

# Glycosyltransferasen der frühen Lipopolysaccharid-Biosynthese

Ein Angriffspunkt für neue Antibiotika?

Sabine Löbau, Werner Brabetz, Lore Brade und Helmut Brade, Borstel\*

Lipopolysaccharide (LPS) sind charakteristische Bestandteile der äußeren Membran gramnegativer Bakterien und stellen wichtige Pathogenitätsfaktoren dar. LPS oder Endotoxin ist ein potenter Mediator endzündlicher Reaktionen und unter anderem maßgeblich an der Entwicklung des septischen Schocks beteiligt. Die Inhibition der LPS-Biosynthese bewirkt neben einer verringerten Viabilität der Bakterien auch eine reduzierte Freisetzung von LPS und stellt somit ein interessantes Ziel zur Entwicklung neuartiger Antibiotika dar. Der zentrale und hochkonservierte Anteil des LPS setzt sich aus den Zuckerkomponenten 3-Desoxy-D-manno-Oct-2-ulosonsäure (Kdo) und L-Glycero-D-manno-Heptose zusammen. Die Übertragung dieser beiden Zucker auf den Lipidanteil des LPS wird in unserer Gruppe *in vitro* und *in vivo* untersucht, wobei die Aufklärung des Reaktionsmechanismus dieser Glycosyltransferasen im Vordergrund steht. Die daraus resultierenden Erkenntnisse sollen anschließend zur Entwicklung von Hemmstoffen dieser Übertragungsreaktion angewendet werden.

**Schlüsselwörter:** Lipopolysaccharid, Glycosyltransferasen, Antibiotika

Glycosyltransferases of lipopolysaccharide biosynthesis

*Lipopolysaccharides (LPS) are characteristic compounds of the outer membrane of gram-negative bacteria and important factors of pathogenicity. LPS or endotoxin is a potent inducer of inflammatory reactions and as such strongly involved in development of syndromes like septic shock. Inhibition of LPS-biosynthesis does not only lead to reduced viability of the bacteria but also to reduced release of LPS, thus representing an interesting target for new antibiotics. The central and most conserved part of LPS consists of 3-deoxy-D-manno-oct-2-ulosonic acid (Kdo) and L-glycero-D-manno-heptose. In our group the transfer of these sugars onto the lipid part of LPS is under investigation in „in vitro“ and „in vivo“ systems. Our main interest is the elucidation of the reaction mechanism of these glycosyltransferases and furthermore the development of inhibitors for the catalysed reactions.*

**Keywords:** Lipopolysaccharide, glycosyltransferases, antibiotics

Eine Vielzahl von Infektionen ist nach wie vor auf gramnegative Bakterien zurückzuführen, deren Bekämpfung mit einer Reihe von Antibiotika durchgeführt wird. Trotz dieser Hilfsmittel, einhergehend mit stark verbesserten hygienischen Bedingungen, sind die absoluten Zahlen der Sterblichkeit bei schweren gramnegativen Infektionen über die letzten Jahrzehnte beinahe konstant geblieben. So sind es überwiegend nosokomiale Infektionen, die vor allem bei immunsupprimierten Patienten zu schweren Krankheitsverläufen wie Sepsis oder gar septischem Schock führen können. Damit bleibt die gramnegative Sepsis ungeachtet vereinter Anstrengungen zu ihrer

Bekämpfung eine gefürchtete und lebensbedrohliche Komplikation, vor allem auf Intensivstationen. Nach wie vor fallen jährlich etwa 100 000 Patienten allein in den USA diesem Syndrom zum Opfer [1]. Das Molekül, das diese heftige Reaktion im Organismus auslöst, ist das *Endotoxin* oder, genauer gesagt, die *Lipoid-A-Komponente* des *Lipopolysaccharids* (LPS) aus der Membran gramnegativer Bakterien [2]. Bei jeder Zellteilung wird ein wenig LPS freigesetzt, größere Mengen gelangen jedoch bei der Autolyse nach dem Tod der Bakterien in den Körper. Unglücklicherweise resultieren viele Antibiotika in der *Autolyse* der Bakterienzelle, wodurch zwar

die Lebendkeimzahl drastisch reduziert wird, die Endotoxin-Ausschüttung aber zu einer Verstärkung der Symptome der Sepsis führt [3]. Ein Ziel muss es demnach sein, solche Antibiotika zu entwickeln, die wenig oder kein Endotoxin freisetzen.

Darüber hinaus zeichnen sich viele Pathogene mittlerweile durch eine *Multi-resistenz* gegen die meisten gängigen Antibiotika aus, weshalb die Suche nach alternativen Zielen für einen Angriff von Antibiotika von großer Dringlichkeit ist. Das LPS bildet den Hauptbestandteil der äußeren Hülle der äußeren Membran, wo es aufgrund seiner physikochemischen Eigenschaften eine wichtige Funktion als Permeationsbarriere übernimmt. Es kann untergliedert werden in einen hydrophoben Anteil und eine hydrophile Kohlenhydratkomponente. Der hydrophobe Lipidanker dieses Moleküls, auch *Lipoid A* genannt, besteht bei *E. coli* aus einem hexaacylierten Glucosaminodisaccharid, das in Position 1 und 4 eine Phosphatgruppe trägt. Der hydrophile Kohlenhydratanteil lässt sich in die Kernregion und das O-Antigen unterteilen, wobei die Kernregion den strukturell konservierten Teil und das polymere O-Antigen einen hochvariablen Teil darstellt (Abb. 1). *E. coli* oder *Salmonella*-Wildtyp verfügt über ein S-Form-LPS, welches sowohl eine Kernregion als auch ein O-Antigen aufweist. Darüber hinaus gibt es jedoch eine Anzahl von LPS-Mutanten, bei denen bestimmte Gene der LPS-Biosynthese defekt sind, was in einem verkürzten LPS resultiert. Diese Mutanten werden als *Raumutanten* mit den Abkürzungen Ra bis Re bezeichnet (Abb. 1). Die Minimalstruktur, die für das Überleben

**Für die Verfasser:**

Dr. Sabine Löbau, Forschungszentrum Borstel, Med. und biochem. Mikrobiologie, Parkallee 22, 23845 Borstel

\*Vortrag bei der Festveranstaltung der Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e. V. zur 90-jährigen Wiederkehr der Nobel-Preisverleihung an Paul Ehrlich, Frankfurt, 24. Oktober 1998.

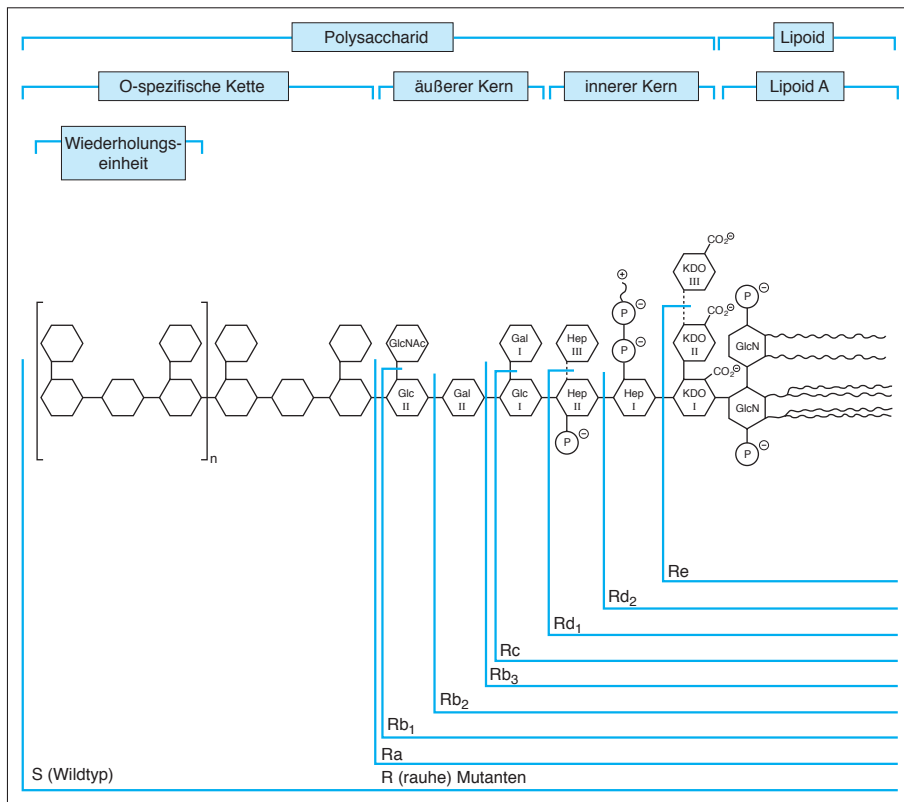


Abb. 1. Schematische Darstellung der Struktur von Salmonella-Wildtyp und Raumutanten-Lipopolysacchariden. Die Bezeichnungen Ra bis Re beziehen sich auf die Struktur des LPS aus Mutanten. Die Bereiche O-Antigen, Kernregion und Lipoid A sind ebenso gezeigt wie die polymere Struktur der O-Kette. Zuckerreste sind durch Hexagone dargestellt, punktierte Linien bedeuten nicht-stöchiometrische Substitutionen. GlcN = Glucosamin; Kdo = 3-Desoxy-D-manno-Oct-2-ulonsäure; Hep = L-Glycero-D-manno-Heptose; Glc = Glucose; Gal = Galactose; GlcNAc = N-Acetylglucosamin; P = Phosphat.

von *E. coli* essentiell ist, besteht aus einem pentaacylierten Lipoid A und der innersten Kernregion, also zwei Molekülen 3-Desoxy-D-manno-Oct-2-ulonsäure (Kdo), als Zuckerkomponente. Diese tief-raue Form wird als Re-LPS bezeichnet. Re-Mutanten sind in vivo nicht überlebensfähig; sie sind serumsensitiv und werden schnell von Phagozyten beseitigt.

Wie Mutationen in den Genen der zur LPS-Biosynthese notwendigen Enzyme erwiesen haben, handelt es sich beim LPS um ein Molekül, das für die Vitalität gramnegativer Bakterien essentiell ist. Aus diesem Grund stellt die LPS-Biosynthese ein hervorragendes Ziel für eine Antibiotika-Therapie dar. So konnte vor einigen Jahren für einen Inhibitor der CMP-Kdo-Synthase zumindest in vitro eine bakteriostatische Wirkung gezeigt werden [4].

Darüber hinaus gibt es weitere viel versprechende Ansätze zur Bekämpfung der gramnegativen Infektion auf der Basis des Lipopolysaccharids. Die Aufklärung der Lipoid-A-Biosynthese hat

gleich mehrere Ziele ins Blickfeld gerückt, wie die Proteine LpxA oder LpxC. LpxA, eine O-Acyltransferase, die den ersten Schritt der Synthese katalysiert, wurde kristallisiert und die Daten dürften sehr hilfreich für die Konstruktion von geeigneten Inhibitoren sein [5]. LpxC katalysiert die Deacetylierung eines Zwischenproduktes von Lipoid A und damit den ersten irreversiblen Schritt der Biosynthese. Für dieses Enzym konnten bereits sehr wirksame Inhibitoren entwickelt werden, wie zum Beispiel die Komponente L-161,240. Gaben dieses Inhibitors ließen Mäuse bei einer Infektion mit *E. coli* überleben, die ohne Schutz tödlich verlaufen wäre [6].

Viele Untersuchungen sind durchgeführt worden, um die molekularen Parameter zu ermitteln, die für die Toxizität des LPS verantwortlich sind. Dabei konnte gezeigt werden, dass ein hydrophiles Disaccharid mit zwei negativen Ladungen und einer asymmetrischen Verteilung von Fettsäuren, so wie es im Lipoid A von Salmonella oder *E. coli* vorliegt, die höchste endotoxische Akti-

vität aufweist [7]. Eine Zielzelle des Endotoxins ist der *Makrophage*, der mit der Ausschüttung von Entzündungsmediatoren auf Stimulierung mit LPS reagiert. Die Bindung von LPS an den Makrophagen erfolgt dabei sowohl über lösliche als auch über membrangebundene Rezeptoren wie LBP und mCD14 [8]. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass Partialstrukturen von Lipoid A ebenfalls an diese Rezeptoren binden, aber nicht in der Lage sind, die Ausschüttung von Zytokinen zu induzieren [9].

Diese *Lipoid-A-Antagonisten* (wie z. B. Komponente 406) stellen eine weitere Zielgruppe für die Entwicklung neuer antiendotoxischer Wirkstoffe dar. Als Leitstrukturen dienen dabei Lipoid-A-Moleküle, von denen bekannt ist, dass sie über ein geringes endotoxisches Potential verfügen. Ein Beispiel hierfür ist die Substanz E5531, die ein Analogon zum Lipoid A von *Rhodobacter capsulatus* darstellt. In Kombination mit einer Antibiotika-Therapie konnten mit diesem Wirkstoff im Tiermodell beeindruckende Ergebnisse im Schutz vor letaler Infektion gezeigt werden [10].

Der dritte Ansatz macht sich *Antikörper* zunutze, die mit den konservierten Kernregionen des LPS von verschiedenen gramnegativen Pathogenen kreuzreagieren. WN1 222-5 ist ein solcher Antikörper, der gegen eine Mischung von LPS-Typen von *E. coli* generiert wurde und sowohl R- als auch S-Form-LPS von *E. coli*, *Salmonella enterica* und *Shigella* erkennt [11]. Der Vorteil eines Antikörpers als Therapeutikum liegt darin, dass er über seinen Fc-Anteil von Phagozyten erkannt wird, so dass das Endotoxin aus den Bakterien nicht lytisch freigesetzt, sondern durch Phagozytose aus der Zirkulation entfernt wird. Die Wirksamkeit der humanisierten Chimäre dieses Mausantikörpers konnte erfolgreich in verschiedenen Testsystemen gezeigt werden [12].

Unsere Gruppe beschäftigt sich seit vielen Jahren mit der Struktur-Wirkungs-Beziehung des Lipopolysaccharids gramnegativer Bakterien [2, 13]. Unser besonderes Interesse galt dem LPS von Chlamydien, welches ein gattungsspezifisches Epitop darstellt und als solches diagnostische Bedeutung besitzt (Abb. 2). Da diese Struktur zu den immunologisch dominanten Oberflächenantigenen gehört, konnten Antikörper generiert werden, die auch in der Diagnostik eingesetzt werden [14–16].

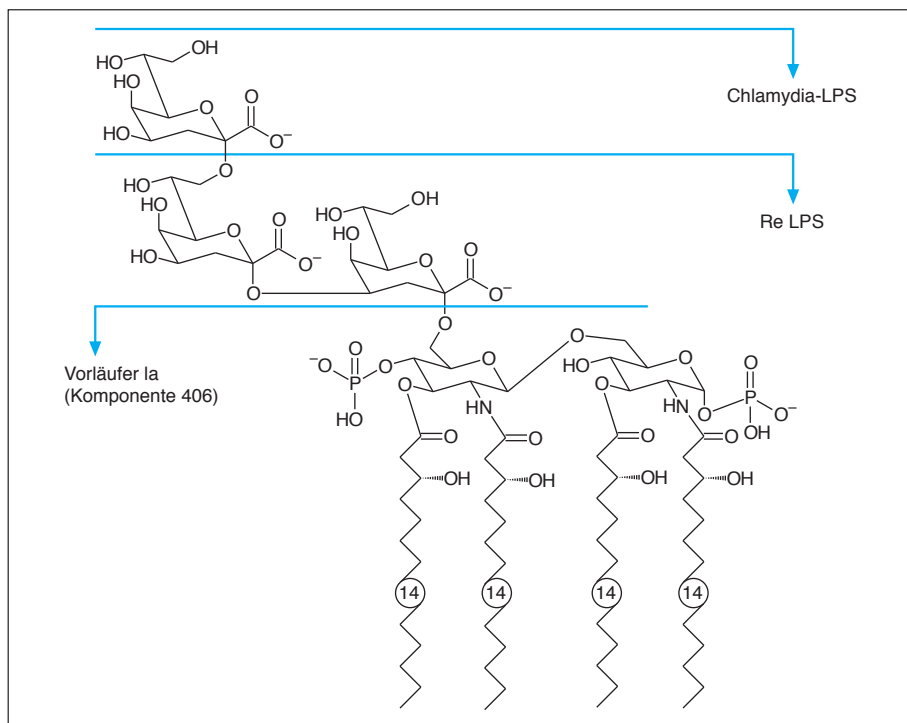


Abb. 2. Chemische Struktur des „in vitro“ synthetisierten, gattungsspezifischen LPS-Epitops von Chlamydia. Komponente 406, ein synthetischer, tetraacylierter, bisphosphorylierter Vorläufer des Lipoids A dient als Akzeptor für die Übertragung von bis zu drei Kdo-Resten durch die Kdo-Transferase aus Chlamydien. Die Struktur des gebildeten Zwischenproduktes entspricht dabei dem Re-LPS von *E. coli*.

Bei Chlamydien handelt es sich um intrazelluläre Parasiten, die aus Zellkulturen isoliert werden müssen. Aus diesem Grunde ist es sehr schwierig, ausreichende Mengen an LPS zu isolieren, um daran eine detaillierte Strukturanalyse durchzuführen. Die Klonierung einer Kdo-Transferase aus Chlamydien in eine Re-Mutante von *E. coli* erwies sich als hilfreich, da dieser rekombinante Klon die Expression des gattungsspezifischen Epitops der Chlamydien in einem *E. coli*-Stamm erlaubte. Das rekombinante LPS wurde isoliert und dessen Struktur analysiert [17]. Bei diesem LPS handelt es sich um ein Re-LPS, das aus einem Lipoid-A-Anteil und einer Kdo-Region besteht. Während der Lipoid-A-Anteil von *E. coli* stammt, besteht die Kdo-Region aus einem Trisaccharid der Sequenz  $\alpha\text{Kdo}(2-8)\alpha\text{Kdo}(2-4)\alpha\text{Kdo}$ . Dieses ist über eine (2-6)-Verknüpfung mit dem distalen Glucosamin von Lipoid A verbunden. Ein  $\alpha(2-4)$  verknüpftes Kdo-Disaccharid bildet die LPS-Kernregion der meisten gramnegativen Bakterien und ist ausschließlicher Bestandteil des LPS von *E. coli*-Re-Mutanten wie zum Beispiel F515 [18]. Durch die charakteristische  $\alpha(2-8)$ -Verknüpfung des zusätzlichen Kdo-Restes mit dem Kdo-Disaccharid

entsteht eine einzigartige Struktur, wie sie in keinem anderen LPS vorkommt. Dieses Kdo-Trisaccharid enthält das gattungsspezifische Epitop der Chlamydien.

Es stellte sich nunmehr die Frage, ob die klonierte Kdo-Transferase nur diesen zusätzlichen Kdo-Rest überträgt, oder ob sie in der Lage ist, das vollständige Kdo-Trisaccharid zu synthetisieren. Für diese Untersuchung wurde eine veränderte Form des In-vitro-Testsystems angewendet, wie es von Raetz et al. erstmals beschrieben wurde [19]. Ein synthetischer, tetraacylierter und monophosphorylierter Vorläufer von Lipoid A, Komponente 405, wurde mit Hilfe der 4'-Kinase aus *E. coli* selektiv in der Position 4' phosphoryliert. Die Verwendung von  $^{32}\text{P}$ -ATP ermöglichte hierbei die radioaktive Markierung des Lipidakzeptors. Zusätzlich zu diesem Akzeptor ist aktiviertes Kdo für die Übertragung erforderlich. Da CMP-Kdo instabil ist (Halbwertszeit etwa 30 Minuten), muss es für die Reaktion in situ hergestellt werden. Dies geschieht mit Hilfe der aus *E. coli* isolierten CMP-Kdo-Synthase, die aus CTP und Kdo CMP-Kdo generiert, welches dann in einer gekoppelten Reaktion von der Kdo-Transferase auf den Lipidakzeptor übertragen wird. Die Analyse der

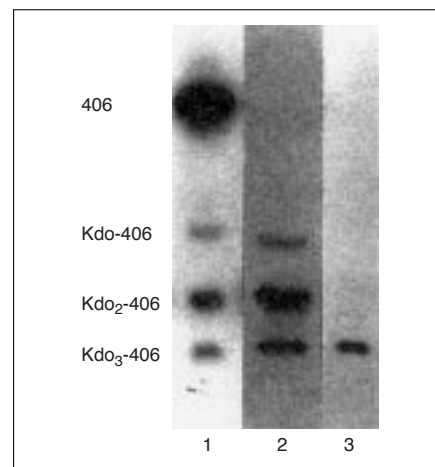


Abb. 3. In-vitro-Synthese des Chlamydia-spezifischen Epitops durch die Kdo-Transferase aus *C. pneumoniae* exprimiert in *C. glutamicum*. Die Produkte werden dünn-schichtchromatographisch aufgetrennt und mittels Autoradiographie (Spur 1) oder immunologisch (Spuren 2 und 3) nachgewiesen. Hierfür wurden in Spur 2 monoklonale Antikörper verwendet, die Kdo-Mono- bzw. (2-4)-verknüpfte Disaccharide erkennen, in Spur 3 wurde ein Antikörper eingesetzt, der das gattungsspezifische Kdo(2-8)Kdo(2-4)Kdo-Trisaccharid der Chlamydien erkennt.

Reaktionsprodukte erfolgt entweder autoradiographisch oder immunologisch nach Auftrennung in der Dünnschichtchromatographie [20]. Die Autoradiographie verbindet dabei den Vorteil sehr hoher Empfindlichkeit mit dem Nachteil der limitierten Aussage über gebildete Produkte. Beim immunologischen Nachweis können spezifische monoklonale Antikörper eingesetzt werden, die nicht nur hochselektiv mit ihren Antigenen reagieren, sondern auch eine sehr hohe Empfindlichkeit aufweisen. Die von uns verwendeten Antikörper erkennen Kdo-Monosaccharid,  $\alpha\text{Kdo}(2-4)\alpha\text{Kdo}$ -Disaccharid oder  $\alpha\text{Kdo}(2-8)\alpha\text{Kdo}(2-4)\alpha\text{Kdo}$ -Trisaccharid als Epitop [21, 22]. Mit Hilfe dieser Antikörper war es möglich nachzuweisen, dass die Kdo-Transferase von Chlamydien (sowohl *C. trachomatis* als auch *C. psittaci* 6BC und *C. pneumoniae* TW-183) nacheinander drei Kdo-Reste auf den Lipidakzeptor 406 überträgt, wobei die ersten beiden Kdo in der klassischen  $\alpha(2-4)$ -Verknüpfung vorliegen und das dritte Kdo über die Chlamydien-spezifische  $\alpha(2-8)$ -Verknüpfung mit dem Disaccharid verbunden ist (Abb. 3). Durch diesen Versuch konnte zweifelsfrei nachgewiesen werden, dass es sich bei der Kdo-Transferase aus Chlamydien um ein trifunktionelles Enzym handelt

[20]. Dies ist insofern bemerkenswert, als das Dogma der Glykobiologie „ein Enzym – eine glykosidische Bindung“ für die Kdo-Transferasen nicht gilt.

Im Lipopolysaccharid der Enterobacteriaceae folgt in der inneren Kernregion auf das Kdo-Disaccharid die Heptose-region (Abb. 1). Diese besteht häufig aus einem verzweigten Heptosetrisaccharid der Sequenz  $\alpha(1-7)\alpha(1-3)$  und ist in einer  $\alpha(1-5)$ -Bindung mit dem innersten Kdo verbunden. Die äußere Kernregion sitzt an Position 3 der zweiten Heptose [23]. Im Gegensatz zu den Kdo-Transferasen handelt es sich bei den Heptosyltransferasen um monofunktionelle Enzyme, die jeweils nur eine einzige Heptose übertragen können. Alle drei Enzyme weisen Homologien auf DNS- und Proteinebene auf, ein Aspekt, der für die Entwicklung von Inhibitoren dieser Enzyme wichtig sein könnte. Um die Enzyme näher zu charakterisieren, wurden die Heptosyltransferasen aus *E. coli* kloniert und in *Corynebacterium glutamicum* exprimiert. Auf diese Weise gewonnene Rohextrakte wurden ebenfalls in dem oben beschriebenen In-vitro-Transfer getestet. In diesem Fall dient das vollständig acylierte Re-LPS von *E. coli* als Lipidakzeptor, die L-Glycero-D-manno-Heptose muss als ADP-Zucker angeboten werden. Bisher war es unmöglich, ADP-Heptose als reinen Zucker zu isolieren oder auch zu synthetisieren. Aus diesem Grunde muss dem Testansatz ein Rohextrakt aus *E. coli* zugesetzt werden, der keine Heptosyltransferasen enthält und als ADP-Heptosequelle dient. Die gebildeten Reaktionsprodukte lassen sich

ebenfalls dünnenschichtchromatographisch auftrennen und immunologisch nachweisen. Darüber hinaus werden diese Produkte isoliert und einer mikroanalytischen Strukturanalyse unterworfen, so dass eine eindeutige chemische Zuordnung möglich ist.

Bislang werden die Untersuchungen der Glycosyltransferasen mit Rohextrakten aus *C. glutamicum*, in dem die entsprechenden Enzyme plasmidal kodiert vorliegen, durchgeführt. Im Hinblick auf die Komplexität des Testsystems stellt die Aufreinigung der Transferasen den notwendigen nächsten Schritt dar. Des weiteren sind kinetische Messungen der reinen Enzyme vorgesehen sowie deren Charakterisierung unter Verwendung von fluoreszenzspektroskopischen Methoden. Die auf diese Weise gewonnenen Erkenntnisse zum Ablauf und Mechanismus der katalysierten Reaktion sollten sich hilfreich für die Konstruktion von möglichen inhibitorischen Strukturen erweisen.

Die Untersuchung der Glycosyltransferasen der frühen LPS-Biosynthese kann uns wertvolle Erkenntnisse über einen weiteren empfindlichen Punkt bakterieller Pathogene liefern. In Zusammenhang mit den Erfahrungen und Fortschritten bei der Entwicklung von Inhibitoren und später auch Antibiotika sollte es möglich sein, einen weiteren Schritt zur Bekämpfung gramnegativer Infektionen zu machen.

Das Projekt der Heptosyltransferasen wird finanziell vom BMBF (Verbundprojekt „Neue Targets für die Antibiotikatherapie“) unterstützt.

## Literatur

1. Nogare D. Clin Microbiol Rev 1991;6:57-68.
2. Rietschel ET, Kirikae T, Schade FU, Mamat U, et al. FASEB J 1994;218:217-25.
3. Kirikae T, Nakano M, Morrison DC. Microbiol Immunol 1997;41:285-94.
4. Goldmann RC, Kohlbrenner W, Lartey P, Pernet A. Nature 1987;329:162-4.
5. Raetz CRH, Roderick SL. Science 1995;270:997-1000.
6. Onishi HR, Pelak BA, Gerckens LS, Silver LL, et al. Science 1996;274:980-2.
7. Loppnow H, Brade H, Dürbaum I, Dinarello CA, et al. J Immunol 1989;142:3229-38.
8. Tobias PS, Ulevitch RJ. Immunobiology 1993;187:227-32.
9. Flad HD, Loppnow H, Rietschel ET, Ulmer AJ. Immunobiology 1993;187:303-16.
10. Christ WJ, et al. Science 1995;268:80-3.
11. Di Padova FE, Brade H, Barclay R, Poxton IR, et al. Infect Immun 1993;61:3863-72.
12. Di Padova FE, Mikol V, Barclay GR, Poxton IR, et al. Prog Clin Biol Res 1994;388:85-94.
13. Holst O, Brade H. In: Morrison DC, Ryan JL, editors. Molecular biochemistry and cellular biology, Boca Raton: CRC Press, 1992;135-70.
14. Nurminen M, Leinonen M, Saikku P, Mäkelä PH. Science 1983;220:1279-81.
15. Nano FE, Caldwell HD. Science 1985;228:742-4.
16. Brade H, Brade L, Nano FE. Proc Natl Acad Sci USA 1987;84:2508-12.
17. Holst O, Broer W, Thomas-Oates JE, Mamat U, et al. Eur J Biochem 1993;214:703-10.
18. Zähringer U, Lindner B, Seydel U, Rietschel ET, et al. Tetrahedron Lett 1985;26:6321-4.
19. Brozek KA, Hosaka K, Robertson AD, Raetz CRH. J Biol Chem 1989;264:6956-66.
20. Löbau S, Mamat U, Brabetz W, Brade H. Mol Microbiol 1995;18:391-9.
21. Rozalski A, Brade L, Kosma P, Appelmelk BJ, et al. Infect Immun 1989;57:2645-52.
22. Fu Y, Baumann M, Kosma P, Brade L, et al. Infect Immun 1992;60:1314-21.
23. Holst O. Review. Im Druck.