

## Molekulare Wirkungsweise des Antibioticums Rifampicin

Von Guido R. Hartmann\*, Peter Heinrich, Margit C. Kollenda,  
Bernhard Skrobranek, Maximilian Tropschug und Wolfgang Weiß

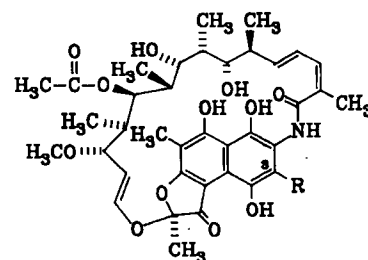
*Professor Wolfram Zillig zum 60. Geburtstag gewidmet*

Das lipophile Antibioticum Rifampicin wird erfolgreich gegen Tuberkulose eingesetzt. Auf molekularer Ebene stört es den Stoffwechsel von Eubakterien durch die Blockierung der RNA-Synthese. Dieser Effekt ist die Folge der starken Bindung des Arzneimittels an eine einzige und hochspezifische Bindungsstelle auf der DNA-abhängigen RNA-Polymerase. Die Katalyse des Kettenstarts der RNA-Synthese und die der Kettenverlängerung werden durch das Enzym-gebundene Arzneimittel stark gehemmt. Diesen Befund kann man durch den Einfluß des Enzym-gebundenen Rifampicins auf die Bindungsstellen für die Reaktionsprodukte Diphosphat und RNA erklären. Um seinen Angriffspunkt zu erreichen, muß das Antibioticum in das Cytoplasma der Bakterien eindringen. Es wurden Mutanten entdeckt, die resistent gegen Rifampicin sind, weil sie es nur in Spuren aus dem Medium aufnehmen können. Das Gen, das diesen Effekt bewirkt, wurde kloniert. Es verleiht Bakterienzellen mit hochempfindlicher RNA-Polymerase eine bemerkenswerte Resistenz gegen das Antibioticum.

### 1. Einleitung

Rifampicin, ein Antibioticum mit breitem antibakteriellem Spektrum, hat sich als besonders wirkungsvoll zur Behandlung der Tuberkulose erwiesen. Chemisch gesehen gehört es als halbsynthetische Verbindung zur Klasse der Rifamycine, welche vom Bakterium *Nocardia mediterranei* produziert werden. Der Produzentstamm wurde in einer Bodenprobe entdeckt, die *Hermes Pagani*, ein Laborant der pharmazeutischen Firma Lepetit in Mailand, während seines Urlaubs in einem Botanischen Garten für Nadelbäume nahe dem Küstenbad Saint Raphael in Südfrankreich gesammelt hatte. Das Antibioticum wurde nach „Rififi“, einem damals sehr bekannten Kriminalfilm, benannt<sup>[1,2]</sup>. *Sensi, Oppolzer und Prelog* klärten die chemische

Struktur der Rifamycine auf<sup>[2,3]</sup> und zeigten, daß sie natürlich vorkommende Ansaverbindungen sind<sup>[4]</sup>. Es wurden zahlreiche Derivate der Muttersubstanz Rifamycin SV semisynthetisch hergestellt<sup>[5]</sup>. Die meisten von ihnen sind nur nach parenteraler Anwendung wirksam. Das Derivat Rifampicin, auch unter den Handelsnamen Rifa, Rifampin



R =  $\text{CH-N-N-CH}_3$  : Rifampicin

R = H : Rifamycin SV

[\*] Prof. Dr. G. R. Hartmann, Dipl.-Biol. P. Heinrich,  
Dipl.-Chem. M. C. Kollenda, Dipl.-Chem. B. Skrobranek,  
Dr. M. Tropschug, Dipl.-Chem. W. Weiß  
Institut für Biochemie der Universität  
Karlstraße 23, D-8000 München 2

und Rimactan bekannt, ist bei oraler Einnahme voll wirksam und ist daher die kommerziell erfolgreichste Form der Rifamycine. Das Arzneimittel ist deshalb so gut verträglich, weil es den Stoffwechsel menschlicher Zellen bei antibiotisch wirksamen Konzentrationen nicht beeinträchtigt, während es den Stoffwechsel von Eubakterien wie *Mycobacterium tuberculosis*, dem Erreger der Tuberkulose, drastisch stört<sup>[6]</sup>.

## 2. RNA-Polymerase als Angriffspunkt

Unter den Stoffwechselvorgängen in Bakterien wird die RNA-Synthese am stärksten und schon bei sehr geringen Konzentrationen an Rifampicin (0.5 µg/mL in der Zellkultur) gehemmt<sup>[7]</sup>. Als Folge dieser Hemmung kommt die Proteinsynthese zum Erliegen, das heißt, die Bakterienvermehrung hört auf<sup>[8]</sup>. Der Stop der RNA-Synthese wird durch die Hemmung desjenigen Enzyms verursacht, das die DNA-gesteuerte RNA-Synthese katalysiert<sup>[9]</sup>. Das Enzym wird als DNA-abhängige RNA-Polymerase (EC 2.7.7.6) bezeichnet. Nur das eubakterielle Enzym, aber nicht die entsprechende RNA-Polymerase aus eukaryotischen Zellen, enthält eine einzige und spezifische Bindungsstelle für das Antibioticum. Diese bindet Rifampicin selbst bei der niedrigen Konzentration von 8 µg/L<sup>[4]</sup>. Diese Beobachtungen erklären die hervorragende Verträglichkeit des Arzneimittels bei niedrigen Konzentrationen für menschliche Zellen. Erst bei tausendfach höheren Konzentrationen bindet das Arzneimittel als stark hydrophobe Verbindung auch an viele andere Proteine und ruft dadurch Nebenwirkungen hervor<sup>[4, 10–12]</sup>. Daher muß man, wenn man die Primärwirkung von Rifampicin untersuchen will, höhere Konzentrationen auf jeden Fall vermeiden.

Da die DNA-abhängige RNA-Polymerase noch nicht kristallisiert werden konnte, war eine Röntgen-Strukturanalyse des Antibioticum-Enzym-Komplexes noch nicht möglich. Daher wissen wir nicht, welcher Teil des Moleküls direkt an der Bindung beteiligt ist. Außer dem Rest in Position 3 des Naphthohydrochinonsystems kann man nicht viel an der Struktur des Arzneimittels verändern, ohne die feste Bindung an das eubakterielle Enzym zu verlieren<sup>[4]</sup>. Der Komplex aus Enzym und Rifampicin dissoziiert sofort, wenn man Verbindungen wie Guanidiniumchlorid, welche die dreidimensionale Struktur von Proteinen entfalten, in vitro zusetzt<sup>[13]</sup>. Offensichtlich bindet das Arzneimittel nicht kovalent an das Protein.

Bakterienstämme, welche durch eine Mutation resistent gegen Rifampicin sind, kennt man seit langem<sup>[14]</sup>. Es wurden zwei Klassen von Mutanten charakterisiert. In einer Klasse liegen alle Mutationen im Bakteriengen, das für die Untereinheit  $\beta$  der RNA-Polymerase codiert<sup>[15, 16]</sup>. Dieser Befund ist ein unabhängiger Hinweis auf die RNA-Polymerase als unmittelbaren Angriffsort des Rifampicins. Andernfalls würden diese Mutationen nicht zu einem Verlust der festen Bindung des Antibioticums an das Enzym führen und damit zugleich zu einem Verlust der Rifampicin-Empfindlichkeit der Bakterienzellen<sup>[4]</sup>.

Die DNA-abhängige RNA-Polymerase aus Eubakterien ist ein großes Protein mit einer relativen Molmasse von etwa 0.5 Millionen. Das Enzym aus dem Darmbakterium *Escherichia coli* ist am genauesten untersucht. Es besteht

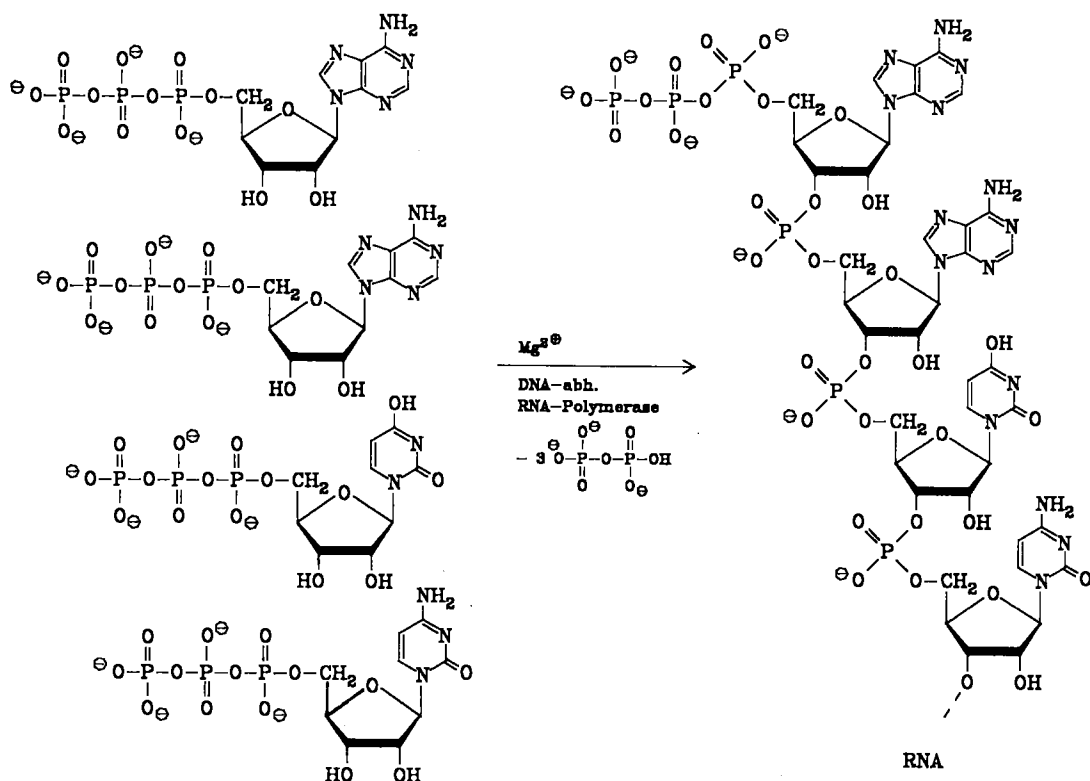
aus vier verschiedenen Polypeptidketten mit bekannter Aminosäuresequenz, welche einen stabilen Komplex mit der stöchiometrischen Zusammensetzung  $\alpha_2\beta\beta'\sigma$  bilden. Die meisten Mutationen der Klasse I, die zur Rifampicin-Resistenz führen, liegen im gleichen Bereich eines Gens. Dieser Bereich codiert für eine Sequenz von etwa 50 Aminosäuren<sup>[17, 18]</sup>, die sich nahe der Mitte der Polypeptidkette  $\beta$  mit einer Länge von 1342 Aminosäuren befindet<sup>[19]</sup>. Es liegt nahe zu vermuten, daß dieser Bereich der Untereinheit  $\beta$  einen wesentlichen Teil der Rifampicin-Bindungsstelle bildet. Diese Annahme wird durch Beobachtungen aus unserem Laboratorium gestützt, die zeigen, daß genau dieser Bereich der Untereinheit  $\beta$  durch gebundenes Rifampicin gegen Hydrolyse mit Proteasen geschützt wird<sup>[20]</sup>.

## 3. Hemmung der RNA-Synthese

*E.-coli*-RNA-Polymerase katalysiert die stufenweise chemische Kondensation von Ribonucleosidtriphosphaten zu RNA entlang einer DNA-Matrize. Gleichzeitig mit der Synthese jeder Phosphodiesterbindung wird ein Molekül Diphosphat freigesetzt (Schema 1). Die Basensequenz in der synthetisierten RNA ist komplementär zum abgelesenen Strang der DNA-Matrize, wie es die Basenpaarungsregel verlangt. Eine sorgfältige Analyse der einzelnen Reaktionsschritte hat gezeigt, daß die Substrate sich an den Enzym-DNA-Komplex in geordneter Reihenfolge anlagern<sup>[21, 22]</sup>. Verwendet man eine Matrize, welche für eine RNA mit der Sequenz ApUpCp... codiert, so ist ATP das erste Substrat, das an den Enzym-DNA-Komplex findet. ATP ( $\equiv$  pppA) wirkt als Starter. Darauf folgt die Bindung von UTP ( $\equiv$  pppU) (Abb. 1). Im nächsten Schritt wird die erste Phosphodiesterbindung gebildet, wobei als Zwischenprodukt das Dinucleosidtetraphosphat pppApU entsteht. Fehlt das folgende Nucleotid im Reaktionsansatz, so wird dieses Produkt freigesetzt; die Abdissoziation von Diphosphat schließt sich an<sup>[22]</sup>. Unter diesen Umständen wiederholt sich der Initiationsschritt fortwährend, was zu einer Anhäufung von pppApU führt. Diese Reaktion wird als abortive Initiation bezeichnet<sup>[23]</sup>.

In Gegenwart der nachfolgenden Nucleotide findet eine Translokation des Dinucleosidtetraphosphats statt. Der Uridinrest von pppApU nimmt dann die Bindungsstelle ein, an der vorher der Adenosinteil des startenden ATP-Moleküls gebunden war. Gleichzeitig muß sich das Enzym um eine Base am Matrizenstrang fortbewegt haben. Die Bindungsstelle, an der vorher UTP gebunden war, ist jetzt frei und kann das nächste Substratmolekül (CTP  $\equiv$  pppC) aufnehmen. Dann wird die nächste Phosphodiesterbindung geschlossen. Die kontinuierliche Wiederholung dieser Schritte führt zur Synthese langkettiger RNA. Dieses Schema beschreibt einen Minimalmechanismus des Katalysevorgangs, der noch nicht in allen Einzelheiten bewiesen ist. Seine wesentlichen Teile genügen aber für die Diskussion der Folgen der Anlagerung des Rifampicins an das Enzym.

Gibt man das Antibioticum in vitro zum Enzym und setzt dann die Matrize und einen vollständigen Satz von Ribonucleosidtriphosphaten zu, so nimmt die Geschwindigkeit der RNA-Synthese rasch mit steigender Konzentra-



Schema 1.

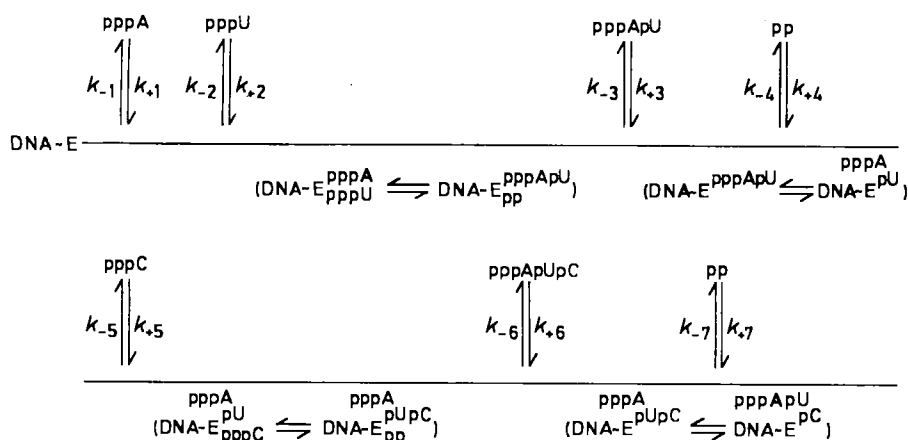


Abb. 1. Mechanismus des RNA-Kettenstarts durch *E. coli*-RNA-Polymerase (siehe Text). DNA-E— symbolisiert den DNA-Enzym-Komplex.

tion des Antibiotikums ab (Abb. 2). Schon bei einer Konzentration von nur 0.06  $\mu\text{g/mL}$  (0.1  $\mu\text{M}$ ) erreicht die Hemmung 50%. Bei einer zehnfach höheren Konzentration ist die RNA-Synthese kaum noch meßbar. Mit abnehmender Geschwindigkeit der RNA-Synthese nimmt gleichzeitig die Bildungsgeschwindigkeit des Dinucleosidtetraphosphats pppApU zu<sup>[24]</sup>. Die halbmaximale Geschwindigkeit wird bei der gleichen Antibiotikum-Konzentration erreicht, welche die RNA-Synthese um 50 Prozent herabsetzt. Offensichtlich vermag der Enzym-Rifampicin-Komplex immer noch die pppApU-Synthese zu katalysieren, aber nicht die Synthese langkettiger RNA<sup>[23]</sup>. In diesem Zusammenhang ist es wichtig festzustellen, daß Rifampicin nicht die scheinbare Michaelis-Konstante für die Umsetzung der Substrate ATP und UTP in Gegenwart des Enzyms verändert<sup>[25]</sup>.

Die Hemmung der RNA-Synthese kann man mit mehreren Hypothesen erklären. Die einfachste nimmt eine sterische Blockierung des Teils der Produktbindungsstelle an, welcher für die Bindung von größeren Zwischenprodukten

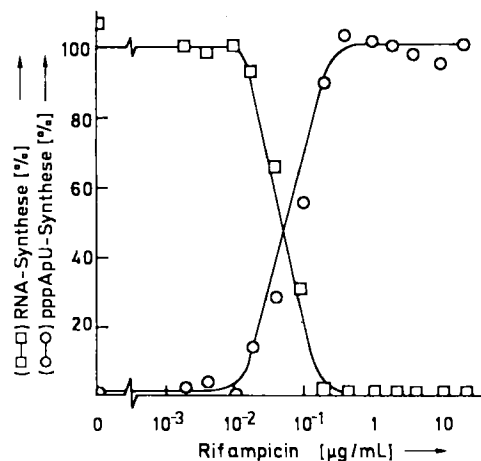


Abb. 2. Wirkung von Rifampicin auf die von der *E. coli*-RNA-Polymerase katalysierte RNA- oder pppApU-Synthese. Die Experimente wurden bei 25°C an der DNA des Bakteriophagen T4 als Matrize durchgeführt [36]. 100% pppApU-Synthese ( $\circ$ — $\circ$ ) in Gegenwart von 2  $\mu\text{g/mL}$  Rifampicin entsprechen pro Stunde Inkubationszeit 1830 Impulsen/min. 100% RNA-Synthese ( $\square$ — $\square$ ) in Abwesenheit von Rifampicin entsprechen pro Stunde Inkubationszeit 2380 Impulsen/min.

als Di- oder Trinucleotiden erforderlich ist<sup>[26, 27]</sup>. Eine andere Hypothese fordert eine Vergrößerung der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante  $k_{-3}$  des intermediären Dinucleotids (Abb. 1). Diese Annahme stützt sich auf Ergebnisse, die hauptsächlich mit der synthetischen Matrize poly[d(A-T)] erhalten worden sind<sup>[28]</sup>. Alle diese Hypothesen setzen voraus, daß das Antibioticum die Bildung der Dinucleotide nicht hemmt. Dies kann man experimentell prüfen. Die abortive Initiation ist mit vielen Adenosin-Derivaten (z. B. Adenosin, 5'-AMP, 5'-ADP, ATP) als Starter möglich<sup>[21, 26, 29]</sup> [vgl. Gl. (1)]. Die Synthesegeschwindigkeit hängt vom Starter ab. Bei 25°C ist sie mit 5'-AMP am höchsten, gefolgt von ATP und ADP. Adenosin ist das schlechteste Substrat (Tabelle 1). Die Ergebnisse mit der RNA-Polymerase aus dem Gram-negativen *E. coli* wie dem Gram-positiven *Micrococcus luteus* waren ähnlich.

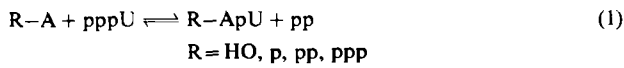


Tabelle 1. Relative Synthesegeschwindigkeit ( $v_{rel}$ ) einiger Dinucleotide bei 25°C in Gegenwart oder Abwesenheit von 2 µM Rifampicin. Die abortive Initiation wurde mit 1.5 mM Starter und [α-<sup>32</sup>P]UTP an der DNA des Bakteriophagen T7 D111 als Matrize mit der RNA-Polymerase aus *E. coli* oder *M. luteus* ähnlich wie beschrieben [36] durchgeführt.

Starter	Produkt	$v_{rel}$		$v_{rel}$ mit Rifampicin	
		<i>E. coli</i> [%]	<i>M. lut.</i> [%]	<i>E. coli</i> [%] [a]	<i>M. lut.</i> [%] [a]
5'-ATP	pppApU	100	100	127	73
5'-ADP	ppApU	60	79	47	34
5'-AMP	pApU	124	124	42	18
Adenosin	ApU	51	32	15	15

[a] 100% = Geschwindigkeit ohne Rifampicin (Spalte 3 und 4).

Es ist sehr interessant, die Wirkung von geringen Konzentrationen Rifampicin bei 25°C auf diese Reaktionen zu betrachten. Die Synthese des Dinucleosidmonophosphats ApU wird zu 85% gehemmt. Ebenso wird die Synthese von pApU und ppApU stark herabgesetzt. Diese Hemmung hätte man nach den vorher erwähnten Hypothesen nicht erwartet. Unterschiedliche Wirkungen von Rifampicin auf die Dinucleotidsynthese durch die Enzyme aus *E. coli* und *M. luteus* beobachtet man nur mit dem hochgeladenen Produkt pppApU. Während die Synthese durch das Enzym aus *M. luteus* zu 27% gehemmt wird, nimmt die Bildungsgeschwindigkeit, die man mit dem Enzym aus *E. coli* mißt, unter sonst völlig gleichen Bedingungen um 27% zu (Tabelle 1)<sup>[30]</sup>. Dieser überraschende Effekt wird nicht nur beobachtet, wenn das Enzym zuerst mit dem Antibioticum inkubiert wird, um den Komplex zu bilden, sondern auch, wenn man Rifampicin während der abortiven Initiation zusetzt (Abb. 3).

Ähnliche Ergebnisse wurden mit verschiedenen Matrizen erhalten. Oberhalb 30°C wird die Synthesegeschwindigkeit von pppApU auf jeden Fall verringert, auch wenn das *E.-coli*-Enzym als Katalysator verwendet wird<sup>[26, 30]</sup>. Offensichtlich nimmt die Hemmwirkung von Rifampicin mit der Gesamtladung des gebildeten Dinucleotids ab, wird aber selbst noch bei der Synthese von pppApU und ppppApU beobachtet<sup>[26]</sup>. Daher kann das Antibioticum die

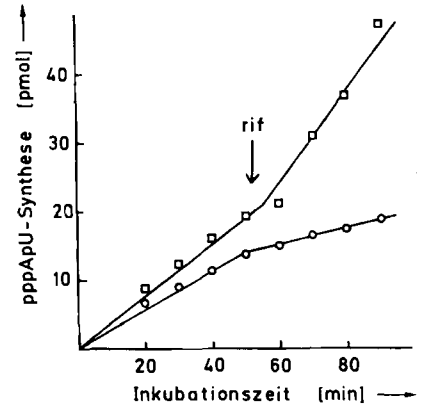


Abb. 3. Wirkung von Rifampicin bei 26°C auf die durch die RNA-Polymerase aus *E. coli* (□—□) oder aus *M. luteus* (○—○) katalysierte pppApU-Synthese an der DNA des Bakteriophagen Lambda. Nach 52 min wurden 2 µg/mL Rifampicin (rif) zugesetzt.

RNA-Synthese nicht allgemein durch die Erhöhung der Dissoziationsgeschwindigkeit des Zwischenprodukts oder durch Blockierung der Produktbindungsstelle nur für etwas längere Zwischenprodukte hemmen. Da die RNA-Polymerasen aus *E. coli* und *M. luteus* in einigen Einzelheiten ihrer Struktur voneinander abweichen<sup>[31]</sup>, ist es nicht überraschend, daß Rifampicin auf diese beiden Enzyme etwas verschieden einwirkt.

#### 4. Konkurrenz zwischen Diphosphat und Rifampicin

Bisher wurde nur der Einfluß von Enzym-gebundenem Rifampicin auf die Synthesereaktion [Gl. (1)] diskutiert. Wird die Rückreaktion in der gleichen Weise gehemmt? Um die Geschwindigkeit der Diphosphorolyse zu bestimmen, setzt man der Reaktionsmischung, die aus Enzym, Matrize, ATP, UTP und  $Mg^{2+}$  besteht, radioaktiv markiertes Diphosphat zu. Die Geschwindigkeit der Rückreaktion wird dann durch Bestimmung von radioaktiv markiertem UTP gemessen, das von markiertem Diphosphat durch Adsorption an Tierkohle getrennt wird<sup>[32]</sup>. Die Rückreaktion wird stark durch Rifampicin gehemmt, unabhängig von der Zahl der Phosphatgruppen am 5'-Ende des Dinucleotids. Bei 0.34 mM Diphosphatkonzentration beobachtet man 50proz. Hemmung mit 0.08 µM Rifampicin. Die Geschwindigkeit der Diphosphorolyse hängt stark von der Diphosphatkonzentration ab (Abb. 4). Wie man aus der Lineweaver-Burk-Darstellung der Meßergebnisse sehen kann, verändert Rifampicin die Reaktionsgeschwindigkeit kompetitiv zu Diphosphat (Abb. 4). Dies legt nahe, daß die Bindung von Diphosphat an den Enzym-DNA-Komplex durch das Antibioticum verändert wird und umgekehrt. Ist dies der Fall, so sollte eine Erhöhung der Diphosphatkonzentration die Bindung von Rifampicin an den Enzym-Matrizen-Komplex herabsetzen<sup>[33]</sup>. Dies wird tatsächlich beobachtet (Abb. 5). In Gegenwart der Matrize ist der Einfluß der Diphosphatkonzentration viel ausgeprägter. Offensichtlich wird die Bindungsstelle des Diphosphats durch die Assoziation des Enzyms mit der Matrize geändert. Die Geschwindigkeit der Rückreaktion hängt – unabhängig von der Anwesenheit des Antibioticums im Konzentrationsbereich von 0.03 nM–10 µM – nicht von der pppApU-Konzentration ab. Erst bei höheren Konzentra-

tionen beobachtet man eine Hemmung, die wahrscheinlich von der Bildung eines kinetischen „dead end“-Komplexes verursacht wird<sup>[22]</sup>.

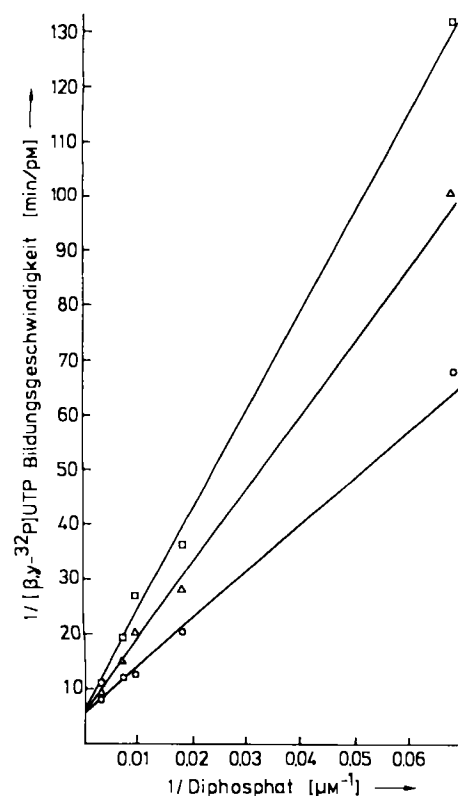


Abb. 4. Einfluß von Rifampicin und Diphosphat auf die Enzym-katalysierte Diphosphorolyse von pppApU an der DNA des Bakteriophagen T7 D111 als Matrice (Darstellung nach Lineweaver und Burk). Die Diphosphorolyse wurde bei 25°C ähnlich wie beschrieben [32] in Abwesenheit (O—O) oder in Gegenwart von 0,05 (Δ—Δ) bzw. 0,10 (□—□) μg/mL Rifampicin gemessen.

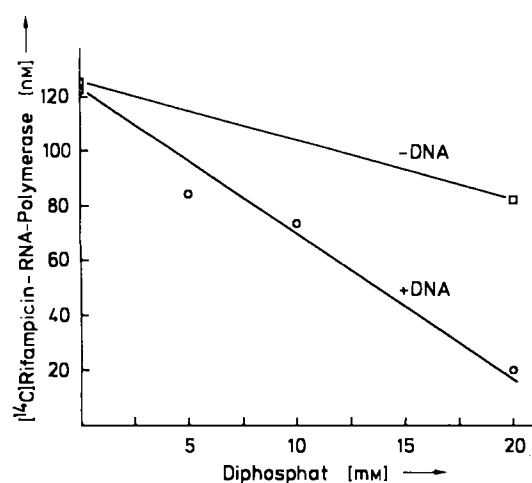


Abb. 5. Einfluß von Diphosphat auf die Bindung von  $[^{14}\text{C}]$ Rifampicin an *E.-coli*-RNA-Polymerase bei 37°C in Abwesenheit (□—□) oder in Gegenwart (O—O) von 70 pmol/mL DNA des Bakteriophagen T7 D111. Das Enzym-gebundene  $[^{14}\text{C}]$ Rifampicin wurde ähnlich wie beschrieben [33] gemessen.

## 5. Konkurrenz zwischen RNA und Rifampicin

RNA hemmt die katalytische Aktivität des Enzyms sehr stark, wenn sie vor der Matrice zugesetzt wird<sup>[34,35]</sup>. Bemerkenswerterweise ist die Hemmung der pppApU-Synthese

durch RNA viel geringer, wenn man das Enzym vor der Zugabe der RNA mit 0,1 μM Rifampicin inkubiert<sup>[36]</sup>. Diesen Schutzeffekt des Antibiotikums kann man mit einer kompetitiven Wirkung auf die Bindung von RNA und umgekehrt erklären – ähnlich wie bei den Beobachtungen mit Diphosphat. Es ist bekannt, daß RNA die Bindung von Rifampicin an RNA-Polymerase stark hemmt<sup>[37]</sup>. Die hemmende Wirkung des Antibiotikums auf die Bindung der RNA ist schwieriger nachzuweisen, da das Enzym zwei Bindungsstellen für Nucleinsäuren hat, nämlich eine für das Produkt und eine für die Matrice. Daher muß man die beiden Bindungsstellen voneinander trennen. Die Untereinheiten der RNA-Polymerase bilden mehrere Komplexe miteinander:  $\alpha_2\beta\beta'\sigma$  (Holoenzym),  $\alpha_2\beta\beta'$  (Core-Enzym),  $\alpha_2$  (Dimer) und den Teilkomplex  $\alpha_2\beta$ . Glücklicherweise ist  $\alpha_2\beta$  imstande, RNA<sup>[20]</sup> und ebenso auch, mit recht hoher Affinität, Rifampicin zu binden<sup>[38–40]</sup>, während DNA kaum gebunden wird<sup>[20]</sup>. Wir haben gefunden, daß Rifampicin die Bindung der RNA an den Teilkomplex hemmt<sup>[20]</sup> und umgekehrt RNA die Bindung von Rifampicin hemmt<sup>[36]</sup>. Diese Beobachtungen stützen sehr deutlich die Hypothese einer Konkurrenz zwischen dem Antibiotikum und der RNA um die Bindung an die RNA-Polymerase. Sie erklären auch, warum RNA-Polymerase Rifampicin während der RNA-Synthese nicht zu binden vermag<sup>[13,41]</sup>. Aus dem gleichen Grund kann das Antibiotikum die RNA-Kettenverlängerung nicht beenden, wenn es der Reaktionsmischung nach dem Start zugesetzt wird. Es hemmt jedoch die RNA-Synthese, wenn es dem Enzym vor dem Substrat zugesetzt wird<sup>[42]</sup>. Ursprünglich führten diese Beobachtungen zur Hypothese von Rifampicin als einem spezifischen Hemmstoff des RNA-Kettenstarts – eine Hypothese, die weiten Anklang und Eingang selbst in Lehrbüchern<sup>[43]</sup> gefunden hat. Diese Hypothese erklärt aber die Vielzahl von Beobachtungen über die molekularen Wirkungen von Rifampicin viel weniger überzeugend als die Hypothese einer indirekten Wechselwirkung des gebundenen Antibiotikums mit der Bindung der Reaktionsprodukte.

## 6. Das Eindringen von Rifampicin in Bakterien

Für die Wirkung von Rifampicin auf den Stoffwechsel der Bakterien gibt es noch eine weitere Voraussetzung. Dies ist die Aufnahme des Antibiotikums in die Bakterienzelle, damit es an seinen Angriffsort im Cytoplasma kommt. Man hat postuliert, daß Rifampicin keinen besonderen Aufnahmemechanismus erfordert, da es so stark lipophil ist. Es wird angenommen, daß es sich rasch in der lipidreichen Zellwand und den Bakterienmembranen löst und das Cytoplasma über ein Verteilungsgleichgewicht erreicht<sup>[44]</sup>. Tatsächlich enthält der Tuberkulose-Erreger *M. tuberculosis* einen sehr hohen Anteil komplexer Lipide in der Zellwand, was das Lösen und Eindringen von Rifampicin erleichtern sollte. Allerdings deuten neue Beobachtungen an, daß das Eindringen des Antibiotikums von zusätzlichen Faktoren kontrolliert wird<sup>[45]</sup>. Nach der Mutagenese von *E. coli* AB1157<sup>[46]</sup> mit *N*-Methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidin wurden mit einem geeigneten Selektionsverfahren Klone isoliert, welche immer noch eine Rifampicinempfindliche RNA-Polymerase enthalten, jedoch in Gegenwart des Antibiotikums wachsen können. Dabei wurde kein Hinweis auf den Abbau von Rifampicin gefunden.

Die Aufnahme des Antibiotikums in die mutierten Zellen ist stark vermindert (Abb. 6). Die Resistenz der Mutanten ist auf Rifamycine beschränkt, während die Empfindlichkeit gegen andere Gifte wie Phenol, Acriflavin, Malachitgrün, Neomycin, Tetracyclin oder Chloramphenicol unverändert ist.

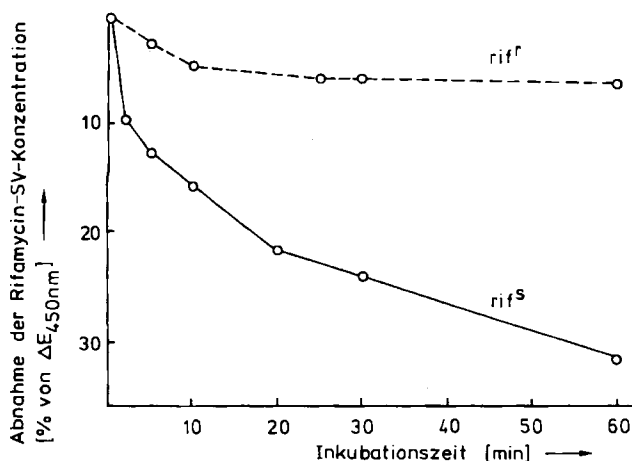


Abb. 6. Aufnahme von Rifampicin SV durch *E. coli* CR 34 thy („rif“) und die Rifampicin-resistente Mutante rif 41 („rif“) bei 37°C. Die Abnahme der Rifampicin-Konzentration im Überstand wurde spektralphotometrisch gemessen [44].

Das mutierte Gen kann in empfindliche Stämme mit dem Bakteriophagen Plk transduziert werden. Die Kartierung der Mutation mit Hilfe des Bakteriophagen Mu<sup>[47]</sup> hat gezeigt, daß das Gen zwischen den Genorten *cys* B (28 min) und *aro* D<sub>6</sub> (37 min) auf der *E. coli*-Chromosomenkarte liegt, also weit entfernt von den Genorten für die RNA-Polymerase-Untereinheiten. Das mutierte Gen wurde in pBR322 kloniert. *E. coli*-DH1- oder -HB101-Zellen, welche dieses Plasmid enthalten, widerstehen bis zu 200 µg/mL Rifampicin im Nährmedium, während die RNA-Polymerase gegenüber dem Antibiotikum ebenso empfindlich ist wie in den Plasmid-freien Wirtszellen. Bei der in-vitro-Expression<sup>[48, 49]</sup> des klonierten Gens tritt in der Polyacrylamid-Gelelektrophorese in Gegenwart von Dodecylsulfat ein Protein mit der relativen Molmasse von etwa 49000 auf. Das 2145 Basenpaare lange klonierte DNA-Fragment wurde sequenziert. Es enthält zwei Codon-Leserahmen, die mit einem Methionincodon nahe einer Shine-Dalgarno-ähnlichen Sequenz beginnen. Der größere codiert bis zum nächsten Stoppcodon für ein Protein mit 452 Aminosäuren. Diese Sequenz könnte vielleicht für das Protein, das man bei der in-vitro-Genexpression beobachtet, codieren. Es ist noch weitere Arbeit notwendig, um die Funktion dieser Genprodukte bei der Aufnahme einer so stark lipophilen Substanz wie Rifampicin durch *E. coli*-Zellen aufzuklären.

## 7. Ausblick

Dank verbesserter Hygiene und gesünderer Ernährung, guter Früherkennungsmethoden und – nicht zuletzt – wirksamer Arzneimittel wie Rifampicin ist aus der Volksseuche Tuberkulose, zum mindesten in den Industrieländern, heute eine seltene und spezifisch zu behandelnde Krank-

heit geworden. Vergessen sind bei uns die Zeiten, in denen jeder siebente Mensch an Tuberkulose starb. Geblieben sind die Nichtseßhaften und Suchtkranken, also soziale Schichten, die schwer therapierbar und immer noch von dieser Krankheit bedroht sind. Geblieben ist auch die Gefahr des Auftretens von Bakterienstämmen, die gegen Antibiotica wie Rifampicin resistent sind. Es war überraschend, erkennen zu müssen, daß eine solche Resistenz auch durch die Blockierung der Aufnahme eines hydrophoben Arzneimittels zustande kommen kann, das die lipophilen Membranen von Mikroorganismen besonders leicht durchdringen sollte. Noch ist die normale Funktion der Gene unbekannt, welche dieses Merkmal kontrollieren. Es wird weiteren Arbeiten vorbehalten sein, die Spezifität und die Verbreitung dieser Art von Resistenz aufzuklären.

*Wir sind Professor A. Böck und Professor H. Schmieger, München, Dr. D. Kamp, Martinsried, und Dr. J. E. G. McCarthy, Braunschweig-Stöckheim, für großzügige Hilfe und Ratschläge während verschiedener Stufen dieser Arbeit sehr zu Dank verpflichtet. Die Untersuchungen unseres Laboratoriums, die in diesem Aufsatz erwähnt sind, wurden von der Deutschen Forschungsgemeinschaft, dem Fonds der Chemischen Industrie und Dr. A. Pohl, Bayrol Chemische Fabrik GmbH, Martinsried, unterstützt.*

Eingegangen am 22. April 1985 [A 559]

- [1] Illustrierte Stern, Heft 5, 22. Januar 1976, S. 60–64, Gruner & Jahr, Hamburg.
- [2] P. Sensi, *Res. Prog. Org. Biol. Med. Chem.* 1 (1964) 338–421.
- [3] W. Oppolzer, V. Prelog, P. Sensi, *Experientia* 20 (1964) 336–339.
- [4] W. Wehrli, *Top. Curr. Chem.* 72 (1977) 21–45.
- [5] N. Maggi, C. Pasqualucci, R. Ballotta, P. Sensi, *Chemotherapy (Basel)* 11 (1966) 285–292.
- [6] P. Mišoš, L. Trnka, *Collect. Czech. Chem. Commun.* 37 (1972) 1049–1053.
- [7] G. C. Lancini, R. Pallanza, L. G. Silvestri, *J. Bacteriol.* 97 (1969) 761–768.
- [8] R. J. White, G. C. Lancini, L. G. Silvestri, *J. Bacteriol.* 108 (1971) 737–741.
- [9] G. Hartmann, K. O. Honikel, F. Knüsel, J. Nüesch, *Biochim. Biophys. Acta* 145 (1967) 843–844.
- [10] S. Riva, A. Fietta, G. Silvestri, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 49 (1972) 1263–1271.
- [11] H. Diggelmann, C. Weissmann, *Nature (London)* 224 (1969) 1277–1279.
- [12] F. Seydel, H. R. Lill, G. R. Hartmann, *Eur. J. Biochem.* 117 (1981) 87–91.
- [13] U. I. Lill, G. R. Hartmann, *Eur. J. Biochem.* 38 (1973) 336–345.
- [14] E. Di Mauro, L. Snyder, P. Marino, A. Lamberti, A. Coppo, G. P. Tocchini-Valentini, *Nature (London)* 222 (1969) 533–537.
- [15] D. Rabussay, W. Zillig, *FEBS Lett.* 5 (1969) 104–106.
- [16] T. Linn, R. Losick, A. L. Sonenshein, *J. Bacteriol.* 122 (1975) 1387–1390.
- [17] Yu. A. Ovchinnikov, G. S. Monasturskaya, V. V. Gubanov, V. M. Lipkin, E. D. Sverdlov, I. F. Kiver, I. A. Bass, S. Z. Mindin, O. N. Danilevskaya, R. B. Khesin, *Mol. Gen. Genet.* 184 (1981) 536–538.
- [18] N. A. Lisitsyn, E. D. Sverdlov, E. P. Moiseyeva, O. N. Danilevskaya, V. G. Nikoforov, *Mol. Gen. Genet.* 196 (1984) 173–174.
- [19] Yu. A. Ovchinnikov, G. S. Monasturskaya, V. V. Gubanov, S. O. Guryev, O. Yu. Chertov, N. N. Modyanov, V. A. Grinkevich, I. A. Makarova, T. V. Marchenko, I. N. Polovnikova, V. M. Lipkin, E. D. Sverdlov, *Eur. J. Biochem.* 116 (1981) 621–629.
- [20] H. Mi, G. R. Hartmann, *Eur. J. Biochem.* 131 (1983) 113–118.
- [21] W. R. McClure, C. L. Cech, D. E. Johnston, *J. Biol. Chem.* 253 (1978) 8941–8948.
- [22] W. Smagowicz, K. H. Scheit, *Nucleic Acids Res.* 9 (1981) 5845–5854.
- [23] D. E. Johnston, W. R. McClure in R. Losick, M. Chamberlin (Hrsg.): *RNA Polymerase*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y. 1976, S. 413–428.
- [24] C. Kessler, *Dissertation*, Universität München 1980.
- [25] A. Mann, C. Kessler, H. Mosig, G. R. Hartmann, *Robert-Koch-Mitt.* 6 (1983) 73–82.
- [26] W. R. McClure, C. L. Cech, *J. Biol. Chem.* 253 (1978) 8949–8956.

- [27] O. Yu. Chertov, A. N. Obukhov, V. M. Lipkin, *Bioorg. Khim.* 9 (1983) 633–640.
- [28] W. Schulz, W. Zillig, *Nucleic Acids Res.* 9 (1981) 6889–6906.
- [29] M. F. Shemyakin, A. G. Malygin, *Mol. Biol. (Moscow)* 14 (1980) 1392–1395.
- [30] C. Kessler, G. R. Hartmann, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 74 (1977) 50–56.
- [31] C. Leib, H. Ernst, G. R. Hartmann in F. Chapeville, A.-L. Haenni (Hrsg.): *Chemical Recognition in Biology*. Springer, Berlin 1980, S. 301–307.
- [32] J. S. Krakow, E. Fronk, *J. Biol. Chem.* 244 (1969) 5988–5993.
- [33] E. Wyss, W. Wehrli, *Anal. Biochem.* 70 (1976) 547–553.
- [34] C. F. Fox, R. I. Gumpert, S. B. Weiss, *J. Biol. Chem.* 240 (1965) 2101–2109.
- [35] H. Bremer, C. Yegian, M. Konrad, *J. Mol. Biol.* 16 (1965) 94–103.
- [36] C. Kessler, H. Mi, G. R. Hartmann, *Eur. J. Biochem.* 122 (1982) 515–518.
- [37] J. C. Handschin, W. Wehrli, *Eur. J. Biochem.* 66 (1976) 309–317.
- [38] K. O. Stetter, W. Zillig, *Eur. J. Biochem.* 48 (1974) 527–540.
- [39] G. R. Hartmann, *Hippokrates* 47 (1976) 3–15.
- [40] H. Heumann, *Dissertation*, Universität München 1978.
- [41] E. Eilen, J. S. Krakow, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 55 (1973) 282–289.
- [42] A. Sippel, G. Hartmann, *Biochim. Biophys. Acta* 157 (1968) 218–219.
- [43] L. Stryer: *Biochemistry*, 2. Aufl., Freeman, San Francisco 1981, S. 613.
- [44] H. Nikaido, *Biochim. Biophys. Acta* 433 (1976) 118–132.
- [45] M. Tropschug, G. R. Hartmann, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 361 (1980) 1351–1352.
- [46] B. J. Bachmann, *Bacteriol. Rev.* 36 (1977) 525–557.
- [47] M. Faelen, A. Toussaint, *J. Mol. Biol.* 104 (1976) 525–539.
- [48] H. Chen, G. Zubay, *Methods Enzymol.* 101 (1983) 674–690.
- [49] J. E. G. McCarthy, H. U. Schairer, W. Sebald, *EMBO J.* 4 (1985) 519–526.

## Die Rolle der Hydrothermalsynthese in der präparativen Chemie

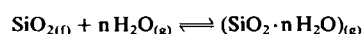
Von Albrecht Rabenau\*

Unter Hydrothermalsynthesen versteht man heute heterogene Reaktionen in wäßrigem Medium oberhalb 100°C und 1 bar. Die früher übliche Unterscheidung zwischen hydrothermalen und pneumatolytischen Bedingungen (unterhalb bzw. oberhalb des kritischen Punktes) wird nicht mehr gemacht, da beim Überschreiten kritischer Punkte keine Diskontinuitäten beobachtet werden. Unter hydrothermalen Bedingungen gehen sonst schwerlösliche Stoffe als Komplexe in Lösung, an deren Bildung Wasser selbst oder gut lösliche „Mineralisatoren“ beteiligt sein können. Dabei gelten die Gesetzmäßigkeiten chemischer Transportreaktionen, als deren Spezialfall die Hydrothermalsynthese angesehen werden kann. In den letzten Dekaden hat die Methode in den Geowissenschaften – in denen sie auch historisch angesiedelt ist – starke Impulse erfahren, deren Übertragung auf die präparative Festkörperchemie diskutiert wird.

### 1. Einleitung

Das Vorbild hydrothermaler Verfahren (wäßriges Medium oberhalb 100°C und 1 bar) liefert die Natur: Zahlreiche Mineralien haben sich unter diesen Bedingungen gebildet. Das hat frühzeitig die Geowissenschaftler veranlaßt, durch Simulierung hydrothermaler Mineralbildung im Laboratorium Einblick in die Bildungsbedingungen zu bekommen und damit zur Kenntnis geologischer Abläufe beizutragen. Heute noch gehören hydrothermale Untersuchungen zu den wichtigen Arbeitsgebieten in den Geowissenschaften. Daneben spielen hydrothermale Verfahren unter dem Begriff Hydrometallurgie in der Technik eine Rolle, z. B. das klassische Bayer-Verfahren zum Aufschluß von Bauxit. Hydrothermale Bedingungen treten auch in Heizkraftwerken auf und sind die Ursache vieler Korrosionserscheinungen. In die moderne Festkörperforschung fand die Methode nach dem zweiten Weltkrieg Eingang. Angeregt durch die von Nacken stimulierte industrielle

Züchtung von Oszillatorkristallen aus Quarz, konzentrierte sich das Interesse auf die Züchtung extrem reiner, perfekter Kristalle mit interessanten physikalischen Eigenschaften und von ausreichender Größe, diese Eigenschaften zu messen und anzuwenden. Diese Bedingungen haben trotz des großen Erfolges dieses Konzeptes in der Vergangenheit die außerordentlichen Möglichkeiten der Methode für die präparative Festkörperchemie in den Hintergrund treten lassen. Hier entfallen die extremen Anforderungen an Reinheit und Perfektion, wie sie z. B. in der Halbleiterphysik auftreten, ebenso wie die an die Volumina der Einkristalle, die sich auf eine für Kristallstrukturbestimmungen notwendige Größe beschränken. Diese ist in der Regel um Größenordnungen kleiner und wird durch neuere Entwicklungen wie durch Verwendung der Synchrotronstrahlung<sup>[2]</sup> weiter erniedrigt. Diese Übersicht soll den Einsatz der Hydrothermalsynthese für die Stoffsynthese darlegen. Ein Anknüpfungspunkt ist, daß die Hydrothermalsynthese als Spezialfall einer chemischen Transportreaktion<sup>[1]</sup> angesehen werden kann. In der Regel ist dabei eine chemische Reaktion mit einem Transportvorgang verbunden, z. B. einem SiO<sub>2</sub>-Transport:



[\*] Prof. Dr. A. Rabenau  
Max-Planck-Institut für Festkörperforschung  
Heisenbergstraße 1, D-7000 Stuttgart 80