort with Prof. Kay Diederichs (Konstanz) to elucidate a high resolution structure of AcrB in an asymmetric conformation (Seeger et al., 2006).

Based on the asymmetry, a new transport mechanism could be postulated for the transport of drugs through the single monomers. The new structure reveals tunnels inside the monomers which contain gorge portions (Figure 2). A model for the transport of antibiotics mediated by AcrB over the bacterial membrane reminiscent to the mechanism of a peristaltic pump is postulated.

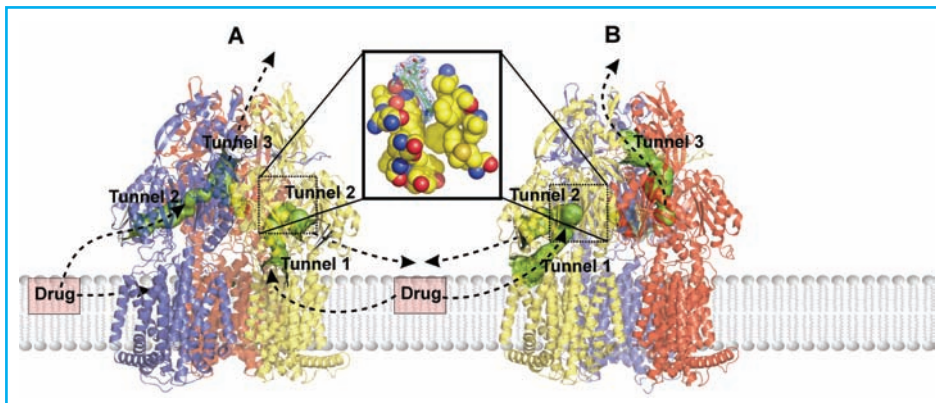


Figure 2: Visualization of tunnels in the porter (pore) domain of the trimeric AcrB peristaltic drug efflux pump. The AcrB monomers are presented in (a) blue (loose), (b) yellow (tight) and (c) red (open). The tunnels are highlighted as green surfaces in a ribbon model of the AcrB trimer. Inset: Bound minocyclin is depicted inside a hydrophobic pocket in the tight monomer (yellow) with the observed electron density in a 2Fo-Fc electron density map contoured 1 σ . The Panels on the left and right represent in each case a one third conversion of a full loose→tight→open→loose cycle.

Since AcrB is driven by the proton motive force, the energy conversion to drive the large conformational changes observed in the periplasmic domain is considered to be generated by protonation and deprotonation of essential charged residues residing in the transmembrane domain (Seeger et al., 2008). Our research is now focused on the putative pathway for protons through the transmembrane domain and its coupling to the events during functional rotation leading to drug export.

LITERATUR / REFERENCES

Pos, K. M. (2009) Drug transport mechanism of the AcrB efflux pump. *Biochem. Biophys. Acta.* 1794: 782-793.

Seeger, M. A., von Ballmoos, C., Eicher, T., Brandstätter, L., Verrey, F., Diederichs, K. and Pos, K. M. (2008) Engineered disulfide bonds support the functional rotation mechanism of multidrug efflux pump AcrB. *Nature Struc. Mol. Biol.* 15: 199-205.

Seeger, M. A., Schiefner, A., Eicher, T., Verrey, F., Diederichs, K. and Pos, K. M. (2006) Asymmetric structure of trimeric AcrB suggests a peristaltic drug pumping mechanism. *Science* 313: 1295-1298.

KONTAKT / CONTACT:

Prof. Dr. Klaas M. Pos

Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie
Institut für Biochemie
Max-von-Laue-Str. 9
D-60438 Frankfurt am Main

Tel: ++49 (0)69 798 29251
Fax: ++49 (0)69 798 29201
E-Mail: pos@em.uni-frankfurt.de
<http://www.biochem.uni-frankfurt.de/> ; www.cef-mc.de

Werte schaffen durch Innovation

**Wir wachsen mit besseren Therapien.**

Ziel von Boehringer Ingelheim ist es, dem Menschen mit der Entwicklung neuer Therapien zu helfen. Damit hat sich das Familienunternehmen stärker als der Pharmamarkt entwickeln können und die Grundlagen gelegt, dass auch die Aussichten in den kommenden Jahren viel versprechend sind. In die Erforschung und Entwicklung neuer Medikamente mit therapeutischen Vorteilen – und damit in die Zukunft – investierte Boehringer Ingelheim alleine im vergangenen Jahr rund 2,1 Milliarden Euro.

Für die Gesundheit arbeiten weltweit 41.300 Mitarbeiter, davon rund 11.380 in Deutschland.

www.boehringer-ingelheim.de

