

ANGEWANDTE CHEMIE

103. Jahrgang 1991

Heft 9

Seite 1067–1218

Lantibiotica – ribosomal synthetisierte Polypeptidwirkstoffe mit Sulfidbrücken und α,β -Didehydroaminoäuren **

Von Günther Jung *

Lantibiotica sind polycyclische Peptidantibiotika, die intrachenare Sulfidbrücken, bestehend aus den Thioetheraminoäuren Lanthionin und β -Methyllanthionin, sowie α,β -ungesättigte Aminoäuren wie Didehydroalanin und Didehydroaminobuttersäure enthalten. Nach Kenntnis der Lantibiotica-Biosyntheseschritte und der daran beteiligten Enzyme wird eine gentechnologische Konstruktion analog hochmodifizierter Polypeptide möglich sein. Zu den Lantibiotica zählen Nisin, ein wichtiges Lebensmittelkonservierungsmittel, Epidermin, ein hochspezifisches Aknetherapeutikum, eine Reihe von Enzyminhibitoren sowie immunologisch interessante Peptidwirkstoffe. Die Synthese der Lantibiotica erfolgt ribosomal über inaktive Vorläuferproteine (Prälantibiotika), die posttranslational durch enzymatische Modifikation in die aktiven Peptidantibiotika umgesetzt werden. Die modifizierenden Enzyme führen Dehydratisierungen an Serin- und Threoninresten und stereospezifische Additionen der Thiolgruppen der Cysteinreste an die entstandenen α,β -ungesättigten Doppelbindungen durch, die zur Bildung mehrerer Sulfidbrücken führen. Bei der anschließenden proteolytischen Abspaltung des Leaderpeptids entsteht das biologisch aktive Lantibioticum. Konformationsanalysen der Lantibiotica sowie ihrer Präpeptide erlauben Aussagen über Wirkungsweise und Teilschritte der Biosynthese. Antikörper gegen synthetische Präpeptidsequenzen und moderne instrumentelle Peptidanalysemethoden ermöglichen die Aufklärung von Biosynthesezwischenstufen.

1. Einleitung

Heterodet polycyclische Peptidantibiotika, die Thioetheraminoäuren wie Lanthionin und α,β -ungesättigte Aminoäuren enthalten, werden als *Lantibiotica* bezeichnet^[1]. Zu dieser Naturstoffklasse gehören das in der Lebensmittelindustrie als Konservierungsmittel eingesetzte Nisin^[2, 3], das Therapeutikum gegen Akne Epidermin^[4], verschiedene Enzyminhibitoren und immunologisch aktive Polypeptide wie Ancovenin^[5], Ro 09-0198^[6], Duramycin^[7] sowie die Antibiotika Mersacidin^[8a] und Actagardine^[8b]. Manche

Lantibiotica wie z. B. Pep5^[9, 10] induzieren einen spannungsabhängigen Ionenstrom in Lipidmembranen^[10c].

Die Ergebnisse der Strukturaufklärung neuer Lantibiotica weisen darauf hin, daß die Biosynthese der in Sequenz und Sekundärstruktur sehr unterschiedlichen Lantibiotica nach einem einheitlichen, allen gemeinsamen Prinzip verläuft. Dieses unterscheidet sich grundlegend von den üblichen Synthesemechanismen der meisten anderen Peptidantibiotica. Im Gegensatz zu den über Multi-Enzym-Komplexe (Thiolester) und Enzymsysteme synthetisierten Peptidantibiotica entstehen nämlich die biologisch aktiven, Lanthionin-haltigen Sekundärmetabolite aus ribosomal synthetisierten Vorläuferproteinen. Diese Prälantibiotica bestehen aus einer Leadersequenz und einem Prolantibioticum, das posttranslational enzymatisch modifiziert wird^[11]. Dabei werden die Serin- und Threoninreste zu α,β -Didehydroaminoäuren dehydratisiert, und an die entstandenen Doppelbindungen

[*] Prof. Dr. G. Jung

Institut für Organische Chemie der Universität
Auf der Morgenstelle 18, W-7400 Tübingen

[**] Nach einem Vortrag anlässlich der Verleihung der Max-Bergmann-Medaille 1989 in Wangs (Schweiz).

addieren die Thiolgruppen der Cysteinreste unter Bildung von Sulfidringen.

Je nach Variationsbreite und Spezifität der modifizierenden Enzymsysteme könnten über Einschleusung von substratalogen Proteinen oder Peptiden in die Lantibiotica-Biosynthese neuartige Proteine, Agonisten, Antagonisten, Inhibitoren und Enzyme produziert werden, die Dehydroaminoäuren, Sulfid- statt Disulfidbrücken oder Lysinoalaninbrücken enthalten. Daher ist die Biosynthese der Lantibiotica nicht nur für die mikrobiologische Grundlagenforschung interessant, sondern ihr kommt auch im Hinblick auf die Entwicklung neuer Methoden des Protein-Engineerings eine besondere Bedeutung zu.

Die interdisziplinäre mikrobiologische und peptidchemische Lantibiotica-Forschung hatte in Tübingen bereits 1983 mit der Fermentation, Isolierung und Strukturaufklärung des als Aknetherapeutikum einsetzbaren Epidermins begonnen. Die Struktur des tetracyclischen 21-Peptidamidantibioticums Epidermin wurde 1985 publiziert^[4]. Die außergewöhnlich intensive und zeitlich gut ineinandergreifende Zusammenarbeit zwischen den mikrobiologischen Arbeitsgruppen und den Peptidchemikern führte innerhalb kurzer

Zeit zur Aufklärung weiterer Lantibiotica und zu wesentlichen Erkenntnissen über deren Strukturgene. Inzwischen wurden bereits einige der an der Biosynthese beteiligten Enzyme auf DNA-Ebene sequenziert. Damit ist die vollständige Aufklärung der Biosyntheseschritte und die gezielte genetotechnologische Herstellung von modifizierten Polypeptiden und Proteinen mit ungewöhnlichen Bausteinen greifbar nahe gerückt. Im folgenden werden die Ergebnisse der Lantibiotica-Forschung erstmals in Form einer Übersicht vorgestellt.

2. Lantibiotica, ihre Wirkungen und Anwendungsmöglichkeiten

Lantibiotica werden von Mikroorganismen verschiedener Gattungen wie z. B. *Staphylococcus*, *Lactococcus*, *Bacillus* und *Streptomyces* produziert. Insbesondere aufgrund unterschiedlicher Strukturprinzipien (Ringbildung) ist es sinnvoll, die Lantibiotica in zwei Subtypen einzuteilen: Typ A sind Lantibiotica vom Nisin-Typ und Typ B vom Duramycin-Typ (Tabelle 1).

Tabelle 1. Zusammensetzung der Lantibiotica und ihre Produzentenstämme.

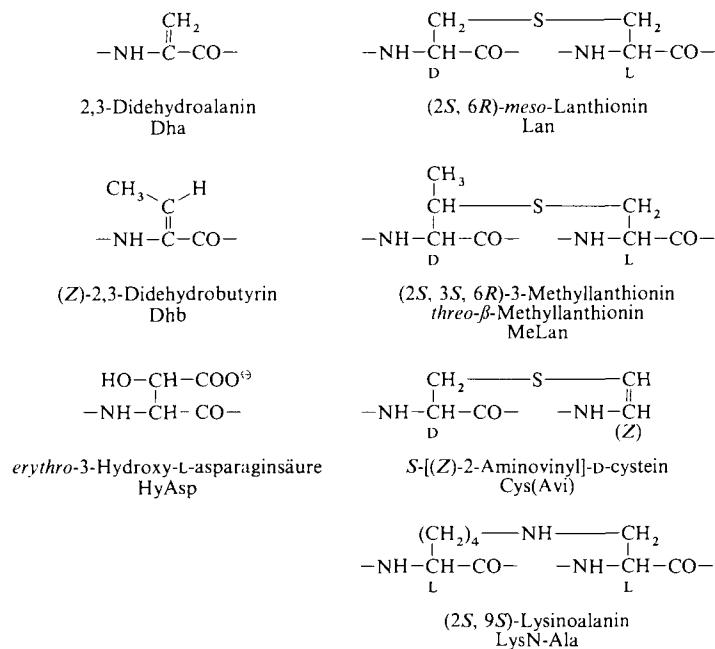
Lantibioticum	Molmasse	Amino-säuren [a]	Lan	ungewöhnliche Aminosäuren [b]				Mikroorganismen
				MeLan	Dha	Dhb	Sonstige	
<i>Typ A</i>								
Pep5	3488	34	2	1	-	3	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i> 5
Nisin	3353	34	1	4	2	1	-	<i>Streptococcus lactis</i> 6FS, ATCC 11454; Lancefield, group N; <i>Lactococcus lactis</i> , DSM 20729
Subtilin	3317	32	1	4	2	1	-	<i>Bacillus subtilis</i> , ATCC 6633, DMS 347
Epidermin	2164	22	2	1	-	1	Cys(Avi)	<i>Staphylococcus epidermidis</i> Tu 3298 (F16/P57)
Gallidermin	2164	22	2	1	-	1	Cys(Avi)	<i>Staphylococcus gallinarum</i> Tu 3928
Mersacidin	1825	20	-	4	1	-	Cys(Avi)	<i>Bacillus Y-85</i> , 54728
Actagardine	1890	19	1	3	-	-	-	<i>Actinoplanes</i> , ATCC 31048, ATCC 31049
<i>Typ B</i>								
Cinnamycin = Ro 09-0198 = Lanthiopeptin	2041	19	1	2	-	-	HyAsp LysN-Ala	<i>Streptoverticillium cinnamoneum</i> subsp. <i>cinnamoneum</i> , DSM 40005; <i>Streptomyces longisporoflavus</i> , DSM 40165; <i>Streptomyces cinnamoneus</i> <i>Streptoverticillium griseoverticillatum</i> <i>Streptoverticillium cinnamoneum</i> <i>Streptoverticillium cinnamoneum</i> subsp. <i>cinnamoneum</i> , DSM 40646; DSM 40144
Duramycin = Leucopeptin	2012	19	1	2	-	-	HyAsp	<i>Streptomyces cinnamoneus</i> forma <i>azacoluta</i> <i>Streptoverticillium</i> spec. R 2075 <i>Streptomyces gieseolutes</i> R 2107 <i>Streptomyces</i> sp.
Duramycin B C Ancovenin	1959	19	1	2	1	-	LysN-Ala LysN-Ala	

[a] Gesamtzahl an Precursoraminosäuren, z. B. wurde bei Pep5 für den Oxobutyrylrest ein Threonin mitgerechnet. [b] Strukturformeln, vgl. Tabelle 2.



Günther Jung, geboren 1937 in Tübingen, studierte Chemie und promovierte 1967 bei E. Bayer an der Universität Tübingen. Nach seiner Habilitation auf dem Gebiet der Naturstoffchemie erhielt er 1971 die Lehrbefugnis für Organische Chemie und Biochemie. Verschiedene Rufe nach auswärts lehnte er ab. Er verbrachte 1967/68 als Assistant Professor an der University of Houston. Für seine wissenschaftlichen Arbeiten auf dem Gebiet der Lantibiotica erhielt er die Max-Bergmann-Medaille 1989. Seine Forschungsgebiete sind die Strukturaufklärung, Wirkungsweise und Biosynthese größerer Polypeptidanibiotika und Siderophore, Struktur-Wirkungs-Beziehungen des Neuropeptids Y, Modelle für Transmembrananäle, Multiple Peptidsynthesemethoden, B-, T-Helfer- und T-Killer-Zell-Epitopkartierungen, Entwicklung totalsynthetischer Peptidvaccine.

Die aktuelle Zusammenstellung der strukturell bekannten Lantibiotica wird durch zwei erst vor kurzem aufgeklärte Beispiele erweitert. Diese sind das von seiner Molmasse her größte Polypeptid Pep5^[9] mit 3488 Da und Mersacidin^[8a] mit 1825 Da (Tabelle 1). Diese Molmassen stimmen mit Peptidlängen aus 34 oder 19 Aminosäuren überein, wobei ungewöhnliche Bausteine, die aus proteinogenen Aminosäuren stammen, mitgezählt sind. Lantibiotica können zwischen drei und fünf Sulfidringen aus *meso*-Lanthionin (Lan) und (2S,3S,6R)-3-Methylanthionin (MeLan) enthalten. Außerdem finden sich α,β -ungesättigte Aminosäuren wie α,β -Didehydroalanin (Dha), α,β -Didehydroaminobuttersäure (Dhb), S-Aminovinylcystein (Cys(Avi)) sowie *erythro*-3-Hydroxyasparaginsäure (HyAsp) und Aminbrücken aus Lysinoalanin (LysN-Ala) (Schema 1). Die antibiotische Wirkung



Schema 1. Ungewöhnliche Aminosäuren in Lantibiotica.

der Lantibiotica Nisin^[2, 3], Epidermin^[4] und Gallidermin^[11] richtet sich überwiegend gegen Gram-positive Keime (Tabelle 2). Es gibt eine Reihe von Gründen, aus denen Lantibiotica besser zu den Bacteriocinen als zu den üblichen Antibiotika gezählt werden.

Von großer lebensmitteltechnologischer Bedeutung ist das von *Streptococcus lactis* produzierte Nisin, das im Tonnenmaßstab seit 1951 zur natürlichen Konservierung von Gemüse, Käse, Fleisch und Kakao hergestellt wird^[3]. Nisin ist seit 1928 bekannt und gesundheitlich unbedenklich; vermutlich wird es schon seit Jahrhunderten in Milchprodukten vom Menschen konsumiert. Die Proteasen des menschlichen Magen- und Darmtraktes hydrolysieren es vollständig, und es schädigt die Gram-negativen Bakterien der Darmflora nicht. Somit bietet Nisin als Lebensmittelkonservierungsstoff wesentliche Vorteile gegenüber dem carcinogene Nitrosamine erzeugenden Nitrit oder Nitrat, die beide immer noch in der Käse- und Fleischindustrie verwendet werden.

Die Produzentenstämme, die gegen pathogene Hautkeime wie *Propionibacterium acne*, Staphylokokken und Streptokokken wirksamen Lantibiotica Epidermin^[4] und

Tabelle 2. Wirkungen und potentielle Anwendungen von Lantibiotica.

Lantibioticum	Wirkung	Einsatzgebiet
Typ A		
Nisin [2, 3]	Bacteriocin gegen Gram-positive Bakterien (<i>Clostridium botulinum</i> , <i>Streptococci</i> , <i>Staphylococci</i>), kationisch, lytisch, Hemmer der Peptidoglycan-Biosynthese gegen <i>Propionibacterium acne</i> ($MHK < 0.125 \text{ mcg mL}^{-1}$) und Staphylokokken	Nahrungsmittelkonservierung, Malarialmittel (?)
Epidermin [4], Gallidermin [11]	Autolyse Gram-positiver Bakterien	Akne, Ekzeme, Folliculitis, Impetigo
Pep5 [9, 10]	gegen Staphylokokken	Bacteriocin
Mersacidin [8a]		Antibioticum, Immunsuppressor
Actagardine [8 b]	gegen Streptokokken, Inhibitor der Peptidoglykan-Biosynthese	Infektionen, Septen
Typ B		
Ancovenin [5]	Inhibitor des Angiotensin-Converting-Enzym (ACE)	Blutdruckregulation
Cinnamycin [7] (= Ro 09-0198 [6], Lanthiopeptin [12])	Inhibitor von Phospholipase A ₂ , ACE und HSV-1	Entzündungen, Blutdruckregulation, Immunadjuvans, Herpes simplex-Virus
Duramycin [7] (= Leucopeptin)	Inhibitor von Phospholipase A ₂	Antibioticum
Duramycin B, C [7d]	Inhibitor der Phospholipase A ₂	Entzündungen

Gallidermin^[11] produzieren, stammen interessanterweise aus Isolaten von menschlicher Haut oder Hühnerkämmen. Ihre Wirksamkeit gegen Akne ist vergleichbar mit der des Makrolidantibiotikums Erythromycin. Wird mit Makrolidantibiotika behandelt, kommt es rasch zur Resistenzentwicklung. Nebenwirkungen sind bei Epidermin und Gallidermin bisher keine bekannt. Somit ist das hochaktive Epidermin und sein Struktur-Analogon Gallidermin eine interessante Alternative zu den Vitamin-A-Derivaten und Erythromycin, insbesondere bei der Bekämpfung der jugendlichen Akne. Da Pep5- und Epidermin-Produzenten häufig auf menschlicher Haut gefunden werden^[10a], wird vermutet, daß sie zur gesunden Hautflora gehören und dort als natürlicher Schutz gegen pathogene Mikroorganismen wirken, die in den Folikelkanälen der Talgdrüsen Entzündungen verursachen können.

Über den Wirkort und die Wirkungsweise der meisten Lantibiotica ist auf molekularer Ebene noch wenig bekannt. Jedoch konnte das Prinzip (Mechanismus) der antibakteriellen Wirkungen von Pep5^[10], Nisin, Epidermin und Gallidermin durch biophysikalische Experimente an Membranen und durch Konformationsuntersuchungen mit 2D-¹H-NMR-Spektroskopie und Moleküldynamik-Simulationen (MDS) sowie Untersuchungen des Circular dichroismus (CD) verstanden werden. Die hohe bakterizide Aktivität von Pep5 konnte auf eine Depolarisierung der energetisierten bakteriellen Cytoplasmamembran^[13] und Induktion von Autolyse^[13g-j] zurückgeführt werden. Dabei wurden in intakten Zellen und künstlichen Membranen ab einem transnegativen Membranpotential von etwa 100 mV spannungsabhängige, kurzlebige Poren induziert^[13e], die variable Durchmesser bis zu 1 nm annahmen. Auch für Nisin^[13e] und Subtilin^[13j] sowie Epidermin und Gallidermin ließ sich eine analoge Wirkung nachweisen. Es ist aufgrund der hohen Spezifität der Lantibiotica gegen bestimmte Keime zu vermuten, daß neben der Porenbildung noch weitere Mechanismen an der antibiotischen Wirkung beteiligt sind. Insbe-

sondere dürfte eine ausgeprägte Korrelation zwischen Lipiddzusammensetzung der Membranen und der Wirkung der Lantibiotika bestehen, wie sie für die Duramycin^[7] nachgewiesen wurde^[7c-m]. Diese hemmen die Phospholipase A₂^[7d] und erhöhen ebenfalls die Membranpermeabilität^[7f]. Duramycinresistenz kann aus einer veränderten Lipiddzusammensetzung resultieren, z. B. durch Reduktion des Gehaltes an Diacylphosphatidethanolamin (PE)^[7e].

Die Gram-positiven Produzentenstämme sind gegen die von ihnen selbst produzierten Lantibiotika empfindlich. Sie entwickelten deshalb ein selbstschützendes Prinzip, das in das Kulturmedium sezerniert wird und das die Bakterien gegen ihr eigenes Produkt immun (resistant) macht^[14].

3. Strukturaufklärung der Lantibiotica

3.1. Nisin und Subtilin

Die Stereochemie der Lanthionine und verwandter Thioetheraminosäuren wurde in unserem Arbeitskreis chromatographisch und durch Messungen des Circular dichroismus untersucht^[15]. Die ungewöhnliche Aminosäure Lanthionin, wie auch Lysinoalanin (Tabelle 2), kann Peptidketten miteinander vernetzen. Beide Aminosäuren werden in Wolle und Nahrungsmitteln gefunden, wenn diese Alkalien oder Wärme ausgesetzt waren. Erstmals wurde das natürliche Vorkommen von Lanthionin in dem 1928 entdeckten Polypeptidantibioticum Nisin nachgewiesen (vgl. [3]). In den Pionierarbeiten von Gross wurde die komplizierte Struktur des pentacyclischen 34-Peptids 1971 aufgeklärt^[2], und kurz darauf wurde das strukturverwandte Subtilin publiziert^[16].

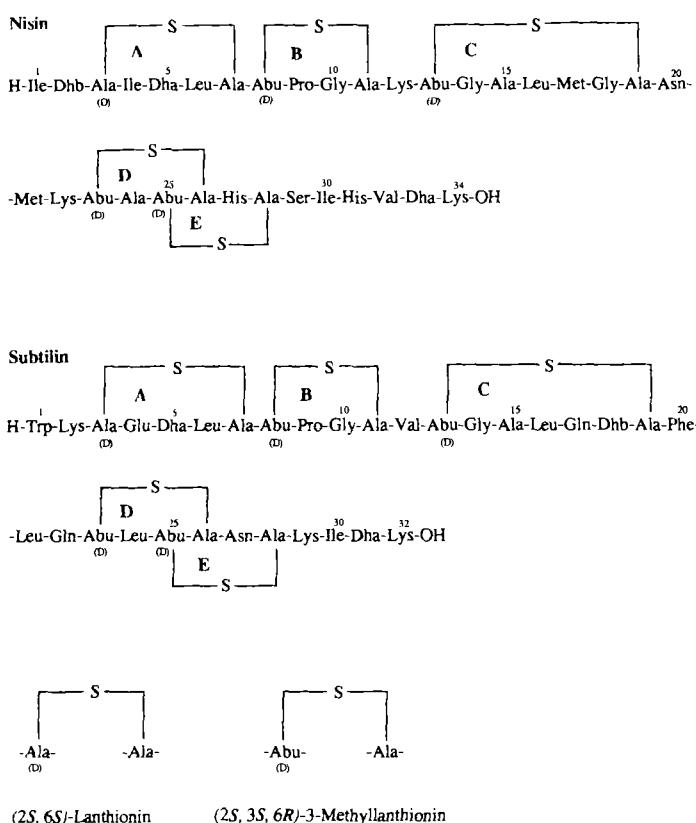


Abb. 1. Strukturen der heterodet pentacyclischen Lantibiotica Nisin [2] und Subtilin [17].

Diese heterodet pentacyclischen Polypeptide enthalten in identischen Positionen fünf Sulfidbrücken aus einem Lanthioninrest und vier 3-Methylanthioninreste sowie zwei Dehydroalanine und ein Dehydrobutyryl (Abb. 1).

Bei der Strukturaufklärung setzten Gross und Mitarbeiter vor und nach enzymatischen Spaltungen von Nisin^[16] sowie von Subtilin^[17] zwei verschiedene Methoden zur Spaltung der Sulfidbrücken ein: eine spezielle oxidative Spaltung der Sulfidbrücken und die reduktive Ringspaltung durch Entschwefeln mit Raney-Nickel. Letztere Methode führt zur Entstehung von je einem D- und einem L-Alaninrest aus meso-Lan, während MeLa zu L-Alanin und D- α -Aminobuttersäure umgesetzt wurde.

Die Detektion von α, β -Didehydroaminosäuren scheitert sowohl im Totalhydrolysat als auch beim Sequenzieren nach Edman, da Dha und Dhb dabei unter Bildung eines Peptid-säureamids und eines α -Ketoacylrestes zerfallen. Abbildung 2 illustriert diese H⁺-katalysierte Spaltung von Nisin

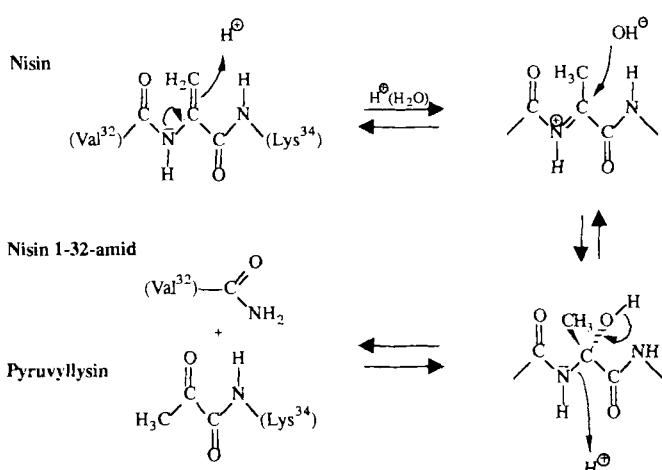


Abb. 2. Säurekatalysierte Spaltung von Nisin an Dihydroalanin (Dha) in Position 33 [16c] führt zu Peptidamid und Pyruvyllysin [16d].

an Dha³³, die zu ebenfalls aktivem Nisin(1-32)-amid führt; eine analoge Spaltung erfolgt auch an Dha⁵, aber nicht bei Dhb² von Nisin. Gross hat diese labile Peptidbindung genutzt, um eine interessante Peptidamid-Festphasensynthese auszuarbeiten, bei der ein harzgebundenes Dehydroalanin-Ankermolekül als säurelabiles Zwischenstufe und Amidstickstofflieferant dient^[16c, d]. Die Reaktion ist im übrigen reversibel, und die Reaktivität der Didehydroaminosäuren ist Ursache für die Bildung von Nisinoligomeren mit Molmassen bis 12000 Da^[16c]. Auch bei Pep5 wurden Dimere mit Molmassen um 7000 Da detektiert.

Neben der katalytischen Hydrierung der α, β -Didehydroaminosäuren benutzte Gross als weitere Schlüsselreaktion die Addition von Benzylthiol und Mercaptoethylamin an die Doppelbindungen von Dha und Dhb^[16, 17]. Nach unseren Erfahrungen verlaufen weder Entschwefelungen, noch Hydrierungen und Thioladditionen von Lantibiotica quantitativ. Umso höher ist die Leistung der Gruppe Gross zu würdigen, die ohne HPLC, Hochfeld-NMR-Spektroskopie und FAB-Massenspektrometrie (MS) Nisin und Subtilin richtig aufklärte, wie jetzt durch die Sequenzierung der Strukturgerne^[18, 19] endgültig bewiesen wurde.

Die Totalsynthese von Nisin wurde 1987 von der Arbeitsgruppe Shiba nach etwa zehnjährigen Vorarbeiten abgeschlossen^[20]. Wesentliche Merkmale sind die Dehydroalaninsynthese durch Hofmann-Abbau aus 2,3-Diamino-propansäureresten^[20c] (Abb. 3) und die Dehydrobutyryin-

3.2. Epidermin und Gallidermin

Eines der zentralen Probleme bei Strukturaufklärungen von Lantibiotica ist die sequenzspezifische Konfigurationszuordnung der beiden C_α-Atome aller *meso*-Lanthionin-

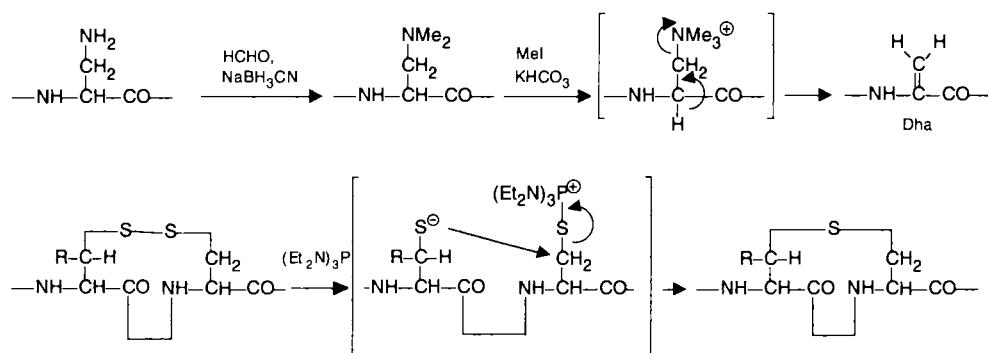


Abb. 3. Herstellung von Dihydroalanin (Dha) aus 2,3-Diaminobuttersäure und von Sulfidbrücken aus Disulfidbrücken bei der Nisin-Synthese [20]; R = H (Lanthionin); R = CH₃ (β -Methylanthionin).

synthese durch Dehydratisierung von Threoninresten mit dem wasserlöslichen 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid unter Cu¹Cl-Katalyse^[20a]. Die Sulfidbrücken wurden durch partielle Entschwefelung von Disulfidbrücken mit Tris(diethylamino)phosphoran in sequenzanalogen Cystinpeptiden hergestellt^[20d] (Abb. 3), eine Reaktion, die interessanterweise auch mit polymergebundenen Disulfidepeptiden durchführbar ist^[20e].

Der Gesamtaufbau von Nisin erfolgt aus fünf Fragmenten (Abb. 4). Die synthetischen Fragmente 1–12 und 22–34

und (2S,3S,6R)-3-Methylanthioninreste. Dies gelang uns bei der Untersuchung der Struktur von Epidermin^[4] durch vergleichende gaschromatographische Analysen an chiralen Glaskapillaren mit Chirasil-Val^[15a]. Ausgangspunkt der Strukturaufklärung war die präparative Herstellung einer Vielzahl von Fragmenten durch Kombinationen von enzymatischen und chemischen Abbauschritten. Ein entscheidender Schritt ist die tryptische Fragmentierung von Epidermin bei der ein wasserlösliches N-terminales Fragment P1 und ein wasserunlösliches C-terminales P2 entstand. Wie wir

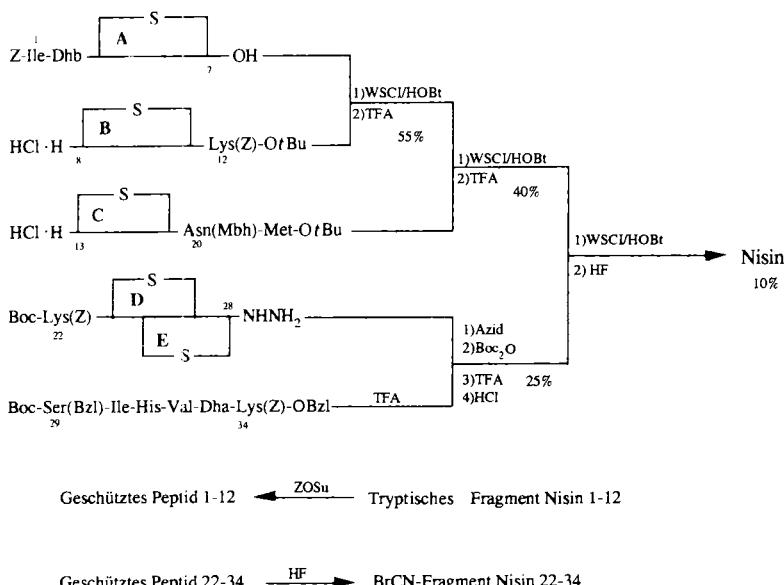


Abb. 4. Synthese von Nisin [20]. WSCI = wasserlösliches Carbodiimid; HOBT = Hydroxybenztriazol; TFA = Tri-fluoresigsäure; Boc₂O = Di-*tert*-Butylcarbonat; Mbh = Methoxybenzhydrol; ZOSu = *O*-Benzoyloxycarbonyl-*N*-hydroxysuccinimid; Z = Benzoyloxycarbonyl.

entsprachen dabei einem tryptischen und einem BrCN-Fragment, so daß ihre Identität durch Vergleich mit natürlichem Nisin überprüfbar war. Synthetisches Nisin war mit natürlichem in der antibakteriellen Wirkung, im HPLC-Chromatogramm, FAB-Massenspektrum und ¹H-NMR-Spektrum identisch. Anhand von enzymatischen und synthetischen Fragmenten konnte festgestellt werden, daß die Ringe A und B für die antibiotische Wirkung wichtig sind.

mit NMR-Spektroskopie und FAB-MS sowie über chemische Derivate herausfanden, entsteht als Folge der enzymatischen Spaltung der Lys-Dhb-Peptidbindung eine blockierende 2-Oxybutyrylgruppe am N-Terminus der Vorstufe des Fragmentes P2 (Abb. 5). N-terminal gebundene α,β -Dihydroaminoäuren Dha und Dhb sind instabil, sie addieren Wasser und desaminieren zu den α -Ketoacylresten. Im Gegensatz zu der säurekatalysierten Spaltung an Dha⁵ und

Dha³³ von Nisin (Abb. 2) entstehen bei der trypsinischen Spaltung keine Peptidamide, sondern Peptide mit Carboxy-C-Terminus (Abb. 5).

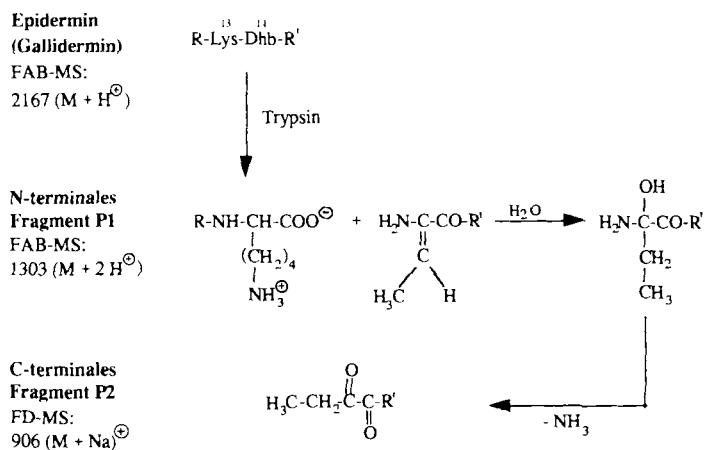


Abb. 5. Tryptische Spaltung von Epidermin [4] und Gallidermin (= [Leu⁶-Epidermin] [11] in die Fragmente **P1** und **P2** (vgl. Abb. 6 und 7).

Das N-terminale Fragment P1 (Abb. 6) ließ sich durch FD- und FAB-MS vor und nach der Entschwefelung sowie durch automatischen Edman-Abbau des entschwefelten Dodekapeptids 1–12 aufklären. Die Zuordnung der Schwefelbrücken in den Ringen A und B des Fragmentes P1 erfolgte aufgrund der FAB-Massenspektren und einer Lys-C-Endopeptidase-Spaltung des Rings 3–7^[4]. Bei der Aufklärung des N-acylierten und C-terminal amidierten Fragments P2 waren NMR-spektroskopische Hinweise wichtig sowie Produkte einer uneinheitlich verlaufenden Entschwefelung mit Raney-Nickel. Letztere lieferte das entscheidende Fragment mit C-terminalem L-Alanin-N-ethylamid (Abb. 6). Das aus diesem Befund ableitbare Strukturelement *S*-(2-Aminoethyl)-D-cystein (4-Thialysin) wurde nach Hydrierung von Epidermin mit Pd/C gaschromatographisch im Hydrolysat gefunden. Weitere Informationen wurden aus Fragmenten einer schonenden Partialhydrolyse mit 0.1 N HCl bei 93 °C erhalten, die alle massenspektrometrisch durch Endgruppenbestimmungen und Gaschromatographie (GC) an chiraler Phase untersucht wurden. Erstmals konnte so im Epidermin ein C-terminaler Cyclus mit *S*-Aminovinyl)-D-cystein als Baustein für ein Peptidamid aufgeklärt werden^[4].

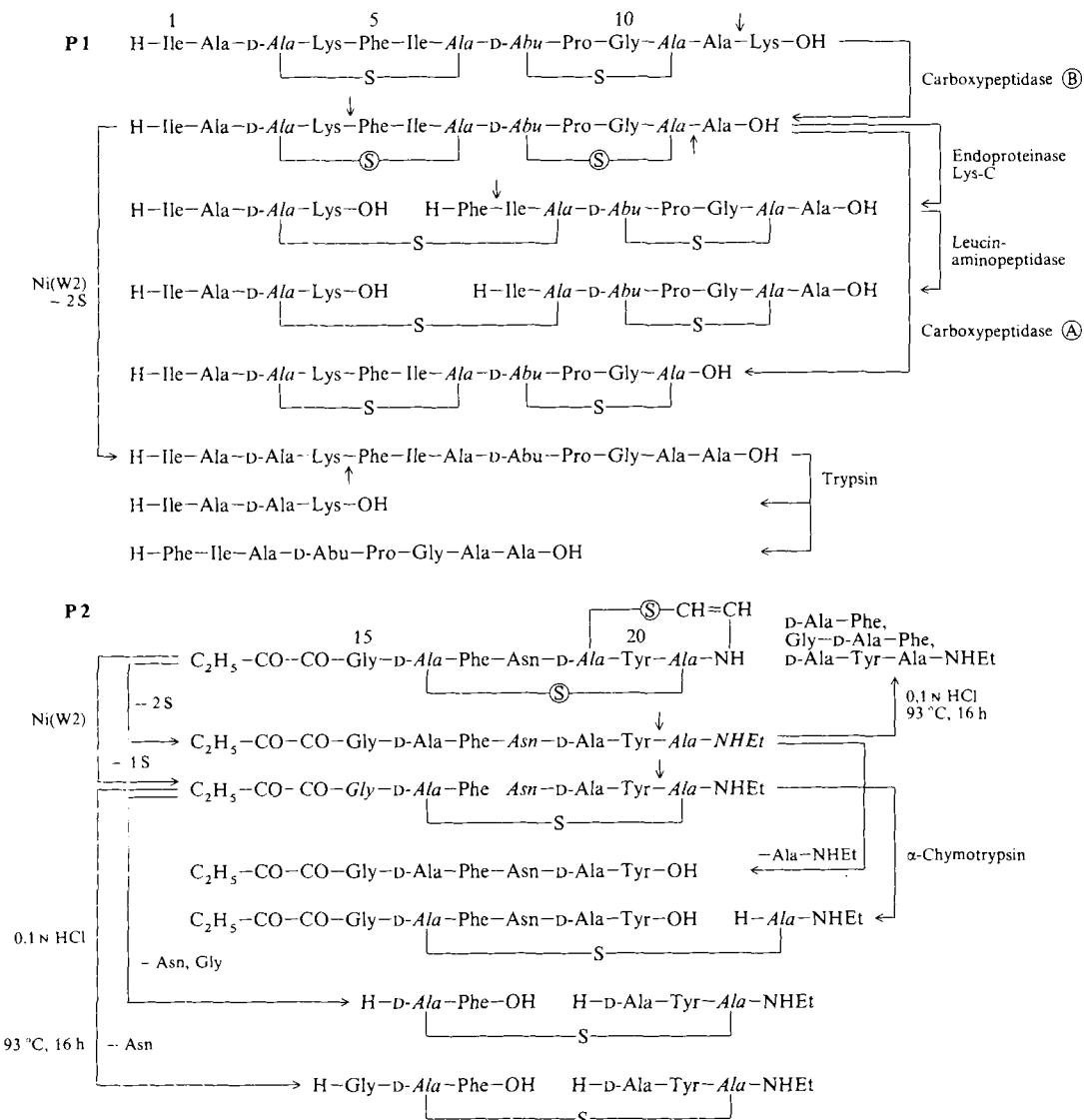


Abb. 6. Epiderminanalyse über präparativ isolierte Fragmente **P1** und **P2** des tetracyclischen 21-Peptidamids [4].

Die eindeutige Epiderminaufklärung erforderte viele chemische, enzymatische und instrumentelle Methoden. Bei der Aufklärung des von *Staphylococcus gallinarum* F16 produzierten Gallidermins^[11] konnten wir auf diese Erfahrungen zurückgreifen, setzten aber vorwiegend neuere Methoden ein. Mit FAB-MS wurde die Molmasse von Gallidermin bestimmt, und der N-terminale Teil konnte mit Ausnahme der Lanthioninbrücken bis zu Dhb¹⁴ am Gasphasensequenator(-sequenzanalysator) durchsequenziert werden. Der durch Trypsinspaltung gewonnene C-Terminus ließ sich mit Thermospray-LC-MS (Kombination aus Flüssigkeitschromatographie und Massenspektrometrie) eindeutig durch das Fragmentierungsmuster charakterisieren^[11]. Auch die komplexe Verknüpfung der Ringe C und D konnte anhand des Thermospray-Massenspektrums nachvollzogen werden. Die Verknüpfung über Lys¹³-Dhb¹⁴ an der tryptischen Spaltstelle ließ sich schließlich aus den Tochter-Ionen des FAB-Massenspektrums ableiten^[11]. Gallidermin ist somit [Leu⁶]-Epidermin (Abb. 7); trotz dieses geringen Unterschieds hat

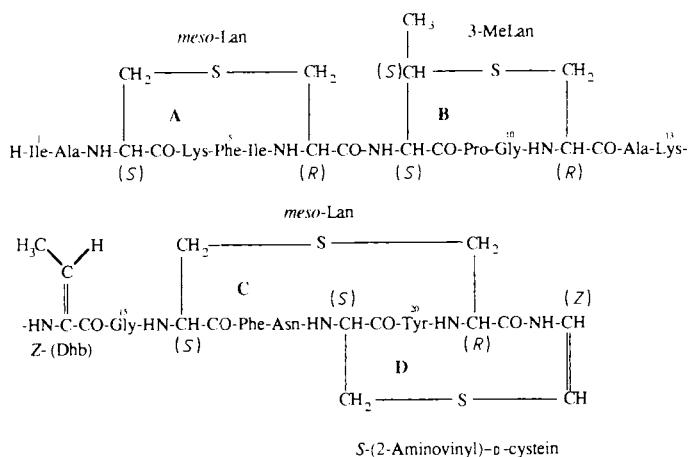


Abb. 7. Strukturen der Lantibiotica Epidermin und Gallidermin. Die tryptischen Spaltprodukte P1 und P2 entstehen durch Proteolyse der Peptidbindung zwischen den Resten 13 und 14 (vgl. Abb. 5). Epidermin hat Ile in Position 6, Gallidermin ist [Leu⁶]-Epidermin.

Gallidermin meßbar erhöhte antibiotische Aktivitäten gegen die an der Auslösung der Akne beteiligten Keime^[11a].

Die Lantibiotica Epidermin, Gallidermin (Abb. 7) und Pep5 (Abb. 8) lassen sich direkt aus der Kulturbreihe an das Adsorberharz XAD-1180 binden^[21a-c]. Nach Desorption und Entsalzung über Ionenaustauscher (IRC-50) wird im Falle von Epidermin oder Gallidermin reines Lantibioticum nach Feinreinigung durch RP-HPLC (Reversed Phase High Pressure Liquid Chromatography) erhalten. Gallidermin kann somit in analytisch einwandfreier Form für klinische Untersuchungen bereitgestellt werden^[21d].

3.3. Das Lantibioticum Pep5

Das Lantibioticum Pep5 wurde von *Sahl*^[10a] isoliert und ist mit 3488 Da (FAB-MS) das schwerste, bisher bekannte Lantibioticum^[9]. Aufgrund von sechs Lys und zwei Arg ist das tricyclische 34-Peptid extrem basisch. Da es zudem eine starke Neigung zur Dimerenbildung zeigt (vgl. Abschnitt 3.1), war die Strukturaufklärung besonders schwie-

rig. Pep5 enthält drei Dhb, zwei *meso*-Lan und ein (2S,3S,6R)-3-MeLan. Zudem ist es N-terminal durch einen 2-Oxobutyrylrest blockiert, der Dhb oder Thr der Präpeptidsequenz zuzuordnen ist.

Schlüsselreaktionen bei der Strukturaufklärung des stark basischen Lantibioticums waren enzymatische Spaltungen mit Chymotrypsin und Endoproteinase Arg-C (Abb. 8)^[9].

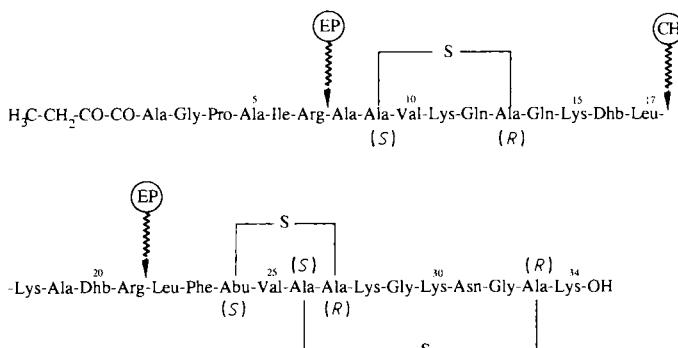


Abb. 8. Struktur und wesentliche enzymatische Spaltstellen des tricyclischen, N-terminal blockierten 24-Peptidantibioticums Pep5 [11]. Chymotrypsin (CH) spaltet das Lantibioticum Pep5 in CH1 (1–17) und CH2 (18–34); Endoproteinase Arg C (EP) spaltet CH1 in CA1 (1–7) und CA2 (8–17), und CH2 wird durch EP in CA3 (18–21) und CA4 (22–34) gespalten; neben einer 2-Methyllanthionin- und zwei Lanthioninbrücken befinden sich in Position 1 ein Oxobutyryl- (Oxb) und in Position 16 und 20 zwei Dehydrobutyryinreste (Dhb). Die Positionen 1, 16, 20 und 24 sind im Vorläuferprotein des Pep5 von vier Threoninresten besetzt (vgl. Abb. 20).

Es wurden vier in der HPLC einheitliche Fragmente gewonnen, bei denen insbesondere die Lokalisierung der Sulfidbrücken und der ungesättigten Aminosäurereste gelang. Schonende saure Hydrolysen ergaben bevorzugt Peptidbindungsspaltungen bei Gly³-Pro-Ala⁵ des N-terminalen Fragments CA1, das für Vergleichsanalysen durch chemische Peptidsynthese hergestellt wurde.

Mit Edman-Abbau von enzymatischen Fragmenten und vor allem von chemischen Derivaten der Fragmente konnte ein 34-Peptid-Sequenz abgeleitet werden (Abb. 8). Dabei bewährte sich eine Umwandlung der beiden Dhb-Reste in S-Benzyl-3-methylcystein durch Addition von Benzylthiol. Interessanterweise wird auch der blockierte N-Terminus nach der Thiolbehandlung der Sequenzierung zugänglich, und mit diesem Additionsprodukt konnte im Gasphasensequenator die Sequenz 1–22 bestimmt werden, wobei an allen Sulfidbrücken und den ursprünglichen Dhb-Resten keine Phenylthiohydantoin(Pth)-Aminosäure detektiert wurde.

3.4. Duramycine

Gross^[7a] publizierte 1977 unter Vorbehalt die Strukturen von Cinnamycin^[7b] und Duramycin^[7c], die sich nur durch einen Arg/Lys-Austausch in Position 2 unterscheiden. Die in^[2b, 7b,c] publizierten Strukturen enthalten falsche Aminosäuren und teilweise falsche Ringe. Nach neueren Untersuchungen passen diese beiden Lantibiotica in das allgemeine Strukturmuster der Duramycine B und C^[7d], zu denen auch die Wirkstoffe Ro 09-01989^[6] (= Cinnamycin^[7], = Lanthiopeptin^[12]) sowie Leucopeptin^[22] (= Duramycin^[7]) und Ancovenin^[5] gehören (Tabelle 3).

Tabelle 3. Klassifizierung der Lantibiotica nach Ladungen, Konformation, Wirkungsweise.

Lantibioticum	Ladungen			Eigenschaften
	positive	negative	netto	
Typ A	Pep5	8	1	7+
	Nisin	4	1	3+
	Subtilin	4	2	2+
	Epidermin	3	0	3+
	Gallidermin	3	0	3+
	Mersacidin	1	2	0
	Actagardine	1	2	1-
Typ B	Cinnamycin	3	2	1+
	Duramycin A	3	2	1+
	B	3	2	1+
	C	2	2	0
	Ancovenin	2	2	0

Bei den Strukturaufklärungen von Ancovenin^[5] und Lanthiopeptin^[12] wurde die reduktive Entschwefelung (H_2/Pd , 10 kp cm⁻², 50 °C) eingesetzt. Durch diese Ringspaltung und unter Anwendung einer prolinspezifischen Endopeptidase konnten sequenzierbare Fragmente erhalten werden, die auch die Festlegung der Ringpositionen des Lysinoalanins erlaubten (Abb. 9). Die Gruppe Shiba stellte fest, daß

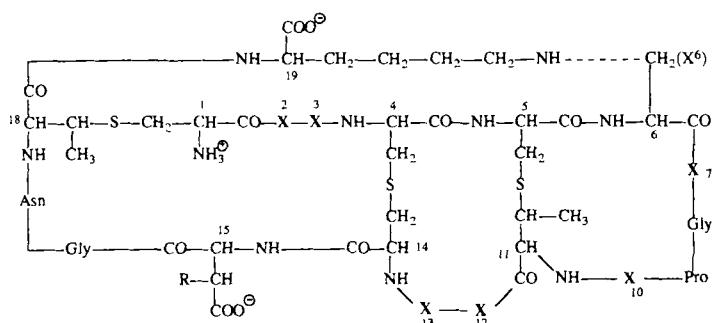


Abb. 9. Allgemeine Struktur der Lantibiotica vom Subtyp B (Duramycine) nach A. Fredenhagen et al. [7d]. Aminosäuren X und Rest R siehe Tabelle 4.

Tabelle 4. Aminosäuren X der allgemeinen Struktur vom Subtyp B (siehe Abb. 9).

Duramycin = Leucopeptin	Cinnamycin = Ro 09-0198	Dura- mycin B [d] = Lanthiopeptin	Dura- mycin C [d]	Anco- venin
X ²	Lys	Arg	Arg	Ala
X ³	Gln	Gln	Gln	Val
X ⁶	Ala[a]	Ala[a]	Ala[a]	Asn
X ⁷	Phe	Phe[c]	Phe	Gln
X ¹⁰	Phe	Phe[c]	Leu	Dha[b]
X ¹²	Phe	Phe[c]	Phe	Tyr
X ¹³	Val	Val	Val	Phe
R	OH	OH	OH	Leu

[a] Ala verbrückt mit Lys¹⁹ als Lysinoalanin. [b] α,β -Dihydroalanin, nicht verbrückt mit Lys¹⁹. [c] L-Phe in Cinnamycin. [d] Strukturvorschläge [7d].

die revidierte Struktur von Ro 09-0198^[6] mit Lanthiopeptin^[12a] identisch ist; sie wiesen an anderer Stelle^[12c] auch auf dessen mögliche Identität mit dem bekannten Cinnamycin hin und postulierten, daß das lysinhaltige Duramycin dasselbe Ringsystem wie Ro 09-0198 (= Lanthiopeptin) haben sollte (Zitat 10 in^[12a]). Die Autoren^[12b] ordneten ihren

Lanthiopeptin-Produzenten L337-2 als *Streptovorticillium cinnamoneum* ein, während Cinnamycin von *Streptomyces cinnamoneus* produziert wird^[7a]. Somit ist Cinnamycin noch zweimal und Duramycin noch einmal wiederentdeckt worden (vgl. Tabelle 1).

3.5. Klassifizierung der Lantibiotica nach Strukturmerkmalen

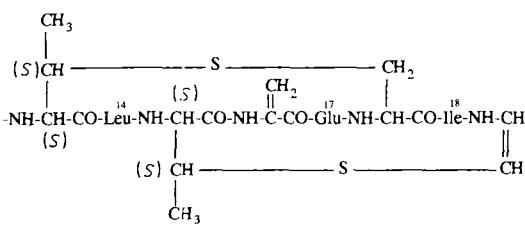
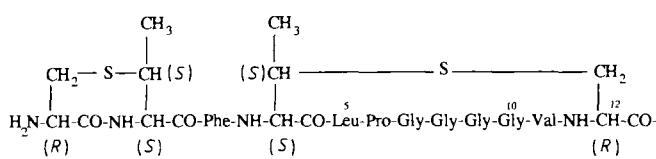
Die bisher besprochenen Lantibiotica Nisin, Subtilin (Abb. 1), Epidermin, Gallidermin (Abb. 7) und Pep5 (Abb. 8) haben eine Reihe von Gemeinsamkeiten, die ihre Einordnung in einen Subtyp A mit Nisin als typischem Vertreter rechtfertigt (Tabelle 1). Lantibiotica des Subtyps A sind stark kationische Peptide mit zwei bis sieben positiven Ladungen und Molmassen über 2100 mit Ausnahme von Mersacidin und Actagardine (Tabelle 3, Abb. 10). Sie weisen trotz unterschiedlicher Länge deutliche Strukturverwandtschaft durch Sequenzhomologie und Ähnlichkeit ihrer Ringstrukturen auf. Insbesondere sind die Thioetheraminosäuren immer N-terminal D- und C-terminal L-konfiguriert, wiederum mit den Ausnahmen Mersacidin und Actagardine. Neben den ungewöhnlichen Aminosäuren Lan und MeLan sind nur Dha und DhB zu finden, mit Ausnahme von Epidermin und Gallidermin, die C-terminal durch einen zusätzlichen Modifikationsschritt abgewandelt sind^[4, 11]. Die Produzentenstämme der Lantibiotica des Subtyps A sind drei *Staphylococci*, ein *Streptococcus* und zwei *Bacilli* (Tabelle 1). Lantibiotica des Duramycin-Typs (Subtyp B) werden vorwiegend von Streptomyzeten (Tabelle 1) produziert. Sie haben eine Molmasse von weniger als 2100 Da und eine besonders hohe Ringhomologie (Abb. 9). Im Gegensatz zu den nisinähnlichen Lantibiotica des Subtyps A sind sie maximal einfach positiv geladen (Tabelle 3).

Neben zwei Sulfidbrücken aus MeLan und einer Sulfidbrücke aus Lan in stets homologen Positionen ist eine Lysinoalanin-Brücke, die das C-terminale Lys¹⁹ mit Position 6 verbindet, ein besonderes Merkmal der Duramycine (Abb. 9). Diese Brücke ist nur im Ancovenin nicht geschlossen, das in Position 6 noch einen Dehydroalaninrest hat. Nicht nur der Ringschluß von 19 nach 6, sondern insbesondere auch die Schwefelbrücke von 1 nach 18 geben den Lantibiotica vom Typ B (Duramycin) eine kompaktere „globuläre“ Struktur, verglichen mit den mehr schlank und schraubenartig gebauten Lantibiotica vom Typ A (Nisin) (vgl. Abschnitt 4). Alle Duramycine weisen *erythro*-3-Hydroxyasparaginsäure in Position 15 auf, mit Ausnahme von Ancovenin, bei dem diese Aminosäure nicht hydroxyliert ist. Weitere Gemeinsamkeiten innerhalb der Subtypen A und B werden im Zusammenhang mit der Konformation und vor allem der Biosynthese der Lantibiotica diskutiert.

3.6. Mersacidin und Actagardine

Über das jüngst mit 2D-¹H-NMR-Spektroskopie aufgeklärte Mersacidin^[8a] ist noch nichts bezüglich seiner Konformation oder Biosynthese bekannt. Es fällt schwer dieses neutrale Lantibioticum (Abb. 10) einem der beiden in den Tabellen 1 und 3 aufgeführten Subtypen zuzuordnen. Einerseits hat es wie der Duramycin-Typ B eine Molmasse unter

Mersacidin



Actagardine

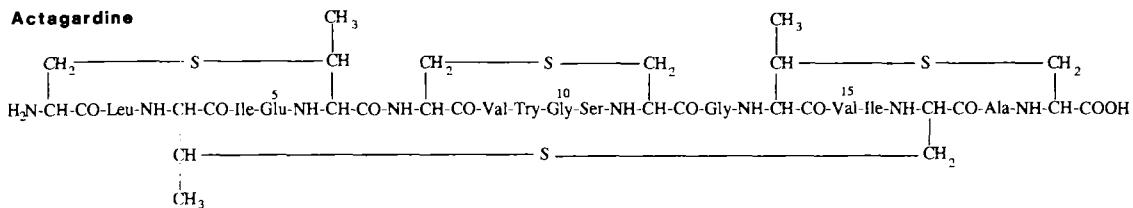


Abb. 10. Vorgeschlagene Strukturformeln der tetracyclischen Lantibiotica Mersacidin [8a] und Actagardine [8b].

2100 Da und keine kationischen Eigenschaften, andererseits fehlt die für Duramycin typische Kopf-Schwanz-Verknüpfung über Sulfid- und Aminbrücken. Da es C-terminal durch Ringschluß mit der Aminogruppe von Z-konfiguriertem S-Aminovinylcystein amidiert ist, kann man es eher mit Epidermin oder Gallidermin vergleichen. In die Gruppe A paßt auch der Mersacidin-Produzent, eine *Bacillus*-Spezies, sowie das Ringbildungsmuster mit Ausnahme der ungewöhnlichen MeLan-Brücke von Position 1 nach 2.

Noch schwerer fällt die strukturelle Einordnung des gegen Streptokokken wirksamen Actagardine, dessen Struktur durch 2D-¹H-NMR-Spektroskopie als ein heterodet tetracyclisches 19-Peptid aufgeklärt wurde^[8b]. Actagardine ist der jetzt empfohlene Name für ein früher Gardimycin genanntes Antibioticum^[8c-e]. Das publizierte Ringmuster besteht aus einer Lan- und drei MeLan-Brücken. Im Gegensatz zu den Typ-A-Lantibiotica ist Actagardine sauer und stark hydrophob. Am Actagardine konnte gezeigt werden, daß sich ein Lantibioticum durch geeignete chemische Derivatisierung zu in vitro und in vivo stärker antibiotisch wirksamen Derivaten umformen läßt^[8c].

4. Konformationsstudien

Verschiedene Arbeitsgruppen untersuchen zur Zeit Lantibiotica NMR-spektroskopisch auf ihre Konformation, hauptsächlich Nisin, Gallidermin und Epidermin, Ro 09-0198, Ancovenin und Pep5. Dabei wird durch die Extraktion strukturrelevanter Parameter wie Kopplungskonstanten, NOE-Effekte (Kern-Overhauser-Effekt) und Temperaturabhängigkeiten aus 1D- und 2D-Experimenten eine experimentelle Basis für die Berechnung der Molekülgeometrien geschaffen. Eine Konformationsanalyse von Lantibiotica ist trotz dem polycyclischen und damit rigide erscheinenden

Grundgerüst nicht einfach. Die Sequenzzuordnung stößt aufgrund der starken Überlappung der C₂H- und besonders der C_βH-Protonen der 3-4 Lan- oder MeLan-Brücken auf schwerwiegende Probleme. Dies kann speziell bei der vollständigen Sequenzierung unter ausschließlicher Verwendung von NMR-Spektroskopie zu Fehlinterpretationen führen, wie das Beispiel Ro 09-0198 zeigt^[6]. Daß auf zusätzliche Informationen aus chemischen Untersuchungen und Synthesen auch bei wesentlich kleineren Naturstoffen nicht verzichtet werden sollte, demonstrierten Schmidt et al.^[23] gleich an mehreren Cyclopeptiden. Von keiner der Lantibiotica-Konformationsanalysen liegt bisher eine ausführliche Publikation vor. Es zeichnet sich aber ab, daß die Lantibioticagefäße keineswegs so rigide sind wie ursprünglich angenommen wurde und daß Austauschprozesse die Ermittlung der

Konformation in Lösung erschweren. Trotzdem lassen sich aus den vorliegenden Berichten bereits mehrere grundlegende Schlüsse über den groben Aufbau der verschiedenen Lantibiotica-Typen ziehen.

4.1. Konformation von Nisin

An der Nisinkonformation arbeiten mehrere Arbeitsgruppen, wobei drei Gruppen in Holland, USA und England ähnliche Fortschritte gemacht haben. Publiziert wurde bislang die sequenzspezifische Zuordnung der ¹H-NMR-Signale abgeleitet aus 400- oder 600 MHz-2D-Experimenten (DQF-COSY, TOCSY, NOESY) in H₂O/D₂O^[24]. Eine Analyse der NOE-Daten zeigte dabei für den N-terminalen Teil von Nisin eine definierte Orientierung der Ringe A und B. So zeigt Pro⁹ des Rings B in Richtung Ring A, und die Seitenketten der Methionine 17 und 21 sind einander zugekehrt. Vermutlich bildet Nisin damit im N-Terminus eine amphiphile Schraube ähnlich wie Epidermin und Gallidermin (vgl. Abschnitt 4.2). Eine helixartige Struktur kann auch aufgrund der biophysikalischen Messungen der durch Nisin induzierten Ionenkanäle^[10c] erwartet werden, wie im folgenden Abschnitt gezeigt wird.

Chan et al.^[25] konnten NMR-spektroskopisch zwei saure Abbauprodukte von Nisin aufklären sowie auch eine sequentielle Signalzuordnung treffen. Das um zwei Aminosäuren C-terminal verkürzte Nisin 1-32-amid (vgl. Abb. 2) hat eine dem nativen Nisin 1-34 vergleichbare antimikrobielle Aktivität, während die zusätzliche Wegnahme von Dha⁵ oder Ring A zum Aktivitätsverlust führt^[25]. Palmer et al.^[26] berichten von einer vergleichenden NMR- und MDS-Studie der Konformation der separaten Ringe A-E und der des gesamten Nisins. Die Konformationen der separierten Ringe sollen denen des nativen Nisins sehr ähnlich sein.

4.2. Konformation der Epidermine

Untersuchungen zur Konformation der beiden Lantibiotica-Analoga mit Leu⁶/Ile-Austausch wurden in Wasser, Dimethylsulfoxid und vor allem in Trifluorethan/Wasser (9:1) mit 2D-¹H-NMR-Spektroskopie bei 500 MHz durchgeführt^[27]. Über vorläufige Ergebnisse wurde kurz berichtet^[28].

Interproton-Abstände aus 190 NOEs (NOESY mit verschiedenen Mischzeiten; vgl. Abb. 11 und 12), Diederwinkel aus Kopplungskonstanten (*J*-aufgelöstes 1D-DQF-COSY) und potentielle H-Brücken-Donoren aus Temperaturabhängigkeiten der Amidprotonen dienten als experimentelle Basis für MDS-Untersuchungen zur Ableitung der dominierenden Konformation in lipophiler Umgebung (Abb. 13). Vergleichend dazu wurden die Konformationen des N-terminalen Fragments (1–13) und des Gesamt moleküls in DMSO und in Wasser untersucht. Speziell der C-Terminus weist in DMSO eine starke Signalverbreiterung auf, die auf Austauschprozesse durch Spuren von in DMSO vorhandenem Wasser zurückzuführen sind. In allen Lösungsmitteln liegen schraubenförmige Konformationen (keine regulären Helices) vor. Die Schraubenkonformation, die mit allen experimentellen Daten der 2D-NMR-Messungen im Einklang ist, bleibt bei der MDS-Untersuchung erstaunlich stabil (Abb. 13). Bei solvensabhängigen NMR-Messungen treten

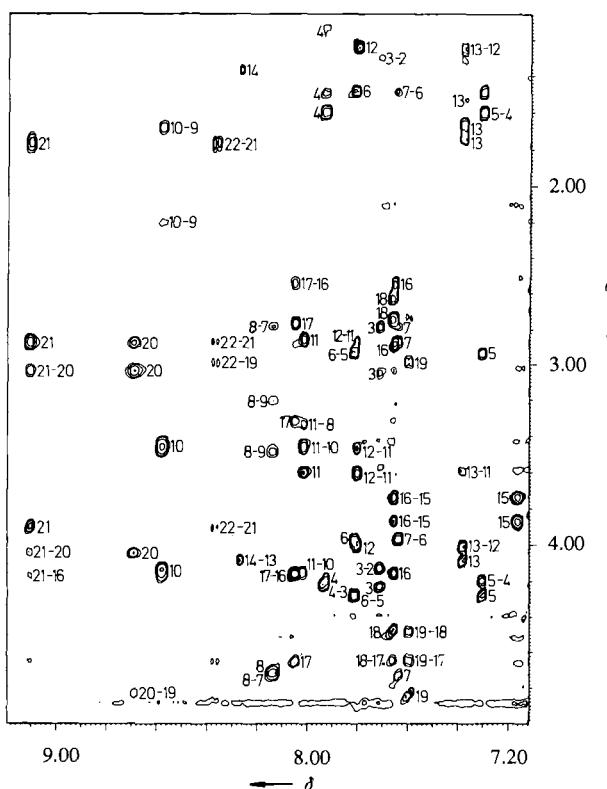


Abb. 12. 500 MHz-¹H-NMR-NOESY-Spektrum von Gallidermin ($t_M = 200$ ms, TFE/H₂O (9:1)): Der Teilbereich zeigt konformationelle NOE-Effekte zwischen den Amidprotonen und CH₂- sowie Seitenkettenprotonen.

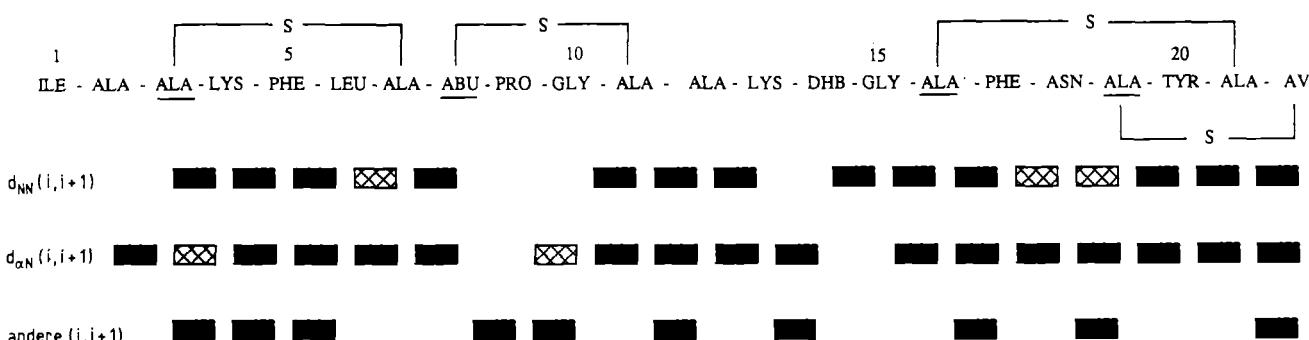
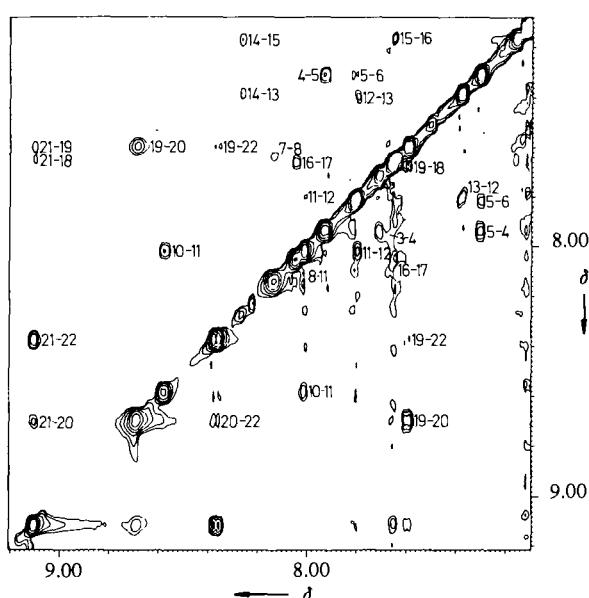


Abb. 11. Oben: 500 MHz-¹H-NMR-NOESY-Spektrum mit einer Mischzeit von $t_M = 200$ ms von Gallidermin in Trifluorethan/Wasser (9:1). Der Teilbereich zeigt NH_i-NH_{i+1}-Kontakte, die bei helikalen Anordnungen typischerweise auftreten. Unten: Sämtliche sequenziellen Kontakte sind hier zusammengefaßt.

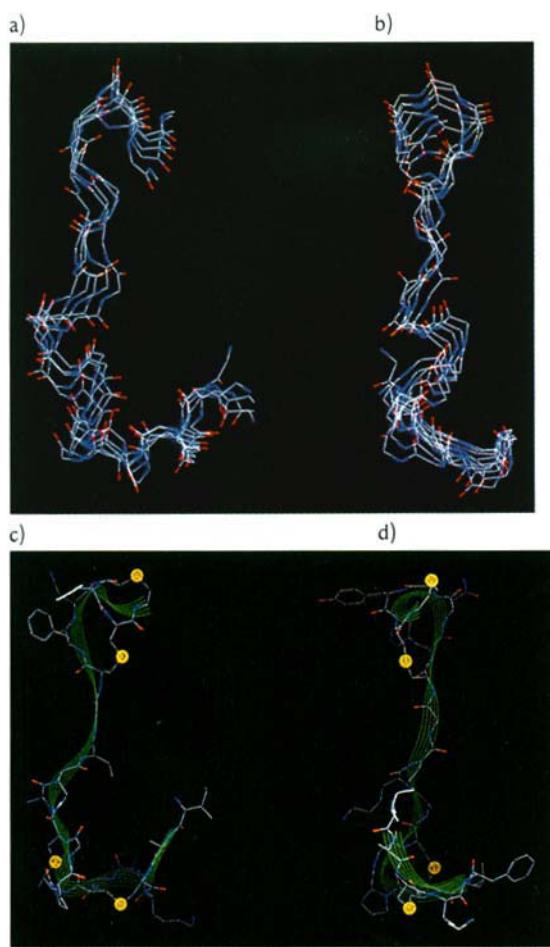


Abb. 13. Darstellung der Konformation von Gallidermin (vgl. Abb. 7) nach einer Moleküldynamik-Simulation auf der Basis von aus 2D-NMR-Messungen abgeleiteten Konformationsparametern. a) und b) orthogonale Darstellung von fünf konvergierenden Strukturen (nur Rückgrat-Atome: rot = O, blau = N, weiß = C, hellblau = H); c) und d) Rückgrat als Bandstruktur (grün) mit Sulfidringen (gelb = S) und Seitenketten.

Übergang in die langgestreckte Helix in Trifluorethanol auf 75 Debye vergrößert. Die Struktur von Gallidermin in Wasser wird von uns zu MDS-Studien verwendet, mit deren Hilfe trypsininstabile Analoga entwickelt werden (Abb. 14).

4.3. Konformation von Pep5

Für das tricyclische Lantibioticum Pep5 mit zwei α,β -Di-dehydroaminoäuren konnten wir durch CD-Messungen in lipophiler Umgebung das Vorliegen einer helikalen Struktur nachweisen. Diese bildet sich z. B. in Trifluorethanol (TFE), anderen Alkoholen und in Wasser nach Zusatz von Natriumdodecylsulfat (SDS). Nach NMR-Untersuchungen in TFE und H_2O ist dabei im erstgenannten Lösungsmittel besonders der Bereich ohne Ringe 14–22 (Abb. 8) helikal, wie die in diesem Sequenzabschnitt auftretenden starken NH–NH-Kontakte zeigen. Untersuchungen zur Konformation von Pep5 in TFE und Wasser werden zur Zeit von uns mit NMR-Spektroskopie und MDS durchgeführt.

4.4. Konformation des Duramycin-Typs B

Die durch detaillierte NMR-Untersuchungen bestimmte Konformation des tetracyclischen 19-Peptidantibioticums

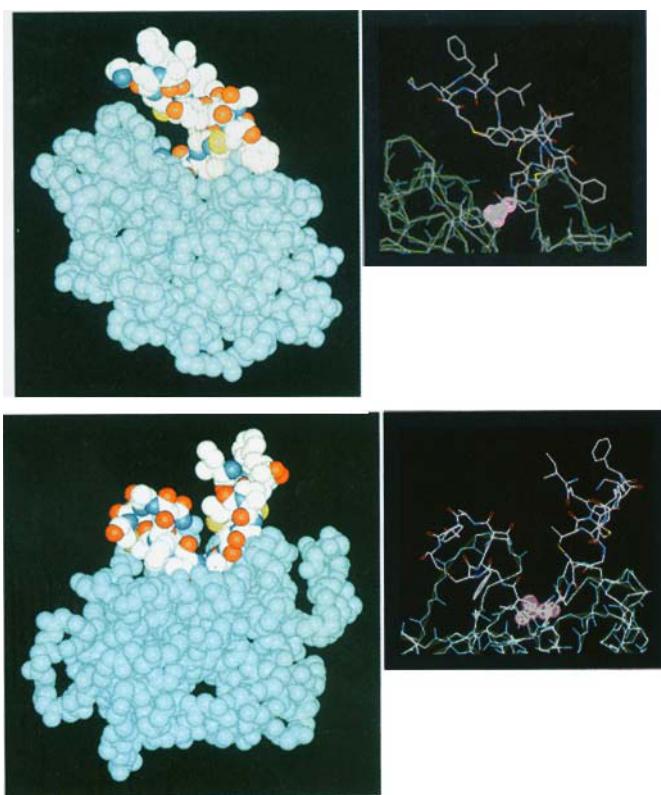


Abb. 14. Modell der Gallidermin-Trypsin-Interaktion. Trypsin (blaugrün) spaltet Gallidermin an Lys¹³-Dhb¹⁴ (Atome der Spaltstelle in lila; vgl. Abb. 6–8). Das Modell wurde mit Distanzgeometrie-Moleküldynamik-Simulationen (DGEOM, Amber) berechnet. Gallidermin nimmt dabei eine geknickte Konformation an und verhält sich bei der Einpassung in die Enzymspalte ähnlich dem Trypsin-Inhibitor BPTI (bovine pancreatic trypsin inhibitor). Auf der Basis dieses Interaktionsmodells lassen sich trypsininstabile Analoga konstruieren.

Ro 09-0198 (= Cinnamycin, = Lanthiopeptin) in Lösung^[6] kann als Leitstruktur für MDS-Untersuchungen aller Lantibiotica vom Duramycin-Typ B (Tabellen 1 und 3) dienen. Das Molekül Cinnamycin weist in DMSO eine kompakte, fast globuläre Struktur auf^[6]. Die hydrophileren Aminosäuren sind dabei auf der einen Seite, die lipophilen Aminosäuren einschließlich der drei Phenylalanine auf der anderen Molekülhälfte lokalisiert. Der natürliche Austausch innerhalb der Lantibioticareihe des Typs B (Abb. 9), beispielsweise Lys²/Arg, Gln³/Asn, Phe⁷/Tyr, Phe¹⁰/Leu, Phe¹²/Trp, ändert wenig an dieser Konformation; es zeigen sich aber Unterschiede in den biologischen Eigenschaften^[7]. Der Sprung vom Duramycin C^[7d] zu Ancovenin^[5] ist wesentlich größer, weil dort die Lysinoalaninbrücke fehlt und in Position 6 ein ebenfalls konformationseinschränkender Dehydroalaninrest sitzt.

Interessanterweise zeigt Cinnamycin analoge inhibitorische Eigenschaften auf das Angiotensin-Converting-Enzym (ACE)^[6b], wie sie für Ancovenin^[5] berichtet wurden. Offensichtlich stört der vierte Ring im Ro 09-0198 die Bindung an das Enzym nicht; leider liegen keinerlei vergleichbare Daten vor. Welchen Strukturelementen eine Relevanz für die Wirkung als ACE-Inhibitor zukommt, ist somit noch unklar. Über die Ancovenin-Konformation in DMSO wurde nur in einer Kurzmitteilung informiert^[5b]. Demnach zeigt Ancovenin in DMSO ähnlich wie Cinnamycin eine kompakte Konformation mit amphiphilem Charakter.

Die antibiotische Wirkung der Duramycine dürfte auf Interaktionen mit Membranbestandteilen zurückzuführen sein, wie Studien an duramycinresistenten *Bacillus*-Stämmen zeigten^[7e-m]. Duramycine und Cinnamycin sind potente Inhibitoren von menschlicher Phospholipase A₂, deren Wirkung im mikromolaren Bereich liegt^[7d]. Auch bei der Enzym-Inhibitor-Wechselwirkung spielt sicher die Amphiphilie und vermutlich die Membrangängigkeit der Duramycine eine entscheidende Rolle.

5. Die Biosynthese der Lantibiotica

5.1. Lantibiotica entstehen aus Vorläuferproteinen

Das spannendste Kapitel in der Geschichte der Lantibiotica-Forschung ist zweifellos die Biosynthese dieser Antibiotica. *Hurst*^[3] und *Ingram*^[30] fanden heraus, daß Inhibitoren der Proteinbiosynthese die Nisinproduktion einer Suspension von *Streptococcus lactis* hemmen. *Hurst* konnte plausibel machen, daß nach Zugabe basischer Peptidisolale aus einem Nichtproduzentenstamm zu einem Wildtyp-Zellextrakt Nisin gebildet wurde. Dies waren die ersten experimentellen Hinweise, daß Nisin nicht über den für andere Peptidantibiotica-Biosynthesen typischen Multienzym-Thiotemplat-Mechanismus^[31], sondern über ribosomal synthetisierte Precursorproteine^[3, 30] synthetisiert wird. *Ingram* zeigte durch Einbau von radioaktiv markiertem Cystein, Threonin und Serin, daß diese Aminosäuren Vorstufen von Lanthionin und 3-Methyllanthionin in Nisin sind. Auch für Subtilin konnte über markiertes [³⁵S]Cystein gezeigt werden, daß inaktive Rohisolale von Precursorproteinen sich in aktives Subtilin überführen lassen^[32]. Ein Subtilinprecursor wurde mit Anti-Subtilin-Antiserum immunpräzipitiert^[32, 33], jedoch nicht näher charakterisiert. Hinweise auf eine plasmidkontrollierte Biosynthese von Nisin kamen zuerst von *Kazak* et al.^[33].

Neben der Strukturaufklärung von Epidermin^[4] hat uns dessen Biosynthese interessiert. Beim Epidermin gelang ebenfalls der Nachweis der ribosomalen Biosynthese und die Blockierung der Produktion des Antibioticums durch Zugabe von Inhibitoren der Protein- und RNA-Synthese^[34]. Beim damaligen Wissenstand war unklar, ob die Lantibiotica durch Spaltung von größeren Proteinen entstehen oder ob sie über ein ganz spezielles Biosynthesesystem durch eigenständige Strukturgene, in derselben Weise wie Hormone aus Präpeptiden, aufgebaut werden. Wir hatten bereits 1985 erstmals explizit die Aminosäuresequenzen der Vorläuferpeptide der Lantibiotica Nisin, Subtilin und Epidermin postuliert, und wir versuchten, ein Vorläuferpeptid für Epidermin zu isolieren^[4, 29].

5.2. Prälantibiotica und ihre Strukturgene

Wir nahmen einen ribosomalen Aufbau eines Proepidermins an, das nachfolgend enzymatisch an Serin und Threoninresten dehydratisiert wird (Abb. 15)^[4]. Anschließend sollten an vier der α, β -Didehydroaminoäuren vier Cystein-Thiolgruppen stereospezifisch und unter Sulfidringbildung addieren. Unter der Annahme dieser Reaktionsabfolge und dem sequenzspezifischen Nachweis der C.-Konfiguration

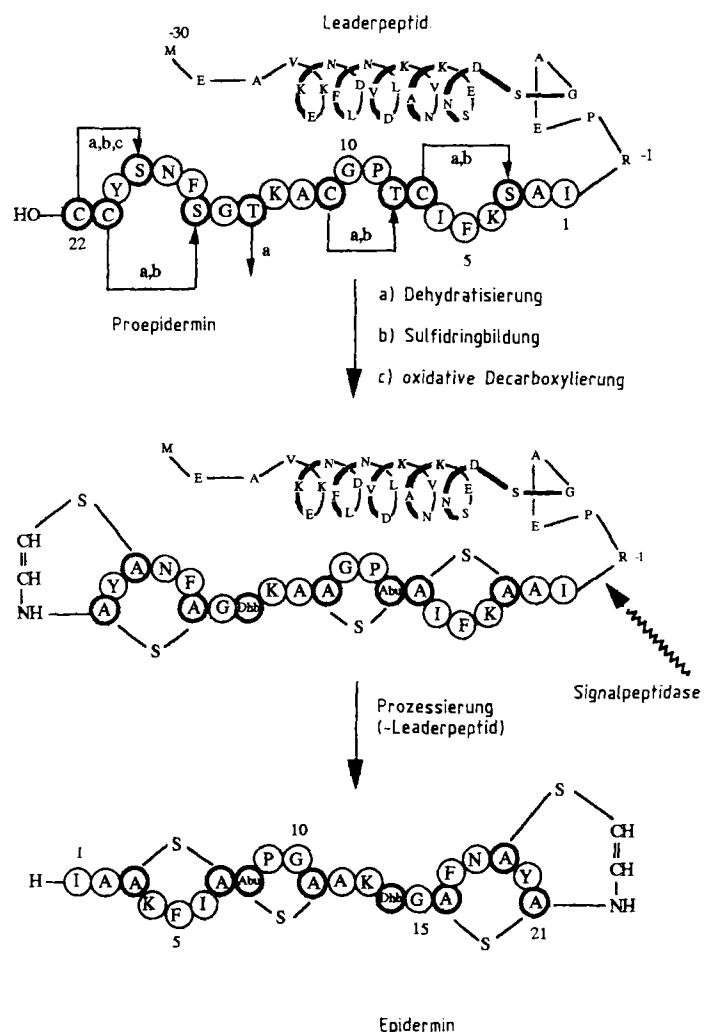


Abb. 15. Postulierte [4, 29] und bewiesene [1] Abfolge der Biosynthese von Epidermin über Modifikationen des Vorläuferproteins Präepidermin (Aminosäuren im Einbuchstabencode).

der Lan- und MeLan-Reste konnten wir ein Proepidermin postulieren, das an den resultierenden Lanthioninhälften mit D-Konfiguration ($\equiv S$) die Precursoraminoäuren L-Serin für *meso*-Lanthionin und L-Threonin für (2S,3S,6R)-3-Methylanthionin trägt. Die C-terminale Hälfte der Sulfidbrücken mit L-Konfiguration ($\equiv R$) muß dann aus L-Cystein stammen. Die Konfiguration der C_a-Atome von L-Ser- und L-Thr-Resten im Prolantibioticum kehrt sich somit bei der Umwandlung in das Lantibioticum um. Speziell beim Epidermin bleibt ein α,β -(Z)-Didehydrobutyryinrest (aus Threonin) in der Mitte des Moleküls übrig, der kein weiteres Cystein zur Addition findet. Zudem postulierten wir noch eine weitere spezielle enzymatische Modifikation bei der Epiderminsynthese, bei der am C-Terminus das ungewöhnliche cyclische Vinylamid entsteht (Abb. 6 und 7). Unter Annahme eines weiteren C-terminalen Cys²², das nach Addition seiner Thiolgruppe an Dha¹⁶ oxidativ decarboxyliert wird, läßt sich der in N δ -amidgebundene Baustein S-(2-Aminovinyl)-D-cystein in Position 19 erklären^[4, 29] (vgl. Abb. 17).

Es war völlig unklar, in welcher Form man das Prälanthanibioticum suchen sollte: verbunden mit einem Leaderpeptid, als Segment eines Proteins, als freies oder membranständiges Peptid, unmodifiziert oder schon teilweise modifiziert. Deshalb wurden mehrere Strategien zur experimentellen Aufklä-

rung der Lantibiotica-Biosynthese entwickelt. Zwei experimentelle Ansätze, nämlich die direkte Isolierung basischer Precursorproteine sowie der Nachweis von Prolantibiotica mit Antipeptid-Antikörpern, waren bei Präepidermin lange ohne Erfolg. Beide Methoden führten jedoch vor kurzem bei Prä-Pep5 in Kooperation mit Sahl zum Ziel^[38].

Gentechnologische Verfahren wurden als dritte und rasch erfolgreiche Methode in Kooperation mit den mikrobiologischen Arbeitsgruppen um Entian und Götz eingesetzt^[1]. Das Strukturen von Epidermin wurde mit einer gemischten DNA-Sonde, die aus der Pentapeptidsequenz Lys-Phe-Ile-Cys-Thr von Proepidermin^[4, 29] abgeleitet war, gesucht. Dieses synthetische Oligonucleotid 5'-GTG(A)CAT-(G,A)ATG(A)AAT(C)TT-3' ergab mit dem 54-Kilobasen(kb)-Plasmid pEpi 32 von *Staphylococcus epidermidis* Tü 3298 ein Hybridisierungssignal. Mit Restriktionsanalysen, Subklonierungen und Rehybridisierungen konnte das Strukturen von Epidermin epi A auf einem 2.2 kb Eco RI/Bg III-Fragment lokalisiert werden^[1].

Die Sequenzierung von epi A nach der Dideoxy-Methode von Sanger ergab einen offenen Leserahmen für Präepidermin mit 52 Aminosäuren (Abb. 16). Ein einzelnes Methionin-Codon ATG, das sieben Basenpaare nach einer Shine-Dalgarno-Sequenz AGGAGT lokalisiert, markiert den Beginn des Leserahmens, und ein TAA-Stop-Codon terminiert das Strukturen unmittelbar nach den beiden Basentriplets TGT, die zwei aufeinanderfolgende Cysteinreste codieren. Vor dem Strukturen des Prolantibioticums findet sich eine 30 Aminosäuren lange Leadersequenz. Die Prozessierungsstelle für Epidermin liegt zwischen Arg⁻¹ und Ile⁺¹. Mit der Sequenzierung des Epidermin-Strukturgens^[1] konnte erstmals experimentell dokumentiert werden, daß Lantibiotica aus ribosomal synthetisierten Vorläuferproteinen gebildet werden (Abb. 16).

Nach diesem Erfolg wurden rasche Fortschritte gemacht. In unserer Arbeitsgruppe konnten nach Epidermin die komplexen Lantibiotica Gallidermin^[11] und Pep5^[9] sowie in Kooperation mit Kessler Cinnamycin^[6] aufgeklärt werden. In der Arbeitsgruppe von Entian wurden die Strukturen der von uns postulierten Prälanntibiotica Prägallidermin^[35], Prä-Pep5^[36] und schließlich Prä-Ro-09-0198^[37] als Prälanntibiotica des Subtyps B auf DNA-Ebene sequenziert.

Der Arbeitsgruppe Götz gelang eine vollständige Genkartierung des Gallidermin-Produzenten. Einige der an der Biosynthese von Epidermin beteiligten Enzyme konnten inzwischen auf DNA-Ebene, wiederum von der Gruppe Entian, sequenziert werden. Gleichzeitig mit der Gruppe Entian^[18a] sequenzierte die Gruppe Hansen^[18b] die Strukturgene von Nisin, Banerjee und Hansen^[19] das von Subtilin. Als Fazit bleibt festzuhalten, daß die chemischen Strukturen der von uns aufgeklärten Lantibiotica durch die Sequenzierung der Strukturgene bis ins Detail bestätigt werden konnten. Wir sequenzierten schließlich vor kurzem drei von Sahl isolierte Precursorproteine der Biosynthese von Pep5^[38]. Ein Teil dieser Ergebnisse soll in den folgenden Abschnitten diskutiert werden.

5.3. Vergleich der Prälanntibiotica

Ein Vergleich der Vorhersageprofile zur Sekundärstruktur, Flexibilität, Hydropathy, Hydrophilie, die mit unserem Programm EPICON 89^[39] erstellt wurden, sowie der Helix-Wheel-Plots aller bisher bekannten sechs Prälanntibiotica (Tabelle 5) zeigt überraschende Gemeinsamkeiten (Abb. 17).

Tabelle 5. Precursoren von Lantibiotica: Sequenzlängen und Lokalisierung des Strukturgens (vgl. Tabelle 1).

	Leaderpeptid	Prolantibioticum	Prälanntibioticum	Strukturen
<i>Typ A</i>				
Epidermin [1]	-30 → -1	+1 → 22	52	Plasmid
Gallidermin [35]	-30 → -1	+1 → 22	52	chromosomale DNA
Pep5 [36]	-26 → -1	+1 → 34	60	Plasmid
Nisin [18]	-23 → -1	+1 → 34	57	Plasmid/DNA
Subtilin [19]	-24 → -1	+1 → 32	56	chromosomale DNA
<i>Typ B</i>				
Cinnamycin [37]	-58 → -1	+1 → 19	77	chromosomale DNA

Vor allem fällt auf, daß alle Leadersequenzen sehr hydrophil und stark geladen sind, kein Cystein enthalten und sich in lipophiler Umgebung sehr wahrscheinlich zu einer amphiphilen α -Helix falten.

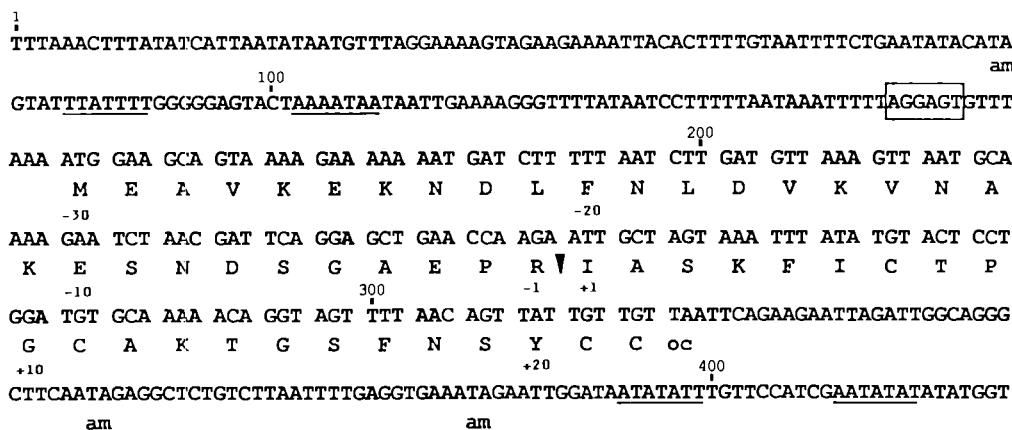


Abb. 16. Präepidermin-Strukturen: Offener Leserahmen von 237 Basenpaaren definiert durch Codons TAG (amber) und TAA (ochre); Shine-Dalgarno-Sequenz eingerahmt; Inverted repeats (unterstrichen); proteolytische Spaltstelle der Singalpeptidase (Pfeil) zwischen Leaderpeptid und Proepidermin-Segment [1]. Aminosäuren im Einbuchstabencode: Leaderpeptid -30 bis -1, Proepidermin +1 bis +22.

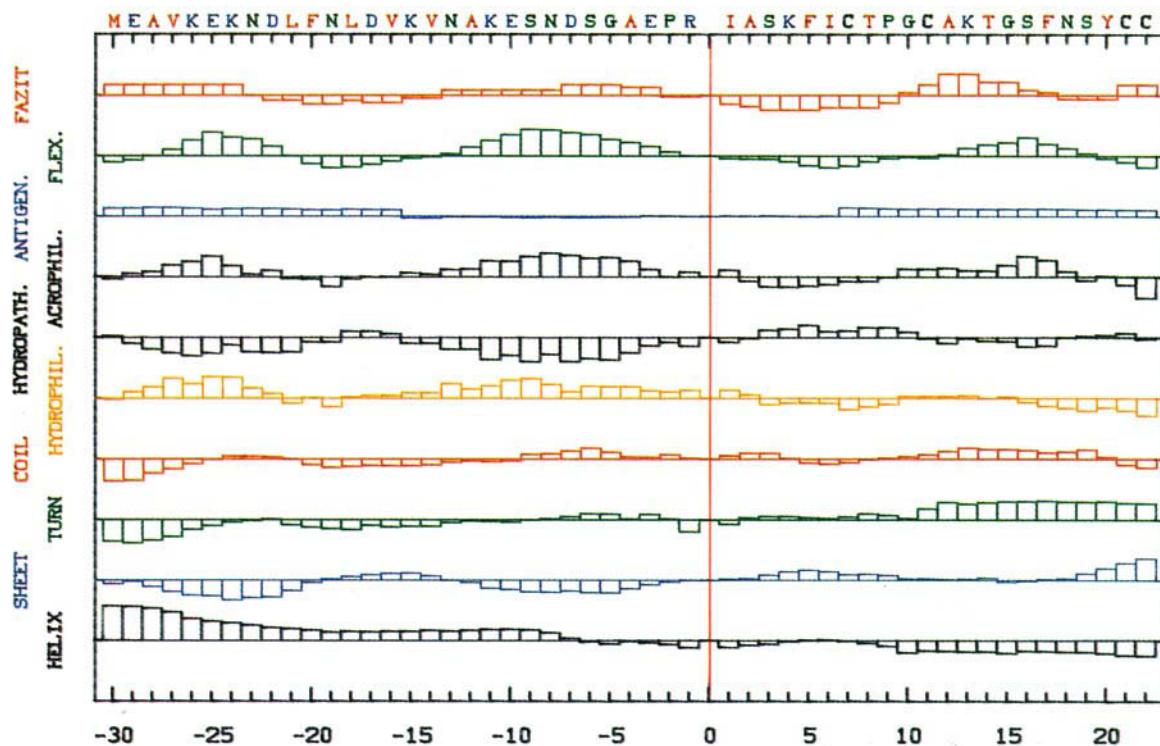


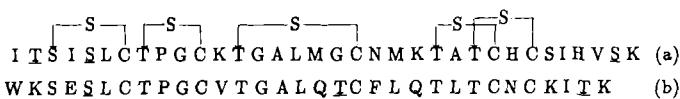
Abb. 17. Vorhersageprofil für den Epidermin-Precursor mit Leadersequenz – 30 bis – 1 und Prolantibioticumteil 1–22 [1] nach Programm EPICON 89 [39]. Fazit ist die Summe der folgenden unterschiedlich gewichteten Vorhersagen und zeigt die Lage möglicher kontinuierlicher B-Zell-Epitope an. Flexibilität (Flex.) zeigt flexible Oberflächenbereiche an; Antigenität (Antigen.) wird aus Parametern berechnet, die aus einem Vergleich bekannter sequentieller Epitope für verschiedene Proteintypen stammen; Acrophilie (Acrophil.) zeigt die Oberflächenwahrscheinlichkeit an; Hydrophobie (Hydrophob.) sagt hydrophobe und Hydrophilie (Hydrophil.) hydrophile Bereiche voraus. Die Sekundärstrukturvorhersage wird durch Coil, Turn, β -Faltblatt (Sheet) und α -Helix illustriert.

Die Prolantibioticum-Sequenz hingegen ist lipphiler und ihre Sekundärstruktur zeichnet sich durch bevorzugte Turnbildung und das Fehlen α -helikaler Bereiche aus. Sie enthält

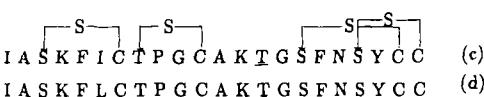
die Ser-, Thr- und Cys-Reste, die zu α,β -Didehydroaminoäuren modifiziert werden oder die Schwefelringe bilden (Abb. 18).

Typ-A-Prolantibiotica*:

Nisin (a), Subtilin (b)



Epidermin (c), Gallidermin (d)



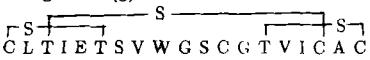
Pep5 (e)



Mersacidin (f)

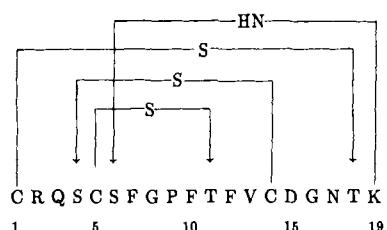


Actagardine (g)



Typ-B-Prolantibiotica*:

Cinnamycin



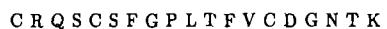
= Lanthiopeptin

Duramycin

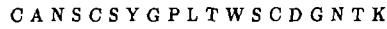


= Leucopeptin

Duramycin B



Duramycin C



Ancovenin**

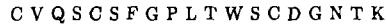


Abb. 18. Bildung von Sulfidringen und Dehydroaminoäuren in den Prolantibioticasegmenten der Prälantibiotica des Typs A (a–e) mit bekannten Strukturgenen (linke obere Bildhälfte). Die Prolantibioticasequenzen von (f) und (g) sind noch nicht auf DNA-Ebene bestätigt; bei (g) fehlen Konfigurationsbestimmungen. Die Sulfidringbildung der Prälantibiotica des Typs B zeigt die rechte Bildhälfte. Von den Typ-B-Prolantibiotica ist bisher nur das Strukturgen Präcinnamycin [37] sequenziert. * Die Pfeile geben die Richtung der Sulfidbrückenbildung ausgehend von L-Cystein an, wobei an der Additionsstelle aus einem Dha (aus L-Ser) und aus Dhb (aus L-Thr) die D-konfigurierte Hälfte von meso-Lan und (2S,3S,6R)-3-MeLan entsteht. Unterstrichene Ser- und Thr-Reste bleiben Dha und Dhb im prozessierten Lantibioticum (gilt nur für Typ A). ** Keine Lysinoalanin-Brücke 19 → 6 in Ancovenin, jedoch alle Typ-B-Lantibiotica außer Ancovenin haben HyAsp in Position 15.

Die untypischen Leadersequenzen haben keine lipophilen Segmente, die mehr als vier Aminosäuren umfassen, und sehr viele Endoprotease-Schnittstellen. Demgegenüber scheint der Prolantibioticumteil proteaseresistenter zu sein. Auch in den reifen Lantibiotica, wie z. B. Epidermin, Gallidermin und den Duramycinen, gibt es meist nur wenige typische Spaltstellen.

Besonders interessant ist ein Vergleich der Spaltstellen der Prälantibiotica (Tabelle 6). Offensichtlich können die Signalpeptidasen, die das reife Lantibioticum von der Leadersequenz abspalten, an einem gut zugänglichen, hydrophilen Turn angreifen. Tabelle 6 verdeutlicht die starke Konservie-

Tabelle 6. Signalpeptidase-Spaltstellen (—) von Prälantibiotica und Prähormonen (zum Vergleich).

Prälantibiotica von (vgl. Tabelle 5) [a]		
	— 5	— 1 + 1
Nisin	Gly-Ala-Ser-[Pro]-Arg—Ile-Thr-Ser-Ile	
Subtilin	Lys-Ile-Thr-[Pro]-Gln-Trp-Lys-Ser-Glu	
Epidermin	Gly-Ala-Glu-[Pro]-Arg—Ile-Ala-Ser-Lys	
Gallidermin	Gly-Ala-Glu-[Pro]-Arg—Ile-Ala-Ser-Lys	
Pep5	Glu-Leu-Glu-[Pro]-Gln—Thr-Ala-Gly-Pro	
Cinnamycin	Trp-Glu-Ala-Phe-Ala—Cys-Arg-Gln-Ser	
Prähormone von		
ANP	Ala-Gly-[Pro]-Arg-Ser-Leu-Arg	
Substance P	Ile-Ala-Arg-Arg-[Pro]-Lys-Pro	

[a] Modifizierte Aminosäurereste im Prälantibioticum sind markiert.

rung dieser Stelle bei den Prälantibiotica des Subtyps A: Die Reste (+ 2) und (+ 1) sind hydrophob, (− 1) ist positiv geladen oder polar, (− 2) immer Pro, (− 3) negativ geladen oder polar, (− 4) immer hydrophob. Derzeit suchen wir in Zellextrakten mit fluorophormarkierten Signalpeptidase-Substraten nach den prozessierenden Enzymen.

Im Vergleich zu den Precursorproteinen der Lantibiotica vom Typ A (z. B. Nisin) unterscheidet sich das einzige bekannte Prälantibioticum vom Typ B stark. Es handelt sich um das jüngst in seinem Strukturen von *Kaletta* und *Entian* sequenzierte Präcinnamycin (= Prä-Ro-09-0198, Prälanthiopeptin)^[37]. Auffallend ist, daß die Leadersequenz dieses Prälantibioticums vom Subtyp B, die aus 58 Aminosäuren besteht, etwa doppelt so lang ist (Tabelle 5). Für das an die Spaltstelle N-terminal anschließende Segment werden hohe α -Helix-Wahrscheinlichkeiten vorhergesagt. Wie bei den anderen Prolantibiotica findet man hohe Lipophilie und β -Turn-Wahrscheinlichkeit in dem an das Signalpeptid C-terminal anschließenden, weitere 19 Aminosäuren langen Teil, in dem die Ringbildung stattfinden. Die völlig abweichen- de Spaltstelle von Präcinnamycin (Tabelle 6), die keinerlei Homologie zu den Prälantibiotica des Subtyps A zeigt, weist ebenfalls auf unterschiedliche Signalpeptidasen für diese beiden Subtypen hin.

5.4. Synthese und Konformation von Leaderpeptiden

Um experimentelle Daten für die in Vorhersagediagrammen aufgezeigte α -Helix in den Leaderregionen der Prälantibiotica zu erhalten, synthetisierten wir unter vollem Seiten-

kettenschutz alle Leaderpeptide mit der Fmoc/tBu-Strategie über ein säurelabiles Ankermolekül am Merrifield-Harz^[40]. Die Aktivierung der Aminosäuren erfolgt durch das neue Kupplungsreagenz TBTU (2-(1*H*-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumtetrafluorborat). Nach Feinreinigung über Sephadex G25 und RP-HPLC wurden sehr reine Produkte erhalten, deren Identität in der Aminosäurenanalyse, im Racemisierungstest, durch Edman-Abbau und Ion-Spray-Massenspektrometrie bewiesen wurde.

Circulardichroismus-Spektren wurden in Gemischen aus Trifluorethanol und Wasser aufgenommen. Zwei negative Cotton-Effekte bei 207 und 220 nm sowie positive Elliptizität bei 194 nm weisen bei allen Leaderpeptiden auf eine α -helikale Konformation hin (Abb. 19). Die α -Helixanteile stei-

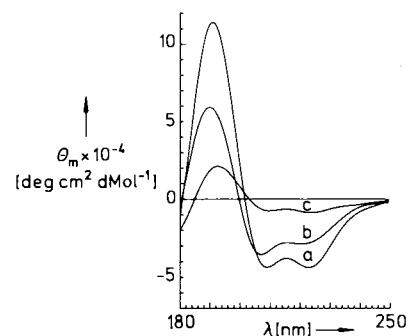


Abb. 19. CD-Spektren des isolierten natürlichen Precursorproteins Prä-Pep5 (a), des synthetischen α -helikalen Leaderpeptids —26 bis —1 von Prä-Pep5 (b) und des isolierten natürlichen Lantibioticums Pep5 (c) in Trifluorethanol/Wasser (9:1).

gen erwartungsgemäß mit zunehmender Lipophilie des Lösungsmittels. Durch Vergleich mit Peptiden ähnlicher Größe und bekanntem α -Helix-Gehalt läßt sich ein Anteil von $70 \pm 15\%$ α -Helix in Trifluorethanol/Wasser (9:1) abschätzen. Die stark hydrophilen Leaderpeptide der Prälantibiotica haben also sehr hohe α -Helixanteile in lipophiler Umgebung. Bevor ich die aus diesen Befunden ableitbaren Schlußfolgerungen bezüglich der Biosynthese diskutiere, möchte ich noch die aufregende Isolierung und Charakterisierung von Zwischenstufen der Biosynthese des Lantibioticums Pep5 schildern.

5.5. Isolierung und Strukturaufklärung nicht modifizierter und modifizierter Prälantibiotica

In Kooperation mit *Sahl* versuchten wir das Precursorprotein Prä-Pep5 als primäres Translationsprodukt der Biosynthese des tricyclischen Lantibioticums Pep5^[9, 10] zu charakterisieren. Aus der Struktursequenzierung konnte ein 60 Aminosäuren langes Prä-Pep5 abgeleitet werden^[36]. Das synthetisch hergestellte, helikale Leaderpeptid von 26 Aminosäuren Länge wurde als Immunogen zur Gewinnung polyclonalen Antikörpers eingesetzt. In Rohextrakten des Pep5-Produzentenstammes *Staphylococcus epidermidis* 5 wurden verschiedene ähnliche Proteine der Molmasse 6000 bis 7000 Da identifiziert und mit RP-HPLC einer schnellen Isolierung und Reinigung unterzogen^[38]. Bei der Isolierung mußten hohe Konzentrationen des Serin-Proteasehemmers Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) zugesetzt werden.

Eines der beiden isolierten Proteine reagierte auch mit dem polyklonalen Serum, das nach Immunisierung mit einem C-terminalen Pep5-Fragment, das zwei Sulfidbrücken enthält, gewonnen wurde. Weder Lanthionin noch 3-Methyllanthionin wurden in der Aminosäurenanalyse dieser Probe entdeckt. Einen automatischen Edman-Abbau mit dem Gasphasensequenator unter on-line-PTH-Detektion konnten wir mit etwa 800 pMol-Isolat durchführen. Die dabei erhaltene Aminosäurensequenz war vergleichbar mit dem Abbau von 400 pMol des synthetischen Leaderpeptides^[40] (Abb. 20). Der Edman-Abbau stoppte allerdings bei

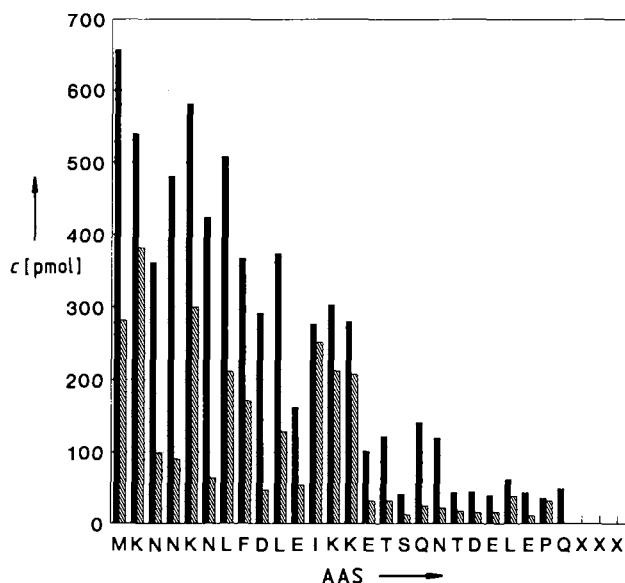


Abb. 20. Ausbeuten der Edman-Abbauschritte des isolierten Prä-Pep5 (schwarze Balken) verglichen mit dem Abbau des synthetischen Leaderpeptids – 26 bis – 1 (schräffierte Balken). c = Konzentration von PTH-Aminosäure in pmol/Abbauschritt, AAS = Aminosäuresequenz.

dem ersten Threoninrest der Prolantibioticumregion. Wir werteten dies als Hinweis auf eine bereits erfolgte posttranskriptionale Modifikation an dieser Position^[38].

Mit der geringen, nach dem Edman-Abbau noch zur Verfügung stehenden Peptidlösung konnten wir 10 Minuten

lang Massenspektren mit der neuen Methode der Ionen-spray-Massenspektrometrie am API-III-Spektrometer aufnehmen. Dabei wurde die Lösung über eine Glaskapillare mit $5 \mu\text{L min}^{-1}$ dem Spektrometer zugeführt. Aus den erhaltenen Massenspektren der mehrfach geladenen Ionen wurde eine Molmasse von 6575.4 ± 1.7 Da bestimmt (Abb. 21). Diese stimmt mit einem Prä-Pep5-Molekül überein, das an vier Threonin- und zwei Serinresten der Prolantibioticumregion dehydratisiert ist. Dieses sechsfach dehydratisierte Protein hat eine berechnete Molmasse von 6576.7 Da.

Das sechsfach dehydratisierte Prä-Pep5 (Abb. 22) ist das erste bisher isolierte und charakterisierte Precursorprotein eines ribosomal synthetisierten und posttranslational modifizierten Peptidantibioticums. Unsere Ergebnisse zeigen, daß die Biosynthese der Lantibiotica offensichtlich durch eine selektive Dehydratisierung von Hydroxymaminosäuren im

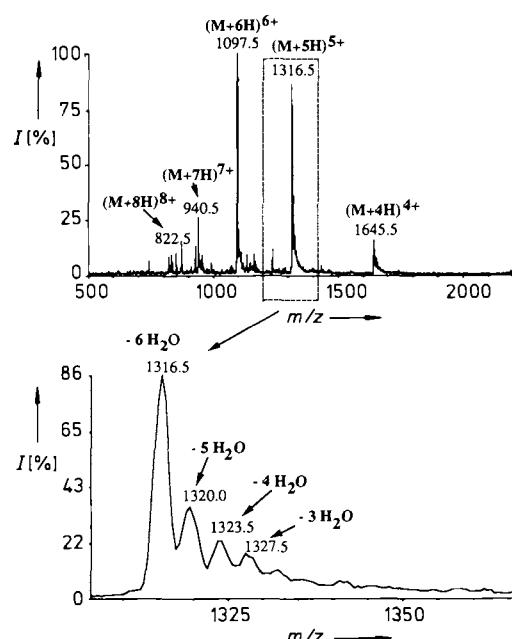


Abb. 21. Ionspray-API-III-Massenspektrum des isolierten sechsfach dehydratisierten Prä-Pep5. Die Peaks entsprechen jeweils Molekülionen mit gleicher Molmasse 6575.4 ± 1.7 Da, jedoch unterschiedlicher Ladung (+4 bis +8). Die zusätzlichen Peaks lassen sich mit den Massen partiell dehydratisierter Precursortypen korrelieren. $I =$ relative Intensität.

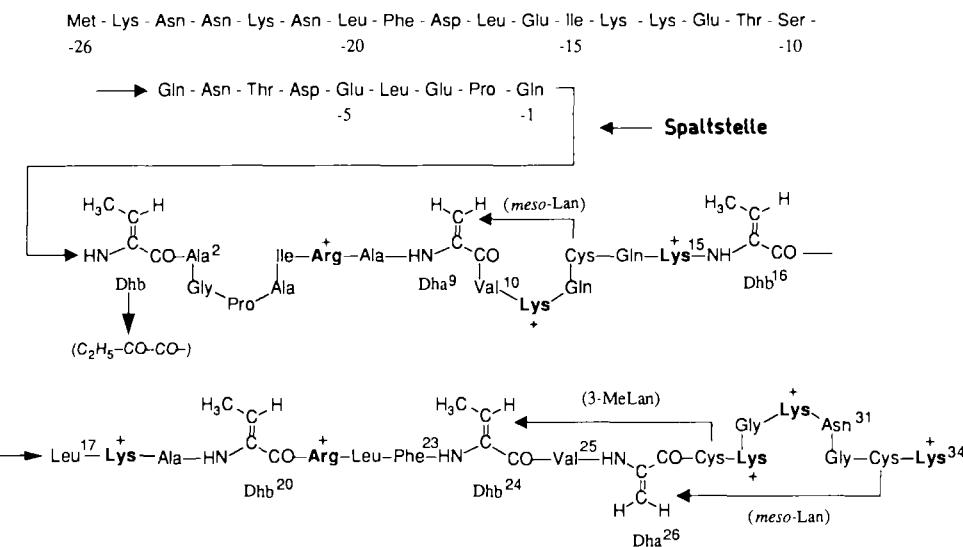


Abb. 22. Struktur des isolierten Precursorproteins von Pep5 (Prä-Pep5) mit sechsfach dehydratisierter Prolantibioticumregion (1 bis 34). – 26 bis – 1 ist die α -helikale Leader-region.

Prolantibioticumteil des primären Translationsproduktes initiiert wird. Die Sulfidringbildung ist also nicht unmittelbar mit dem Dehydratisierungsschritt verknüpft. Somit muß in das Biosyntheseschema eines Lantibioticums (Abb. 15) das dehydratisierte Prälantibioticum als isolierbare Zwischenstufe eingefügt werden. Kurz darauf konnten in analoger Weise das völlig unmodifizierte Prä-Pep5 und ein Prä-Pep5 mit Sulfidringen und Didehydroaminoäuren isoliert und durch Sequenzierung und Massenspektrometrie charakterisiert werden. Somit sind sämtliche bisher nur postulierten Zwischenformen der Modifikation des Precursorproteins eines Lantibioticums erstmals experimentell nachgewiesen worden.

6. Ausblick

Mit der Isolierung nicht modifizierter, bis zu sechsfach dehydratisierter und auch Sulfidrings enthaltender Prä-Pep5-Zwischenstufen der Biosynthese ist ein entscheidender Schritt in Richtung der lückenlosen Aufklärung der Lantibiotica-Biosynthese gelungen. Die für die posttranskriptionale Modifikation und Prozessierung notwendigen Enzyme konnten bisher auf DNA-Ebene lokalisiert, aber noch nicht isoliert werden. Folgende Fragestellungen sind deshalb zur Zeit in den Arbeitsgruppen *Entian*, *Götz*, *Sahl* und bei uns in Bearbeitung:

Es soll untersucht werden, wie das dehydratisierende Enzym arbeitet, ob zum Beispiel aus der Hydroxygruppe durch Phosphorylierung über *cyclo*-AMP-abhängige Kinasen zuerst eine besser austretende Gruppe erzeugt wird, wie es bei der Dehydratisierung von freiem Serin und Threonin der Fall ist, oder ob eine andere Aktivierung stattfindet.

Wir wissen noch nicht, wodurch die stereospezifische Addition der Cystein-SH-Gruppe an die Doppelbindungen der α,β -Didehydroaminoäuren katalysiert wird. Ein ursprünglich diskutierter spontaner Ringschluß scheidet wohl aus, obwohl im chemischen Experiment solche Thioladditionen möglich sind. Allerdings sind dazu bei Raumtemperatur ein 1000facher Überschuß an Thiol und mehrere Tage Reaktionszeit erforderlich. Auch die Abfolge der Ringbildungen, vom C- zum N-Terminus oder umgekehrt, ist unbekannt. Das Auffinden der natürlichen Zwischenstufen^[38] und die chemische Synthese nicht modifizierter Prälantibiotica^[40] zeigen allerdings experimentelle Möglichkeiten zum Studium der Ringschlußmechanismen auf.

Dem speziell an der Modifizierung von Präepidermin beteiligten Enzym, das die oxidative Decarboxylierung zu dem Aminovinylrest katalysiert, könnte im Zusammenhang mit neueren Erkenntnissen zur Biosynthese von vinylischen Strukturen in Duftstoffen von Blütenpflanzen und Insekten^[41] besonderes Interesse zukommen.

Schließlich wissen wir nicht, wie die Signalpeptidase arbeitet, und ob diese gleichzeitig das Exportprotein ist. Findet ein Teil dieser Reaktionen an einem multifunktionellen Enzymkomplex oder nacheinander an isoliert lokalisierten Enzymen statt?

Von besonderem Interesse ist auch die Frage, wie sich die Produzentenzelle gegen das auch für sie toxische Lantibioticum schützt. Zur Klärung dieses Selbstschutzprinzips^[14] werden derzeit verschiedene proteinanalytische und genetische Arbeiten durchgeführt. Prinzipiell denkbar wäre eine

schützende Beteiligung des Leaderpeptids. Solange das hydrophile Leaderpeptid mit dem modifizierten Lantibioticum noch kovalent oder, schon abgespalten, durch intermolekulare Wechselwirkungen verbunden ist, kann es seine toxische Wirkung auf die Zellwand nicht entfalten.

Eine aktive Beteiligung der Leaderregion während der Modifikationsschritte ist aufgrund des hohen Anteils an geladenen Aminosäuren, der negativen Nettoladung, einer sehr ähnlichen Prozessierungsstelle und der α -helikalen Konformation sehr wahrscheinlich. Aufgrund des Beibehaltens dieser Eigenschaften bei allen bekannten Prälantibiotica sollte dem Leadersegment zumindest die funktionelle Rolle der Stabilisierung einer bestimmten Konformation des Prälantibioticumteils zukommen. Das Leaderpeptid könnte auch aktiv bei den enzymatischen Modifizierungsschritten beteiligt sein. Schließlich könnte das Leaderpeptid Erkennungsregionen für die Anheftung an modifizierende Enzyme, Signalpeptidase oder Exportprotein tragen.

Interessant ist die sehr kurze Halbwertzeit des primären Translationsproduktes, das offensichtlich in der nativen Produzentenzelle sofort dehydratisiert wird^[38]. Wir setzen deshalb totalsynthetische Prälantibiotica als Substrate für die dehydratisierenden Enzyme ein. Die Totalsynthese von Präepidermin mit 52 Aminosäuren konnte durch Segment kondensationen aus geschützten, gereinigten Teilstücken bereits erfolgreich durchgeführt werden^[40]. Falls die Bildung der Doppelbindung nicht unmittelbar nach der Proteinsynthese erfolgt, könnte man mit einer breiten Palette synthetischer Substrate die Spezifität und die Anwendungsmöglichkeiten dieser Enzyme sehr rasch aufklären.

In der mikrobiellen Genetik werden mit synthetischen Strukturgenen bereits sequenzabgewandelte Lantibiotica hergestellt. Es werden dazu Plasmide mit mutierten Strukturgenen zur Transformation von Produzentenstämmen eingesetzt, und die damit produzierten, veränderten Lantibiotica werden auf antibiotische Wirkung, ihre Sequenz und Konformation untersucht. Erste auf diese Weise gezielt durch Basenaustausch (site directed mutagenesis) hergestellte Analoga konnten bereits isoliert und getestet werden^[42].

Der Autor bedankt sich für die intensive und spannende Kooperation mit den mikrobiologischen und gentechnologischen Arbeitsgruppen von K.-D. Entian, P. Fiedler, F. Götz, H.-G. Sahl, R.-G. Werner und insbesondere H. Zähner, dem Leiter des Sonderforschungsbereichs 323. Die Strukturaufklärungen, die Konformationsanalysen und Peptidsynthesen wurden von meinen hochengagierten Mitarbeitern H. Allgaier, R. Kellner, S. Freund, S. Stevanovic und A. G. Beck-Sickinger durchgeführt. A. Bayer danke ich für die kritische Durchsicht des Manuskripts. Die Moleküldynamik-Simulationen entstanden in Kooperation mit O. Gutbrod und G. Folkers. W. A. Gibbons danke ich für die Aufnahme von S. Freund in seiner Londoner Arbeitsgruppe und die unproblematische Zur-Verfügung-Stellung seines 500 MHz-NMR-Spektrometers. Für die finanzielle Unterstützung der an der Lantibiotica-Forschung beteiligten Gruppen des SFB 323 sei der Deutschen Forschungsgemeinschaft gedankt.

Ein eingegangen am 10. Juli 1990,
veränderte Fassung am 20. März 1991 [A 833]

[1] N. Schnell, K.-D. Entian, U. Schneider, F. Götz, H. Zähner, R. Kellner, G. Jung, *Nature* 333 (1988) 276.

[2] a) E. Gross, J. L. Morell, *J. Am. Chem. Soc.* 93 (1971) 4634; b) E. Gross in L. Fox (Hrsg.): *Thirty years of protein structure elucidation*, Dekker, New York 1976; c) E. Gross, J. H. Brown in A. Loffet (Hrsg.): *Peptides 1976*, Editions de l'Université de Bruxelles, Brüssel 1976, S. 183.

- [3] a) A. Hurst, *Adv. Appl. Microbiol.* 27 (1981) 85; b) K. Rayman, A. Hurst in E. J. Vandamme (Hrsg.): *Biotechnology of industrial antibiotics*, Dekker, New York 1984, S. 607, zit. Lit.
- [4] a) H. Allgaier, G. Jung, R.-G. Werner, U. Schneider, H. Zähner, *Angew. Chem.* 97 (1985) 1052, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 24 (1985) 1051; b) *Eur. J. Biochem.* 160 (1986) 9.
- [5] a) T. Wakamiya, Y. Ueki, T. Shiba, Y. Kido, Y. Motoki, *Tetrahedron Lett.* 26 (1985) 665; b) M. Nishikawa, T. Teshima, T. Wakamiya, T. Shiba, Y. Kobayashi, T. Ohkubo, Y. Kyogoku, Y. Kido in T. Shiba, S. Sakakibara (Hrsg.): *Peptide Chemistry*, Protein Research Foundation, Osaka 1988, S. 71; c) T. Shiba, T. Wakamiya, K. Fukase, A. Sano, K. Shimbo, Y. Ueki, *Biopolymers* 23 (Suppl.) (1986) S11-S19.
- [6] a) H. Kessler, S. Steuernagel, M. Will, G. Jung, R. Kellner, D. Gillessen, T. Kamiyama, *Helv. Chim. Acta* 71 (1988) 1924; b) S. Steuernagel, *Dissertation*, Universität Frankfurt 1989.
- [7] a) E. Gross, *Adv. Exp. Med. Biol.* B86 (1977) 131; b) W. Dworidi, O. L. Shotwell, R. G. Benedict, T. G. Pridham, L. A. Lindenfelsler, *Antibiot. Chemother.* 4 (1954) 1135; c) O. L. Shotwell, F. H. Stodola, W. R. Michael, L. A. Lindenfelsler, R. G. Dworschack, T. G. Pridham, *J. Am. Chem. Soc.* 80 (1958) 3912; d) A. Fredenhagen, G. Fendrich, F. Märki, W. Märki, J. Gruner, F. Raschdorf, H. H. Peter, *J. Antibiot.* 43 (1990) 1403; e) S. Clejan, A. A. Guffanti, M. A. Cohen, T. A. Krulwick, *J. Bacteriol.* 171 (1989) 1744; f) P. M. Sokolow, P. A. Westphal, M. B. Kester, R. Wierwille, K. Sikora-Van Meter, *Biochim. Biophys. Acta* 983 (1989) 15; g) E. A. Dunkley, S. Clejan, A. A. Guffanti, T. A. Krulwick, *ibid.* 943 (1988) 13; h) L. Chen, P. C. Tai, *J. Bacteriol.* 169 (1987) 2373; i) G. Lindblom, M. Sjöeland, L. Rifors, *Liq. Cryst.* 3 (1988) 783; j) E. Kinne-Saffran, R. Kinne, *Pfluegers Arch.* 407 (Suppl. 2) (1986) 180; k) J. Navarro, J. Chabot, K. Sherill, R. Aneja, S. A. Zahler, E. Racker, *Biochemistry* 24 (1985) 4645; l) S. Choung, T. Kobayashi, K. Takemoto, H. Ishitsuka, K. Inoue, *Biochim. Biophys. Acta* 940 (1988) 180; m) S. Choung, T. Kobayashi, J. Inoue, K. Takemoto, H. Ishitsuka, K. Inoue, *ibid.* 940 (1988) 171.
- [8] a) Offenlegungsschrift DE 38 27 868 A1 vom 22.02.1990, Deutsches Patentamt; b) J. K. Kettenring, A. Malabarba, K. Vékey, B. Cavalleri, *J. Antibiot.* 53 (1990) 1082; c) A. Malabarba, R. Pallanza, M. Berti, B. Cavalleri, *ibid.* 53 (1990) 1089; d) F. Parenti, H. Pagani, G. Beretta, *ibid.* 29 (1976) 501; e) C. Coronelli, G. Tamoni, G. C. Lancini, *ibid.* 38 (1985) 1506.
- [9] a) R. Kellner, G. Jung, M. Josten, C. Kaletta, K.-D. Entian, H.-G. Sahl, *Angew. Chem.* 101 (1989) 618, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 28 (1989) 616; b) R. Kellner, G. Jung, C. Kaletta, K.-D. Entian, H.-G. Sahl, *Pept. Proc. Eur. Pept. Symp.* 20th 1989, 369.
- [10] a) H.-G. Sahl, H. Brandis, *J. Gen. Microbiol.* 127 (1981) 377; b) H.-G. Sahl, M. Grossgarten, W. R. Widger, W. A. Cramer, H. Brandis, *Antimicrob. Agents Chemother.* 27 (1985) 836; c) G. Bierbaum, H.-G. Sahl, *Arch. Microbiol.* 141 (1985) 249.
- [11] a) R. Kellner, G. Jung, T. Hörner, H. Zähner, N. Schnell, K.-D. Entian, F. Götz, *Eur. J. Biochem.* 177 (1988) 53; b) R. Kellner, G. Jung, *Pept. Proc. Eur. Pept. Symp.* 20th 1989, 366.
- [12] a) T. Wakamiya, K. Fukase, N. Naruse, M. Konishi, T. Shiba, *Tetrahedron Lett.* 29 (1988) 4771; b) N. Naruse, O. Tenmyo, K. Tomita, M. Konishi, T. Miyaki, H. Kawaguchi, K. Fukase, T. Wakamiya, T. Shiba, *J. Antibiot.* 42 (1989) 837; c) K. Fukase, T. Wakamiya, N. Naruse, M. Konishi, T. Shiba in M. Ueki (Hrsg.): *Peptide Chemistry 1988*, Protein Research Foundation, Osaka 1989, S. 221.
- [13] a) H.-G. Sahl, H. Brandis, *FEMS Microbiol. Lett.* 1 (1983) 75; b) H.-G. Sahl, *J. Bacteriol.* 162 (1985) 833; c) M. Kordel, R. Benz, H.-G. Sahl, *ibid.* 170 (1988) 84; d) E. Ruhr, H.-G. Sahl, *Antimicrob. Agents Chemother.* 27 (1985) 841; e) H.-G. Sahl, M. Kordel, R. Benz, *Arch. Microbiol.* 149 (1987) 120; f) H.-G. Sahl, *Forum Microbiol.* 10 (1987) 330; *ibid.* 10 (1987) 337; g) G. Bierbaum, H.-G. Sahl, *Arch. Microbiol.* 141 (1985) 249; h) *FEMS Microbiol. Lett.* 58 (1988) 223; i) M. Kordel, F. Schüller, H.-G. Sahl, *FEBS Lett.* 244 (1989) 99; j) G. Bierbaum, H.-G. Sahl, *J. Bacteriol.* 169 (1987) 5452.
- [14] H.-G. Sahl, H. Erßfeld-Dreßen, G. Bierbaum, M. Josten, M. Kordel, M. Reis, F. Schüller, *Zentralbl. Bacteriol. Microbiol. Hyg. Abt. 1 Orig. A* 267 (1987) 173.
- [15] a) E. Küsters, H. Allgaier, G. Jung, E. Bayer, *Chromatographia* 18 (1984) 287; b) G. Jung, M. Ottnad, M. Rimpler, *Eur. J. Biochem.* 35 (1973) 436; c) G. Jung, M. Ottnad, *Chem. Ztg.* 98 (1974) 147; d) G. Jung, M. Ottnad, in K. Maas (Hrsg.): *Themen zur Chemie des Schwefels*, Hüthig, Heidelberg 1975, S. 167, zit. Lit.
- [16] a) E. Gross, J. L. Morell, *J. Am. Chem. Soc.* 89 (1967) 2791; b) *ibid.* 92 (1970) 2919; c) E. Gross in R. Walter, J. Meienhofer (Hrsg.): *Pept. Proc. Am. Pept. Symp.* 4th 1975, 31; d) E. Gross, K. Noda, B. Nisula, *Angew. Chem.* 85 (1973) 672; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 12 (1973) 664; e) E. Gross in J. L. Fox, Z. Deyl, A. Blazek (Hrsg.): *Protein Structure Evolution*, Dekker, New York 1976, S. 69.
- [17] a) E. Gross, H. H. Kiltz, L. C. Craig, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 354 (1973) 799; b) H. H. Kiltz, E. Gross, *ibid.* 354 (1973) 802; c) *ibid.* 354 (1973) 805; d) E. Nebelin, E. Gross, *ibid.* 354 (1973) 807; e) E. Gross, H. H. Kiltz, E. Nebelin, *ibid.* 354 (1973) 810.
- [18] a) C. Kaletta, K.-D. Entian, *J. Bacteriol.* 171 (1989) 1597; b) G. W. Buchman, S. Banerjee, J. N. Hansen, *J. Biol. Chem.* 263 (1988) 16260; c) H. M. Dodd, N. Horn, M. J. Gasson, *J. Gen. Microbiol.* 136 (1990) 555.
- [19] S. Banerjee, J. N. Hansen, *J. Biol. Chem.* 263 (1988) 9508.
- [20] a) K. Fukase, M. Kitazawa, A. Sano, K. Shimbo, H. Fujita, S. Horimoto, T. Wakamiya, T. Shiba, *Tetrahedron Lett.* 29 (1988) 795; b) K. Fukase, M. Kitazawa, H. Sano, K. Shimbo, H. Fujita, S. Horimoto, T. Wakamiya, T. Shiba in T. Shiba, S. Sakakibara (Hrsg.): *Peptide Chemistry 1987*, Protein Research Foundation, Osaka 1988, S. 337; c) S. Nomoto, A. Sano, T. Shiba in N. Izumiya (Hrsg.): *Peptide Chemistry 1978*, Protein Research Foundation, Osaka 1979, S. 35; d) T. Wakamiya, Y. Oda, K. Fukase, T. Shiba, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 58 (1985) 536, zit. Lit.; e) M. Kitazawa, K. Fukase, T. Wakamiya, T. Shiba in T. Miyazawa (Hrsg.): *Peptide Chemistry 1986*, Protein Research Foundation, Osaka 1987, S. 317.
- [21] a) T. Hörner, H. Zähner, R. Kellner, G. Jung, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 30 (1989) 219; b) T. Hörner, V. Ungermann, H. P. Fiedler, H. Zähner, R. Utz, R. Kellner, G. Jung, *ibid.* 32 (1990) 511; c) G. Jung, H. Allgaier, R. Kellner, U. Schneider, T. Hörner, H. Zähner, R.-G. Werner in H. Chmiel, W. P. Hammes, J. E. Bailey (Hrsg.): *Biochemical Engineering*, Fischer, Stuttgart 1987, S. 494; d) H. Allgaier, persönliche Mitteilung.
- [22] S. Kondo, M. Sezaki, M. Shimura, K. Sato, T. Hara, *J. Antibiot.* 17 (1964) 262.
- [23] a) U. Schmidt, A. Lieberknecht, U. Kazmaier, E. Haslinger, *Angew. Chem.* 102 (1990) 562; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 29 (1990) 514; b) U. Schmidt, R. Utz, P. Gleich, *Tetrahedron Lett.* 26 (1985) 4367; c) U. Schmidt, R. Utz, *Angew. Chem.* 96 (1984) 723; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 23 (1984) 725; d) A. Lieberknecht, H. Griesser, *Tetrahedron Lett.* 28 (1987) 4275.
- [24] M. Slijper, C. W. Hilbers, R. N. H. Konings, F. J. M. van de Ven, *FEBS Lett.* 252 (1989) 22.
- [25] a) W. C. Chan, B. W. Bycroft, L.-Y. Lian, G. C. K. Roberts, *FEBS Lett.* 252 (1989) 29; b) W. C. Chan, L.-Y. Lian, B. W. Bycroft, G. C. K. Roberts, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 1989, 2359.
- [26] a) D. E. Palmer, D. F. Mierke, C. Pattaroni, K. Nunami, S. Ro, Z. Huang, T. Wakamiya, K. Fukase, M. Kitazawa, H. Fujita, T. Shiba, M. Goodman, *Pept. Synth. Struct. Biol. Funct. Proc. Am. Pept. Symp.* 11th 1990, 616; b) D. E. Palmer, D. F. Mierke, C. Pattaroni, M. Goodman, T. Wakamiya, V. Fukase, M. Kitazawa, H. Fujita, T. Shiba, *Biopolymers* 28 (1989) 397.
- [27] a) S. Freund, O. Gutbrod, G. Folkers, W. A. Gibbons, G. Jung, *Biopolymers* 31 (1991) 803; b) S. Freund, G. Jung, O. Gutbrod, G. Folkers, W. A. Gibbons, *Pept. Proc. Eur. Pept. Symp.* 21th 1991, 538.
- [28] G. Jung, *Pept. Synth. Struct. Biol. Funct. Proc. Am. Pept. Symp.* 11th 1990, 865. (Bemerkung: Dieser Bericht enthält noch die falsche Duramycinsequenz nach E. Gross [7a, 2c].)
- [29] a) H. Allgaier, *Dissertation*, Universität Tübingen 1985; b) G. Jung, H. Allgaier, R.-G. Werner, U. Schneider, H. Zähner in D. Theodoropoulos (Hrsg.): *Peptides 1986*, de Gruyter, Berlin 1987, S. 241.
- [30] a) L. Ingram, *Biochim. Biophys. Acta* 224 (1970) 263; b) *ibid.* 184 (1969) 216.
- [31] F. Lipman, W. Gevers, H. Kleinkauf, R. Roskowski, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 35 (1971) 64.
- [32] C. Nishio, S. Komura, K. Kurahashi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 16 (1983) 751.
- [33] W. Kozak, M. Rajchert-Trzpił, W. T. Dobrzanski, *J. Gen. Microbiol.* 83 (1974) 295.
- [34] U. Schneider, *Dissertation*, Universität Tübingen 1985.
- [35] a) N. Schnell, K.-D. Entian, F. Götz, T. Hörner, R. Kellner, G. Jung, *FEMS Microbiol. Lett.* 58 (1989) 263; b) F. Götz, K.-D. Entian, G. Jung, H. Zähner in T. Wadström, I. Eliasson, I. Holder, A. Ljungh (Hrsg.): *Pathogenesis of Wound and Biomaterial-Associated Infections*, Springer, Heidelberg 1990, S. 285.
- [36] C. Kaletta, K.-D. Entian, R. Kellner, G. Jung, M. Reis, H.-G. Sahl, *Arch. Microbiol.* 152 (1989) 16.
- [37] C. Kaletta, K.-D. Entian, G. Jung, *Eur. J. Biochem.* 199 (1991) 411.
- [38] H. P. Weil, A. G. Beck-Sickinger, J. Metzger, S. Stevanovic, G. Jung, M. Josten, H.-G. Sahl, *Eur. J. Biochem.* 194 (1990) 217.
- [39] a) W. Tröger, *Dissertation*, Universität Tübingen 1990; b) W. Tröger, G. Jung, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [40] A. G. Beck-Sickinger, G. Jung, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [41] G. Görger, W. Boland, *Eur. J. Biochem.* 185 (1989) 237.
- [42] Nachtrag vom 30. Juli 1991: Vom 15.–18. April 1991 fand der „First International Workshop on Lantibiotics“ in Bad Honnef statt. Die dort vorgebrachten Ergebnisse werden als Originalpublikationen veröffentlicht in G. Jung, H.-G. Sahl (Hrsg.): *Nisin and Novel Lantibiotics*, Escom, Leiden.