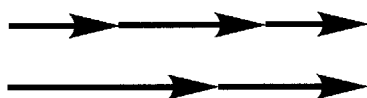
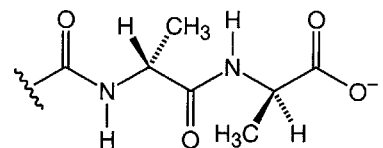


Struktur und Biosynthese



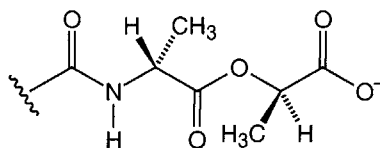
den Biosynthese-
apparat kodierende
Gene

Wirkmechanismus



**Bindung an
-D-Ala-D-Ala**

**Resistenz
von Bakterien**



**Zellwandvorstufen
mit terminalem
D-Lactat**

Die Vancomycin-Antibiotica und der Kampf gegen resistente Bakterien

Dudley H. Williams* und Ben Bardsley

In diesem Artikel sind die Entdeckungen zusammengefaßt, die in unserer Arbeitsgruppe in Cambridge zu Strukturen und Wirkungsmechanismen der Glycopeptidantibiotica der Vancomyngruppe gemacht wurden. Diese Antibiotica haben mittlerweile enorme klinische Bedeutung, denn unter ihnen befinden sich zwei der drei Antibiotica (Vancomycin und Teicoplanin), die in unseren Kliniken als letzte Waffe gegen resistente bakterielle Pathogene (besonders methicillinresistente *Staphylococcus-aureus*-Stämme (MRSA, „Superbakterien“)) dienen, die ansonsten oft tödlich wirken würden. Sie erreichen zusammen einen jährlichen Umsatz von etwa 1 Mrd. US-\$. Die Strukturaufklärung

in unserem Labor begann vor 25 Jahren. Innerhalb von 10 Jahren waren die ersten Glycopeptidstrukturen bestimmt. Es folgte rasch die Bestimmung des molekularen Wirkungsmechanismus, der in der Bildung von fünf Wasserstoffbrückenbindungen zu einem Vorstufenpeptid der Zellwand besteht, das mit den Aminosäuren -Lys-D-Ala-D-Ala endet. In den frühen 90er Jahren fanden wir heraus, daß alle bis dahin untersuchten Glycopeptide (mit Ausnahme von Teicoplanin) Dimere bilden, und zeigten kurz darauf, daß die Dimerisierung die antibiotische Aktivität fördert. Gleichzeitig konnten wir nachweisen, daß Teicoplanin einen Membrananker aufweist, der anstelle der Dimerisierung die antibiotische

Aktivität steigert. Durch die Kombination von Dimerisierung und Membranverankerung läßt sich wahrscheinlich wenigstens teilweise die bemerkenswerte Aktivität eines bei Eli Lilly entwickelten neuen semisynthetischen Glycopeptids gegen Bakterien erklären, die sogar gegen Vancomycin resistent sind. Ein umfassendes Verständnis dieser Strukturelemente ist wichtig, denn über Vorfälle des „Albtraum-Szenarios“, das Kliniker seit Jahren befürchten, – daß neue Stämme von MRSA auch gegen Vancomycin resistent sind – wurde kürzlich berichtet.

Stichwörter: Antibiotica • Kooperativität • Dimerisierung • Resistente Bakterien • Vancomycin

1. Einleitung

Einer der wichtigsten Erfolge bei der Bekämpfung mikrobieller Pathogene, die eine ernsthafte Bedrohung der menschlichen Gesundheit darstellen, wurde mit der Verbesserung der hygienischen Bedingungen in den Städten durch den Ausbau der Abwasser- und Müllbeseitigungssysteme erzielt. Ein zweiter entscheidender Schritt war der Beginn der Ära der Antibiotica in den 30er Jahren; Beispiele hierfür sind der Einsatz von Sulfonamiden gegen Lungenentzündungen und der Gebrauch von Penicillin im Zweiten Weltkrieg. Diese Antibiotica und die Folgeprodukte erwiesen sich als außergewöhnlich wirksam bei der Bekämpfung von Infektionskrankheiten, die bis dahin tödlich verlaufen konnten. Selektionsprozesse können in Bakterien allerdings wegen der kurzen Generationszeit und der Fähigkeit, genetische Information durch einen Konjugation genannten Vorgang zwi-

schen den Arten weiterzugeben, rasch ablaufen (Abbildung 1). Dies führte zur weitverbreiteten Entwicklung von Resistenzen gegen viele der neuen Antibiotica einschließlich Penicillin, und bis zu den späten 50er Jahren waren bis zu 85 % der in Kliniken isolierten pathogenen Staphylococce-

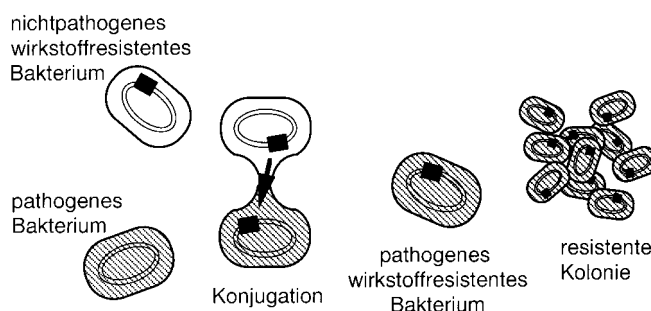


Abbildung 1. Die Resistenz gegen Wirkstoffe kann horizontal zwischen Bakterienarten weitergegeben werden. So kann ein nichtpathogenes, aber antibioticaresistentes Bakterium eine physische Verbindung mit einem pathogenen Bakterium eingehen und die genetische Information für die Antibioticaresistenz in einem Konjugation genannten Vorgang weitergeben. Mit dem Vorteil der Wirkstoffresistenz kann sich das pathogene Bakterium zu einer nicht therapierbaren, krankheitsregenden Kolonie vermehren.

[*] Prof. D. H. Williams, Dr. B. Bardsley
Cambridge Centre for Molecular Recognition
University Chemical Laboratory
Lensfield Road, Cambridge CB21EW (Großbritannien)
Fax: (+44) 1223-336913
E-mail: dhwl@cam.ac.uk

penicillinresistent.^[1] Seitdem sind trotz der Isolierung und Entwicklung neuer antibakterieller Wirkstoffe (darunter natürlich vorkommende, halbsynthetische und vollsynthetische Verbindungen) gegen praktisch alle bekannten Antibiotica resistente Bakterienstämme aufgetaucht. In den letzten zehn Jahren ist das Problem durch die Entwicklung von Resistenzen bei einigen Arten auch gegen die Antibiotica in der letzten Widerstandslinie, die Gruppe der Vancomycine, akuter geworden, und die Aussicht auf eine Rückkehr zur präantibiotischen Ära, in der einige Infektionen unheilbar sind, wird zur Realität.^[1-3]

Vor diesem Hintergrund werden wir die Rolle beschreiben, die die Gruppe der Vancomycin-Glycopeptidantibiotica in der Therapie der letzten 40 Jahre spielte und wie wir in der Forschungsgruppe in Cambridge die molekulare Grundlage für ihre Wirkung aufgeklärt haben. Wir werden dann diskutieren, wie sich seit kurzem die bakterielle Resistenz gegen die Verbindungen dieser Gruppe entwickelt hat und wie sich die Wirkprinzipien eines neuen semisynthetischen Glycopeptids, das auch gegen diese Bakterien wirksam ist, aus unserer Arbeit ergaben. Außerdem gehen wir auf die Biosynthese der Vancomycine ein und wie es in Zukunft vielleicht möglich sein wird, die Gencluster, die die Biosynthesenzyme kodieren, so zu verändern, daß neue, möglicherweise effizientere Antibiotica erhalten werden können. Abschließend werden wir auf Aspekte der Kooperativität bei der Wirkungsweise der Glycopeptide eingehen, die wir aufgeklärt haben, und die als Modell für die kooperativen Bindungen in komplexeren biologischen Systemen dienen kann. Dieser Aufsatz vervollständigt den 1996 von einem von uns (D.H.W.) verfaßten Übersichtsartikel.^[4]

2. Die Antibioticagruppe der Vancomycine

Vancomycin wurde erstmals Mitte der 50er Jahre aus einer Bodenprobe isoliert, die von Mitarbeitern des amerikani-

schen Pharmaunternehmens Eli Lilly entnommen worden war.^[5] Es wird von dem Mikroorganismus *Amycolatopsis orientalis* gebildet und wurde 1959 erstmals klinisch eingesetzt. Anfangs war dieser Einsatz jedoch durch Nebenwirkungen, die auf Unzulänglichkeiten bei der Reinigung zurückgingen, etwas eingeschränkt.^[6] Wenn Vancomycin z. B. intravenös verabreicht wurde, kam es in der Nähe der Einstichstelle manchmal zu Venenentzündungen. Auch bei Patienten, in deren Krankengeschichte Hörprobleme oder Nierenversagen auftraten, war der Einsatz von Vancomycin nicht angezeigt.^[7] Nachdem in den folgenden Jahren die Reinigungsmethoden für Vancomycin verbessert wurden, wurden die Nebenwirkungen seltener, und das Antibiotikum wurde häufiger verschrieben, besonders bei Infektionen, die durch *Staphylococcus aureus* verursacht wurden, zu dem die häufigsten klinisch isolierten penicillinresistenten Stämme gehörten. Weil methicillinresistente *Staphylococcus-aureus*-Stämme (MRSA, oft in Krankenhäusern vorkommende gefährliche Pathogene, die bereits eine Vielzahl von Todesfällen verursacht haben) Resistenzen gegen nahezu alle klinisch gebräuchlichen Antibiotica, einschließlich der Cephalosporine, Tetracycline, Aminoglycoside, Erythromycin und Sulfonamide, erworben haben, ist die Gruppe der Vancomycin-Glycopeptidantibiotica plötzlich in die vorderste Front beim Kampf gegen solche Bakterien vorgerückt. Zwei Verbindungen dieser Gruppe befinden sich heute in der klinischen Anwendung, Vancomycin^[8] und Teicoplanin,^[9] und zusammen mit Gentamycin bilden diese Glycopeptide gegenwärtig die letzte Widerstandslinie in unseren Krankenhäusern.

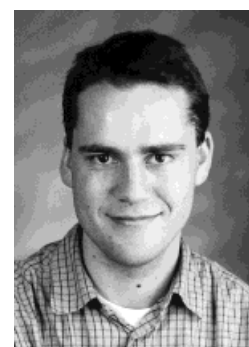
3. Die Strukturaufklärung der Glycopeptide

Im Jahr 1965 wurde zum erstenmal versucht, die Struktur von Vancomycin aufzuklären; dabei wurden *N*-Methyleucine, Glucose und Chlorphenolreste als Bestandteile des Moleküls identifiziert.^[10] Der weitere Fortschritt verlief allerdings lang-

Dudley Williams erhielt seinen Bachelortitel in Chemie 1958 an der University of Leeds und wurde dort 1961 in organischer Chemie promoviert. Anschließend war er von 1961 bis 1964 Postdoktorand an der Stanford University. Seit 1964 arbeitet er an der University of Cambridge, wo er Mitglied des Churchill College und Professor für Biologische Chemie ist. Er hat unter anderem die Struktur eines Metaboliten von Vitamin D aufgeklärt, der beim Menschen als Hormon wirkt, NMR-Shift-Reagentien entwickelt, die Peptid-Antibiotica-Gruppe der Magainine entdeckt, die Struktur der Microcystine bestimmt und Struktur und Wirkungsmechanismus von Vancomycin (und anderen Antibiotica der Vancomycin-Gruppe) aufgeklärt. 1983 wurde er zum Mitglied der Royal Society gewählt.



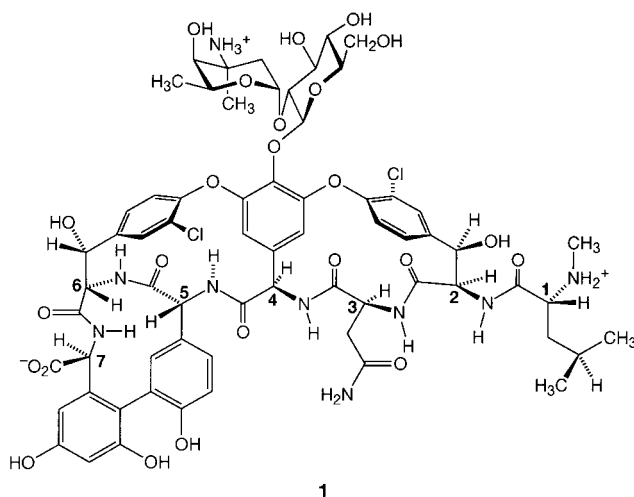
D. Williams



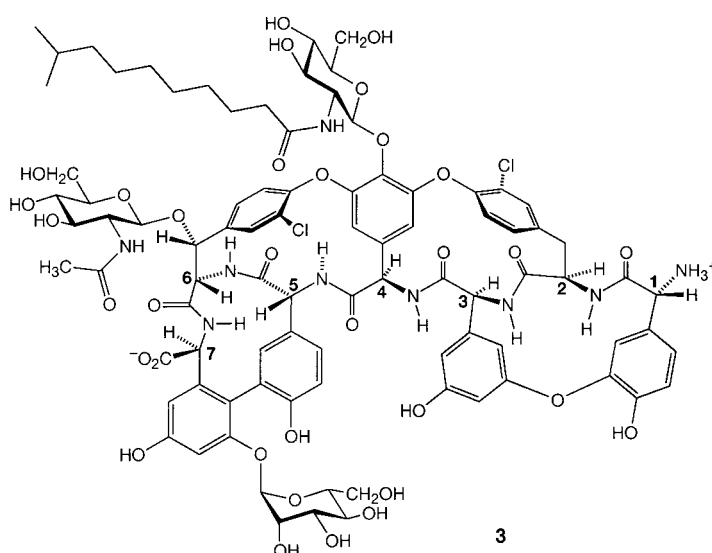
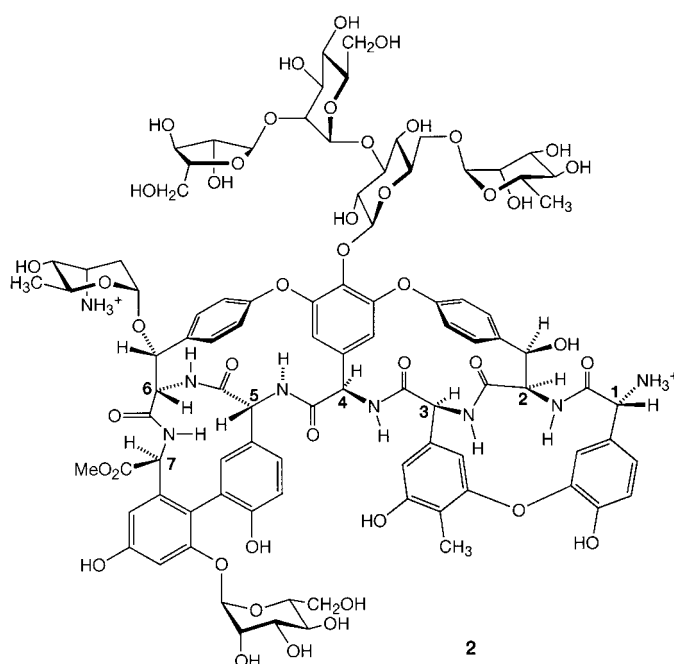
B. Bardsley

Ben Bardsley, geboren 1972 in Norwich, erhielt seinen Bachelortitel in Naturwissenschaften 1994 an der University of Cambridge. 1998 promovierte er mit einer Arbeit zu Aspekten der Kooperativität bei der molekularen Erkennung und besonders der Kooperativität bei der Wirkung von Antibiotica der Vancomycin-Gruppe unter der Anleitung von Dudley Williams an der University of Cambridge. Gegenwärtig setzt er seine Untersuchungen auf diesem Gebiet bei Dudley Williams fort.

sam, weil für die Aufklärung einer solch komplexen Struktur Techniken notwendig waren, die bis dahin noch nicht entwickelt worden waren. Wir begannen mit der Strukturaufklärung des Vancomycin im Jahr 1970 mit den sich gerade entwickelnden Methoden wie der NMR-Spektroskopie. Besonders die Nutzung des negativen Kern-Overhauser-Effekts (NOE) in der Protonen-NMR-Spektroskopie zur Ableitung von Strukturinformationen war zu dieser Zeit ein wichtiger Fortschritt.^[11] Damit gelang es uns, in der Lösungs-Konformation von Vancomycin angenähert die Abstände zwischen Protonen zu erhalten, die in der Vancomycinstruktur dicht beieinander lagen, und konnten so bis 1977 eine Partialstruktur von Vancomycin erarbeiten.^[12] Ein weiterer Fortschritt wurde mit der Aufklärung der Kristallstruktur eines Abbauproduktes von Vancomycin, CDP-1, erzielt.^[13] Die daraufhin vorgeschlagenen Strukturen für Vancomycin waren jedoch nicht korrekt, weil eine falsche Konformation eines chlorierten aromatischen Rings und ein Isoasparaginrest (anstelle eines Asparaginrestes) angenommen wurden. Den ersten Fehler korrigierten wir selbst,^[14] den zweiten Harris und Harris,^[15] womit die heute akzeptierte Struktur **1** vorlag.



Die zunehmende Weiterentwicklung der Protonen-NMR-Spektroskopie brachte es mit sich, daß die Strukturbestimmung anderer Verbindungen der Vancomyningruppe relativ schnell im Vergleich zu den Pionierarbeiten an Vancomycin durchgeführt werden konnte. Beim Ristocetin A **2** wurden wichtige Arbeiten über die Zuckerreste in Ungarn durchgeführt,^[16] während die Struktur des Peptidteils in unserer eigenen Gruppe aufgeklärt wurde.^[17] Danach konnten wir bis 1984 die Struktur von Teicoplanin **3** vollständig bestimmen.^[18] Von diesen beiden Antibiotica ist Teicoplanin neben Vancomycin die einzige andere Verbindung aus der Gruppe, die klinische Bedeutung erlangt hat. Ristocetin A wurde in einigen Kliniken in den späten 50er Jahren eingeführt, wurde aber wenig später zurückgezogen, nachdem mehrere Patienten an den Nebenwirkungen gestorben waren. Diese beiden Antibiotica verkörpern die Strukturvariationen innerhalb der Gruppe: Ristocetin A ist die einzige bisher entdeckte Verbindung der Gruppe, die ein Tetrasaccharid (statt eines Mono- oder Disaccharids) an der Seitenkette des vierten Aminosäurerestes des Peptidrückgrats aufweist, während sich



an der entsprechenden Position bei Teicoplanin eine C₁₁-Acylseitenkette, gebunden an einen Glucosaminrest, befindet. Diese Seitenkette sorgt für die vorteilhaften pharmakologischen Eigenschaften von Teicoplanin (zu weiteren Details siehe unten). Bis heute wurden die Strukturen von über 100 Glycopeptidantibiotica aufgeklärt.

Alle bekannten Glycopeptidstrukturen enthalten ein Peptidrückgrat aus sieben Aminosäuren. Numeriert man sie beim N-Terminus beginnend von 1 bis 7, befinden sich an den Positionen 4 und 5 stets *p*-Hydroxyphenylglycinreste, an den Positionen 2 und 6 Tyrosinreste und an Position 7 3,5-Dihydroxyphenylglycin. In vielen der bis heute beschriebenen Antibiotica sind die Reste 1 und 3 aliphatische Aminosäuren. Beispielsweise ist Rest 1 gewöhnlich *N*-Methylleucin und Rest 3 Asparagin (z. B. in Vancomycin **1**). An beiden Positionen können sich allerdings auch aromatische Aminosäuren befinden wie bei Ristocetin A **2** und Teicoplanin **3**; in diesen Verbindungen ist Rest 1 wieder *p*-Hydroxyphenylglycin und

Rest 3 3,5-Dihydroxyphenylglycin (im Falle von Ristocetin A auch *p*-methylert). Sind die Reste 1 und 3 aromatisch, sind sie manchmal quervernetzt. In allen Fällen, in denen die Konfiguration untersucht wurde, ist sie an den α -C-Atomen der Aminosäuren 1 bis 7 *R,R,S,R,R,S,S*. Andere bemerkenswerte Strukturelemente, die zwischen verschiedenen Verbindungen der Gruppe unterschiedlich sein können, sind Chlorsubstituenten an den aromatischen Ringen der Reste 2 und/oder 6 (z. B. bei **1** und **3**), eine β -Hydroxygruppe an den Resten 2 und 6 (z. B. bei **1** und **2**) und Zuckerreste an den Seitenketten von Rest 4 (z. B. bei **1–3**), Rest 6 (z. B. bei **2** und **3**) und Rest 7 (z. B. bei **2** und **3**). Die Kombination ungewöhnlicher Strukturelemente in diesen Antibiotica ist einerseits von entscheidender Bedeutung für den Einsatz in der Klinik und bildet andererseits eine erhebliche Herausforderung für Syntheschemiker. Vor kurzem wurden jedoch Totalsynthesen des Aglycons von Vancomycin vollendet und von den Gruppen von Evans^[19] und von Nicolaou^[20] publiziert.^[*]

4. Beobachtungen zur Biosynthese der Glycopeptide

Eine Untersuchung der Strukturen **1–3** erlaubt einige begründete Spekulationen über ihre Biosynthese. Es ist plausibel anzunehmen, daß die Quervernetzung aller aromatischen Aminosäureseitenketten in **2** und **3** (1 mit 3, 2 mit 4, 4 mit 6 und 5 mit 7) über eine oxidative Phenolkupplung verläuft. Bei den beiden ersten dieser hypothetischen Kupplungen wird ein Sauerstoff- mit einem Kohlenstoffatom verbunden, bei der Kupplung der Reste 5 und 7 werden dagegen zwei Kohlenstoffatome verknüpft. Unsere Experimente zur Biosynthese von Vancomycin und Ristocetin A stimmen mit diesen Annahmen überein. Zum Beleg ordneten wir zunächst die Signale in den ¹³C-NMR-Spektren von Vancomycin^[21] und Ristocetin A^[22] zu. Dann wurde eine Fermentation des vancomycinproduzierenden Organismus mit [1,2-¹³C]Acetat versetzt. Das ¹³C-NMR-Spektrum des entstandenen Produkts wies eine Anreicherung mit [1,2-¹³C]Acetat an allen acht Kohlenstoffatomen von Rest 7 in einer Weise auf, die mit einer Entstehung aus vier Acetateinheiten in Einklang war.^[23] Mit einem ähnlichen Fütterungsexperiment mit dem Produzentenstamm von Ristocetin A wurde für dieses Antibiotikum ein ähnlicher Ursprung von Rest 7 und auch von Rest 3 nachgewiesen.^[24] Die Synthese der beiden Antibiotica wurde auch in Medien untersucht, die mit isotonenmarkiertem Tyrosin und Phenylglycin versetzt waren. Die Analyse der Produkte ergab, daß 1) die Reste 2 und 6 in beiden Fällen von Tyrosin abstammen und 2) die Reste 4 und 5 ebenfalls in beiden Fällen aus Tyrosin stammen (ebenso wie Rest 1 in Ristocetin A).

Offensichtlich kann der Produktionsorganismus den *p*-Hydroxyphenylglycinrest aus Tyrosin herstellen. Aus der Untersuchung von Vancomycin ergab sich auch, daß die

benzyliischen Hydroxygruppen in den Resten 2 und 6 unter Retention der Konfiguration eingeführt werden.^[23]

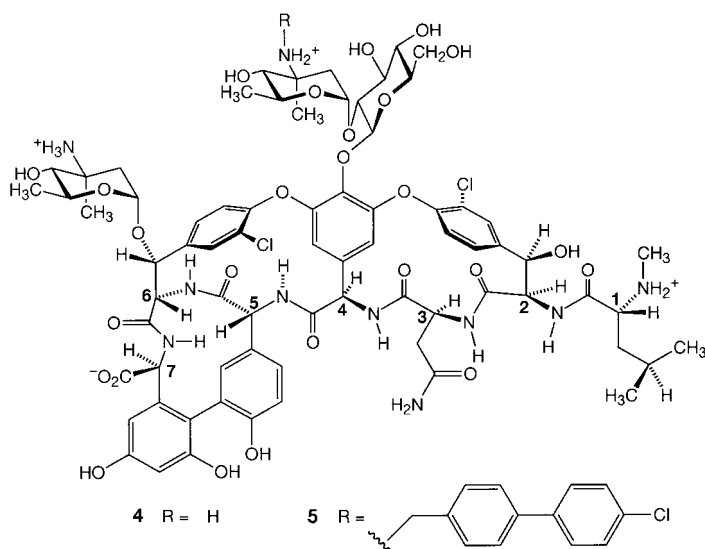
Eine Konsequenz der Sequenz *R,R,S,R,R,S,S* für die Konfiguration der Chiralitätszentren an den α -C-Atomen der Aminosäurereste 1–7 ist, daß das Peptidrückgrat nicht die β -Faltblatt-Konformation einnimmt, die man oft bei ausgedehnten Polypeptiden findet, die nur aus *S*-Aminosäuren bestehen. Wie wir weiter unten sehen werden, wurde durch die natürliche Selektion aus diesem Rückgrat etwas viel Subtileres.

5. Sequenzierung und Analyse der Gene, die an der Biosynthese der Vancomycine beteiligt sind

Anhand der oben beschriebenen Versuche sieht man, daß die Biosynthese der Vancomycine komplex ist und Komponenten aus dem Polyketidstoffwechselweg (Acetatbausteine) sowie von Tyrosin abgeleitete Komponenten beteiligt sind. Auch die Aminozucker wie Vancosamin, 4-*epi*-Vancosamin und Ristosamin, die bei einigen Verbindungen dieser Gruppe vorkommen (z. B. bei **1** und **2**), müssen vom Produktionsstamm vor der Anbindung an das antibiotische Heptapeptid-Rückgrat synthetisiert werden. Es ist daher zweckmäßig, zu untersuchen, ob die Gene, die die Biosynthese dieser Aminozucker kodieren, mit den Genen für die Biosynthese des zentralen Heptapeptids geclustert sind, und welcher Art die Enzyme sind, die die Quervernetzung der Seitenketten durch oxidative Phenolkupplung katalysieren und die die regiospezifische Einführung der Chloratome katalysieren. Außerdem wird es durch das Klonieren ausgewählter Enzyme aus der Antibiotica-Biosynthese oder durch direkte Manipulation der Cluster der Biosynthese-Gene vielleicht möglich, neue und hoffentlich effizientere Antibiotica zu produzieren, die so entworfen wurden, daß sie Strukturelemente enthalten, die nachgewiesenermaßen zum Wirkungsmechanismus beitragen. Diese Methode ist besonders deshalb nützlich, weil selektive chemische Modifikationen der Antibioticastruktur keine triviale Aufgabe sind. Es war daher wünschenswert, mindestens für eines der Glycopeptidantibiotica die DNA-Sequenz der Synthesegene zu bestimmen.

Um dieses Ziel zu erreichen, mußten zunächst die Gene für die Glycopeptid-Biosynthese lokalisiert werden. Die Schlüsselschritte zur Lösung dieses Problems wurden von Zmijewski und Briggs bei Eli Lilly durchgeführt, die die Zucker Vancosamin und Glucose von Rest 4 von Vancomycin (durch eine gut bekannte säurekatalysierte Spaltung) entfernten und so Aglucovancomycin erhielten.^[25] Sie stellten dann einen zellfreien Extrakt der Enzyme des vancomycinproduzierenden Stammes her und fraktionierten ihn chromatographisch. Ein Enzym (eine Glucosyltransferase) des Biosyntheseweges wurde lokalisiert, indem die Fraktion identifiziert wurde, die die Addition von Glucose an Rest 4 von Aglucovancomycin katalysieren konnte. Ein kleiner Teil der Peptidsequenz des gereinigten Enzyms wurde bestimmt, und danach wurden entsprechende cDNA-Sonden synthetisiert, mit denen der Gencluster der Biosynthese-Gene für Vancomycin lokalisiert wurde. Die Gene für die Produktion von Chloreremomycin **4** (auch als Chlororienticin, LY264826 und A82846B bezeich-

[*] Eine Übersicht zu Chemie, Biologie und medizinischen Anwendungen von Vancomycin-Antibiotica wird in Kürze in dieser Zeitschrift erscheinen: K. C. Nicolaou, C. N. C. Boddy, S. Bräse, N. Winssinger, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, im Druck; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, im Druck.



net) wurden anschließend in ähnlicher Weise lokalisiert. Bei Eli Lilly in Indianapolis wurden die Gene für die Chloreremomycin-Biosynthese auf zwei Cosmiden isoliert. Von einem dieser Cosmide sequenzierten Mitarbeiter des Unternehmens 5.7 kb DNA, die drei Enzyme kodieren.^[26] Diese Enzyme (als Glycosyltransferasen bekannt) sind für die Modifizierung des Heptapeptid-Kerns von Chloreremomycin mit drei Zuckern verantwortlich. Dabei entsteht das vollständig glycosylierte Antibiotikum. Anschließend erhielten wir die Cosmide freundlicherweise von Eli Lilly und bestimmten in Zusammenarbeit mit dem Sanger Centre in Hinxton Hall, Cambridge, die Sequenz von 72 kb DNA, die den vollständigen Biosyntheseweg von Chloreremomycin kodieren.^[27]

Die Analyse dieser 72 kb genomischer DNA (z. B. durch Identifizierung von Start- und Stop-Codons und durch Homologievergleich mit bekannten Proteinsequenzen) führte zu 39 möglichen Genen (Abbildung 2). Davon befinden sich 33 auf dem gleichen DNA-Strang, die übrigen sechs Gene (17, 32 und 36–39 in Abbildung 2) liegen auf dem Gegenstrang. Etwa die Hälfte der erwarteten Genprodukte sind eindeutig an der Biosynthese des Antibiotikums beteiligt. Die natürliche Selektion hat also zur Clusterung vieler Gene geführt, die Enzyme dieses Biosyntheseweges kodieren. Die Enzyme, die aus etwa 10000 Aminosäuren bestehen, katalysieren die Biosynthese von Molekülen mit einem Molekulargewicht von nur 1400–2300 Dalton; dieses Verhältnis weist auf die Bedeutung des Biosyntheseproduktes für den Produzentenstamm hin. Im folgenden wird die Funktion einiger dieser Enzyme näher betrachtet.

6. Peptidsynthetasen: die Synthese des linearen Heptapeptidkerns

Einige Schlußfolgerungen über den Biosyntheseweg des Heptapeptidkerns lassen sich ableiten, weil die beteiligten Proteine eine große Homologie mit bekannten Peptidsynthetasen aufweisen. Diese Peptidsynthetasen sind eine Klasse großer multifunktioneller Enzymkomplexe, die die nicht-ribosomale Bildung kleiner Peptide (z. B. die Sekundärmetaboliten Gramicidin und Surfactin)^[28] katalysieren.^[29–31] Im Falle der Chloreremomycin-Biosynthese enthalten sie insgesamt etwa 9000 Aminosäuren und katalysieren die Biosynthese des Heptapeptid-Rückgrats des Antibiotikums, die vor der Modifikation mit Zuckern und sehr wahrscheinlich auch vor der Bildung von Quervernetzungen erfolgt.

Die Biosynthese umfaßt die Kondensation von sieben Aminosäuren und läuft vom N- zum C-Terminus in einem Prozeß ab, der als Multienzym-Thiomatrisen-Mechanismus bezeichnet wird.^[29, 31, 32] Im ersten Schritt werden die benötigten Aminosäuren als Aminoacyladenylate aktiviert. Dann wird jede Aminosäure kovalent (als Thioester) auf einen enzymgebundenen 4'-Phosphopantethein-Cofaktor übertragen.^[33] Die Peptidsynthese erfolgt durch die Bildung einer Amidbindung an den Kontaktstellen der aktivierenden Domänen. Die wachsende Peptidkette wird vom 4'-Phosphopantetheinrest eines Moduls auf das nächste übertragen, wobei die Kettenlänge jeweils um eine Aminosäure zunimmt.

Innerhalb der drei multifunktionalen Peptidsynthetase-Enzymkomplexe kann man sieben „Module“ ausmachen (Abbildung 3). Jedes dieser Module erkennt eine spezifische Aminosäure, aktiviert sie (bevor sie an eine andere Aminosäure gebunden wird), kehrt wenn nötig die Stereochemie am

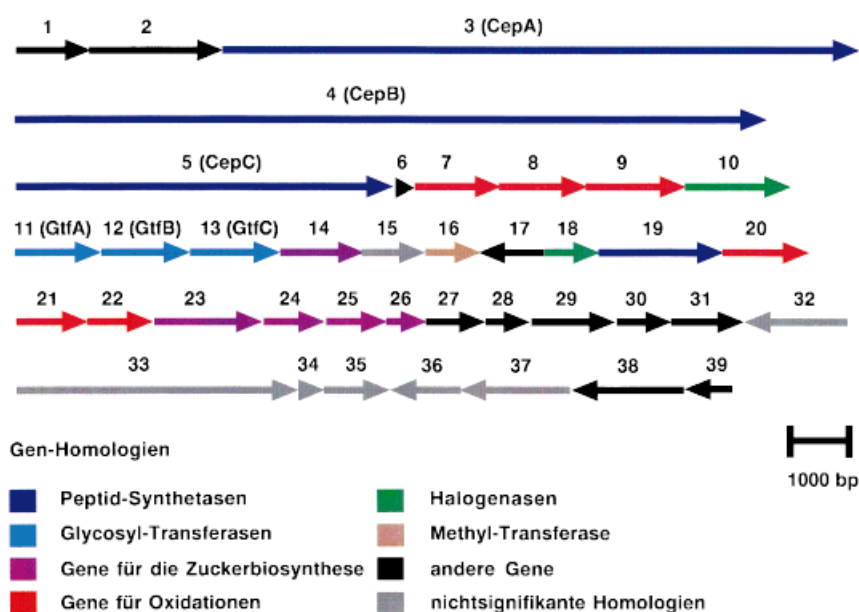


Abbildung 2. Schematische Darstellung der Gene, die auf den Cosmiden pCZA363 (1–9) und pCZA361 (10–39) liegen, und der möglichen enzymatischen Rolle der gebildeten Proteine in der Biosynthese von Chloreremomycin 4. (Wir danken Dr. P. F. Leadlay für die Mitteilung, daß das Produkt von Gen 16 Eigenschaften hat, die man von einer N-Methylase erwartet (möglicherweise ist es an der N-Methylierung von Leucin beteiligt). So gesehen ist das Produkt von Gen 14 wahrscheinlich die C-Methyltransferase für die C-Methylierung von 4-*epi*-Vancosamin (siehe auch Schema 1) und nicht eine Hydroxylase wie ursprünglich von Solenberg et al.^[26] vorgeschlagen.)

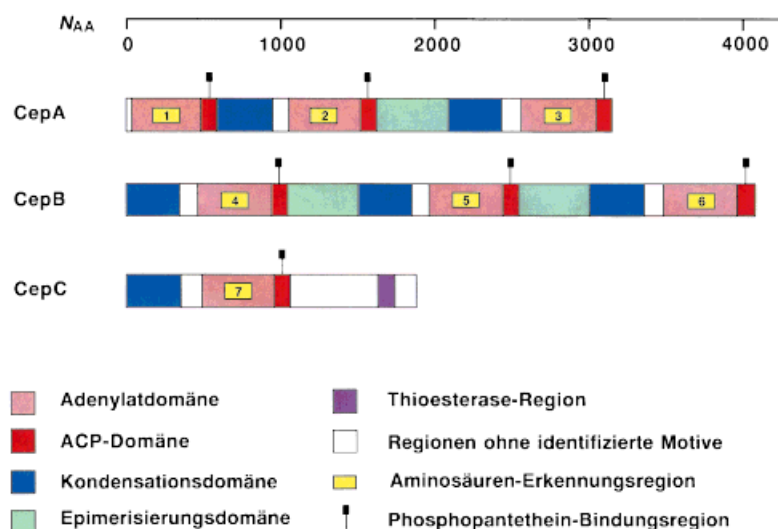


Abbildung 3. Schematische Darstellung der funktionellen Organisation der drei Peptidsynthetasen CepA, CepB und CepC, die die Synthese des Heptapeptidrückgrats von Chloreremomycin **4** katalysieren. Mit 1–7 sind nacheinander die aminosäureaktivierenden Domänen auf jeder Peptidsynthetase bezeichnet. Die Zahl der Aminosäuren (N_{AA}) je Domäne der Enzyme kann anhand der Skala abgeschätzt werden.

α -C-Atom um und kondensiert sie (durch Bildung der Amidbindung) mit der dadurch wachsenden Peptidkette. Die Domänen, die die Aminosäuren erkennen, sind mit bekannten Domänen anderer Peptidsynthetasen und in einigen Fällen auch untereinander homolog (4, 5 und 7 sowie 2 und 6). Daraus können wir zusammen mit den vorher beschriebenen Fütterungsexperimenten schließen, daß die Aminosäuren, die für die Reste 2 bis 7 verwendet werden, (*S*)-Tyrosin, (*S*)-Asparagin, (*S*)-*p*-Hydroxyphenylglycin, (*S*)-*p*-Hydroxyphenylglycin, (*S*)-Tyrosin und (*S*)-3,5-Dihydroxyphenylglycin sind. Bis allerdings weitere Experimente durchgeführt sind, können wir nicht ausschließen, daß die (*S*)-Tyrosinreste vor ihrem Einbau hydroxyliert und/oder chloriert werden. Die Domäne, die die N-terminale Aminosäure erkennt, weist keine gute Homologie zu anderen (*S*)-Leucin-erkennenden Domänen auf, ist allerdings zu 49 % mit der (*S*)-Aminobuttersäure-erkennenden Domäne (die als Epimerisierungsdomäne fungiert), die an der Pristinamycin-Biosynthese beteiligt ist, identisch.^[34] In Verbindung mit anderen Hinweisen (siehe unten) erscheint es möglich, daß das Substrat für Rest 1 (*R*)-Leucin (oder sein *N*-Methyl-Analogon) ist.

Da die Konfiguration des Rückgrates *R,R,S,R,R,S,S* ist, sollte man erwarten, daß die Module 1, 2, 4 und 5 ein Enzym enthalten, das die Konfiguration von *S* nach *R* invertiert. Tatsächlich läßt sich dies in den Modulen 2, 4 und 5 nachweisen, nicht jedoch in Modul 1 (Abbildung 3).^[27] Zwei interessante Punkte lassen sich daraus ableiten. Erstens müssen die Phenylglycinreste in den Positionen 4 und 5, obwohl sie aus Tyrosin synthetisiert werden können, anfangs als *S*-Isomere vorliegen (es wurde aus anderen Ergebnissen geschlossen, daß die Epimerisierung zu *R*-Aminosäuren in der Kette im allgemeinen im Peptidylstadium erfolgt).^[29, 35] Zweitens sieht es so aus, daß (*R*)-Leucin oder sein *N*-Methyl-

Analogon (Rest 1) direkt als Substrat für den Biosyntheseapparat dienen können (siehe oben).^[27]

Weiterhin bemerkenswert ist, daß es drei Multienzymkomplexe gibt (Gene 3, 4 und 5 in Abbildung 2, wo sie auch als CepA, CepB und CepC bezeichnet sind). Dies war so nicht vorhersehbar, und es ist vielleicht eine Laune der Natur bei der Evolution des Biosyntheseapparates. Das erste (CepA) ist für die Biosynthese des N-terminalen Tripeptids verantwortlich. Die Kondensationsdomäne, die die Kondensation des Tripeptids mit dem nächsten Rest in der Kette katalysiert, ist am Anfang des nächsten Multienzymkomplexes (CepB) lokalisiert. Insgesamt ist der zweite Komplex (CepB) für die Verlängerung des Tripeptids zum Hexapeptid verantwortlich. Die Kondensationsdomäne, die das Hexapeptid zum endgültigen Heptapeptid erweitert, befindet sich am Beginn des dritten Komplexes (CepC). Dieser sorgt auch für die Erkennung und die Aktivierung der siebten Aminosäure und für die Freisetzung des

Heptapeptids vom Biosyntheseapparat (an den es als Thioester gebunden ist) durch die Aktivierung einer Thioesterase.

7. Oxidative Reaktionen

Um das lineare Heptapeptid, das auf dem oben beschriebenen Weg entstanden ist, in die Chloreremomycin-Struktur (ohne die Zuckerreste) umzuwandeln, sind sieben oxidative Schritte notwendig: die Einführung der β -Hydroxygruppen an den Tyrosinresten 2 und 6, die Kupplung der Ringe 5 mit 7, 4 mit 6 und 4 mit 2 sowie die Einführung der Chloratome in die Ringe 2 und 6. Aus der DNA-Sequenz lassen sich tatsächlich Hinweise auf acht Enzyme (Gene 7–10, 18 und 20–22) ableiten, die an den oxidativen Prozessen beteiligt sein könnten.^[27] Davon sind die Gene 10 und 18 mit Nicht-häm-Haloperoxidasen homolog und sind daher wahrscheinlich an der Einführung der beiden Chloratome in das Antibiotikum beteiligt. Wie bereits erwähnt, kann nicht ausgeschlossen werden, daß die Hydroxylierung und/oder die Chlorierung vor der Synthese des linearen Heptapeptids abläuft.

8. Biosynthese von 4-*epi*-Vancosamin und die Anknüpfung von Zuckern an das oxidierte und cyclisierte Heptapeptid-Gerüst

Sobald das cyclisierte und oxidierte Peptid verfügbar ist, müssen zwei Moleküle 4-*epi*-Vancosamin und ein Molekül Glucose angehängt werden. 4-*epi*-Vancosamin ist ein *L*-Amino-2,6-didesoxyzucker. Obwohl *L*-Amino-2,6-didesoxy-

zucker in Sekundärmetaboliten recht häufig vorkommen, findet man sie ansonsten wenig in der Natur. Es war daher wahrscheinlich, daß die Gene für die Biosynthese des Zuckers geclustert mit den anderen Biosynthesegenen vorkommen, was sich auch tatsächlich nachweisen ließ.^[27] Wie bei anderen 6-Desoxyzuckern wie Daunosamin und Mycarose^[36–38] sollte auch hier die Biosynthese über eine NDP-4-Keto-6-desoxyglucose-Zwischenstufe verlaufen (NDP = Nucleotiddiphosphat). Die Enzyme für die Synthese dieses Schlüsselintermediats wurden nicht innerhalb des Clusters gefunden, doch es ist möglich, daß allgemeine zelluläre Pools dieser Vorstufe für die Synthese von 4-*epi*-Vancosamin genutzt werden, wie dies kürzlich von Summers et al. für die Biosynthese von Mycarose und die Desosaminzucker in Erythromycin vorgeschlagen wurde.^[36]

Mit NDP-4-Keto-6-desoxyglucose als Vorstufe ließ sich aufgrund von Homologien zu Enzymen der Daunosamin- und Mycarose-Biosynthese^[36, 38, 39] ein möglicher Stoffwechselweg zu 4-*epi*-Vancosamin ableiten (Schema 1).^[27] Fünf potentielle Enzyme wurden identifiziert. Das Protein, das zu Gen 26 gehört, wurde aufgrund seiner starken Homologie zu DnmU (60 % Identität) aus der Daunosamin-Biosynthese von *Streptomyces peucetius*^[38] und zu EryBVII (55 % Identität) aus der Mycarose-Biosynthese von *Saccharopolyspora erythraea*^[36] als 3,5-Epimerase identifiziert.

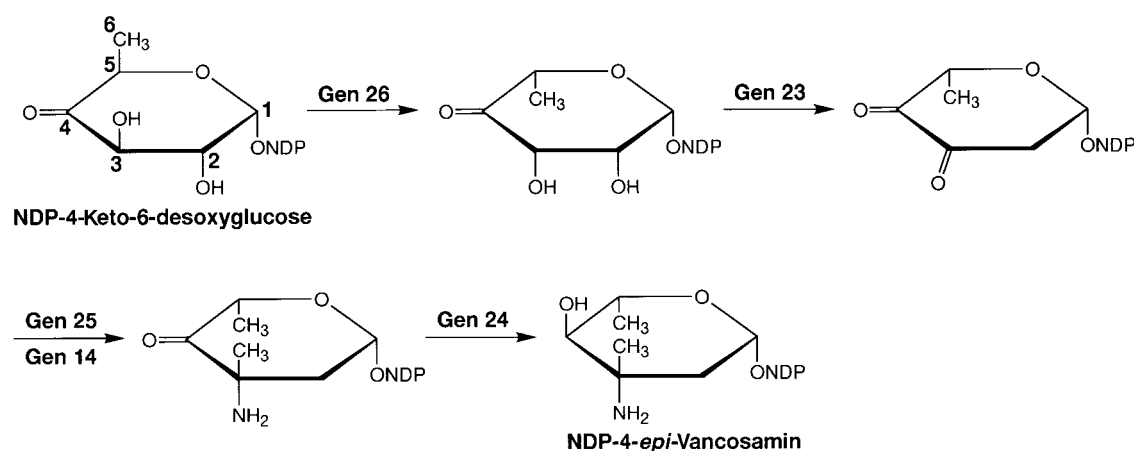
Das Enzym, das von Gen 23 kodiert wird, ist eng mit DnmT (49 % Identität) aus der Daunosamin-Biosynthese von *S. peucetius*^[39] und EryBVI (45 % Identität) aus der Mycarose-Biosynthese von *S. erythraea* verwandt, die beide die C-2-Desoxygenierung katalysieren. Im einzelnen wurde EryBVI als 2,3-Dehydratase identifiziert, und eine ähnliche Funktion wird auch für das Produkt von Gen 23 vermutet. Das Produkt von Gen 25 weist eine starke Homologie (72 % Identität) mit DnrJ aus der Daunosamin-Biosynthese auf, was auf eine Rolle bei der Einführung einer Aminogruppe hinweist.^[37, 40] wahrscheinlich mit Pyridoxamin oder Glutaminsäure als Cofaktor. Die kürzlich erfolgte Bestätigung von EryBIII als C-3-Methyltransferase in der Biosynthese von Mycarose^[41] deutet darauf hin, daß das Produkt von Gen 14, das mit dem genannten Enzym zu 28 % identisch ist, eine entsprechende Funktion in seinem Stoffwechselweg übernimmt. Der vorge-

schlagene Syntheseweg des Zuckers wird vervollständigt durch die Reduktion des C-4-Ketons durch das Enzym, das von Gen 24 kodiert wird; dieses weist nur zu EryBIV, der 4-Ketoreduktase des Mycarose-Synthesewegs von *S. erythraea*, eine starke Homologie auf (49 % Identität).^[36] Schließlich werden für die Anknüpfung von zwei Molekülen 4-*epi*-Vancosamin und einem Molekül Glucose an drei spezifischen Stellen des Antibiotiums drei Glycosyltransferasen benötigt, die durch die Gene 11–13 kodiert werden.^[26, 27]

9. Der Komplex der Glycopeptide mit Vorstufen der bakteriellen Zellwand

Ein wichtiger Befund bereits vor der Aufklärung der Vancomycinstruktur war die Beobachtung von Perkins, daß das Antibioticum an Mucopeptidvorstufen der bakteriellen Zellwand bindet, die mit der Sequenz L-Lys-D-Ala-D-Ala enden.^[42] Dieses Peptid wird als Mucopeptidvorstufe bezeichnet, weil es ein Zwischenprodukt der bakteriellen Zellwandsynthese ist. Diese läuft an der Außenseite der Zelle in zwei Hauptschritten ab.^[43] Zuerst werden Disaccharideinheiten mit anhängenden Peptiden aus dem Cytoplasma zur Außenseite der Zelle exportiert, wo sie durch eine Transglycosylase miteinander verknüpft werden (Abbildung 4). Danach werden die langen Polysaccharidketten zur Verbesserung der mechanischen Belastbarkeit über die Peptidketten durch eine Transpeptidase quervernetzt. Das Enzym erkennt die Sequenz -D-Ala-D-Ala am Ende der Peptidkette, spaltet den endständigen Alaninrest ab und verbindet den Rest mit einer Peptidkette von einem benachbarten Polysaccharid. Zur Zeit von Perkins Entdeckung (1969) konnte daraus wenig über den molekularen Wirkungsmechanismus von Vancomycin abgeleitet werden, weil die Struktur des Antibiotiums noch unbekannt war.

Als die Struktur von Vancomycin dann endlich aufgeklärt war, konnte auch die molekulare Basis für die Bindung des Antibiotiums an die Mucopeptidvorstufen, die endständig Lys-D-Ala-D-Ala tragen, bestimmt werden. Dies gelang anhand der Protonen-NMR-Spektren der Komplexe aus dem Antibioticum und Analoga der bakteriellen Mucopeptidvor-



Schema 1. Postuliertes Reaktionsschema für die Biosynthese von NDP-4-*epi*-Vancosamin, ausgehend von NDP-Glucose; gezeigt sind die vermutlich beteiligten Enzyme durch Verweis auf die Gene, die in Abbildung 2 erläutert sind.

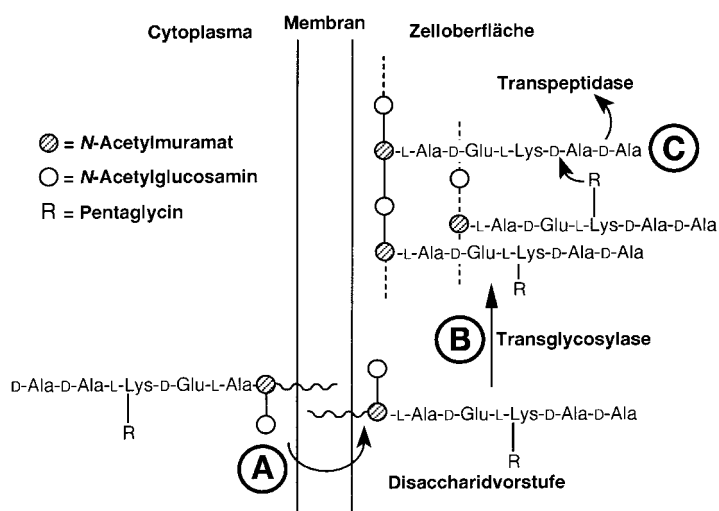
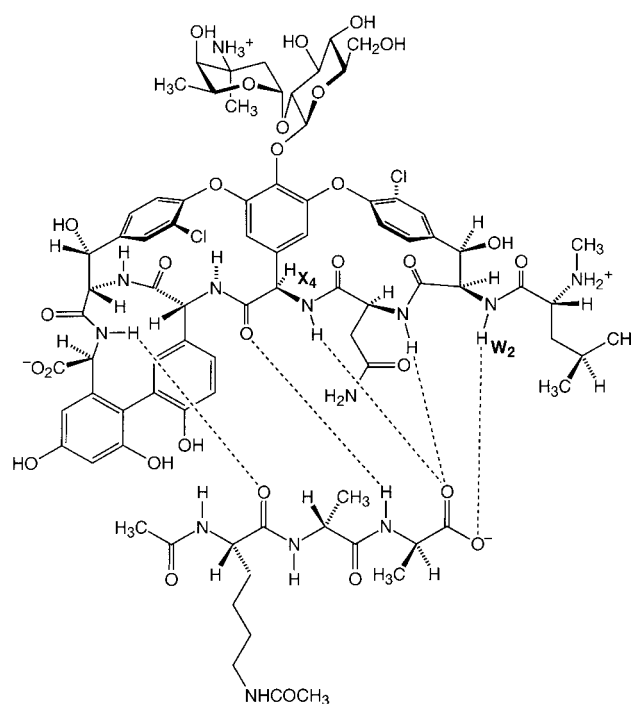


Abbildung 4. Schematische Darstellung der Peptidoglycan-Biosynthese. Die Disaccharidvorstufe wird durch die Membran transportiert (A) und durch eine Transglycosylase an die wachsende Polysaccharidkette angeknüpft (B). Die mechanische Stärke erhält die Zellwand durch die Quervernetzung benachbarter Polysaccharidketten (C). Die Quervernetzung erfolgt durch eine Transpeptidase, die den C-terminalen D-Alaninrest des Pentapeptids abspaltet. Die dabei freigelegte Carboxylatgruppe bildet dann eine Peptidbindung zum freien N-Terminus des Brückenrestes R. Die Zusammensetzung des dargestellten Peptids entspricht dem von *Staphylococcus aureus*.

stufen (*N*-Acetyl-D-alanyl-D-alanin (Ac-DADA) oder *N*- α -Acetyl-*N*- ϵ -acetyllysyl-D-alanyl-D-alanin (Ac₂-KDADA)). Mehrere Schlüsselexperimente war dazu vonnöten. Das erste war die Messung der chemischen Verschiebung der Methylgruppen von Ac-DADA frei in Lösung und gebunden an das Antibiotikum. Die Hochfeldverschiebung dieser Signale im gebundenen Zustand deutete darauf hin, daß sich die Methylgruppen über den aromatischen Ringen des Antibiotikums befinden. Als zweites wurden die Amid-NH-Protonen des Antibiotikums, die an der Wasserstoffbrückenbindung mit der Carboxylatgruppe des Liganden beteiligt sind, anhand der Amid-NH-NMR-Signale identifiziert. Diese waren im Komplex mit dem Antibiotikum zu niedrigerem Feld verschoben, was für solch eine Wasserstoffbrückenbindung charakteristisch ist. Die anderen Amid-NH-Gruppen des Antibiotikums, die an Wasserstoffbrückenbindungen zum Liganden beteiligt sind, wurden durch die Messung der Zugänglichkeit des Lösungsmittels zu jedem der Amid-NH-Protonen bestimmt. Schließlich wurden die ungefähren Abstände zwischen den Protonen des Antibiotikums und den benachbarten Protonen des Liganden anhand von NOE-NMR-Daten ermittelt. Dies ist unseres Wissens das erste Mal, daß über intermolekulare NOE-Effekte die Struktur eines bimolekularen Komplexes bestimmt wurde.^[11] Solche Bestimmungen wurden in den frühen 80er Jahren für die Bindung von Peptiden mit endständigem -D-Ala-D-Ala an Ristocetin A,^[44] Vancomycin^[45] und Teicoplanin^[46] durchgeführt und bildeten die Grundlage für das Bindungsmodell in Schema 2. Dieses Modell, nach dem das Carboxylatanion des Liganden an drei benachbarte Amidprotonen des Antibiotikums bindet, ist vor kurzem röntgenkristallographisch bestätigt worden.^[47–49]

Alle drei Antibiotica **1–3** binden an die Mucopeptidvorstufe Ac₂-KDADA bei Raumtemperatur in wäßriger Lösung



Schema 2. Gedeckte Darstellung der bindenden Wechselwirkungen zwischen Glycopeptidantibiotica (hier Vancomycin) und dem Zellwand-Analogon Ac₂-KDADA. Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Verbindungen sind durch gestrichelte Linien angedeutet. Die Bindung wird außerdem durch hydrophobe Wechselwirkungen verstärkt, vor allem durch die zwischen den Ala-Methylgruppen und den aromatischen Ringen des Antibiotikums. Das Amid-NH-Proton w₂ und das α -Proton x₄ sind gekennzeichnet.

mit etwa 10^6 M^{-1} und an das Dipeptid Ac-DADA mit 10^5 – 10^6 M^{-1} .^[50] Die Hauptbindungsaffinität liegt also in der Erkennung des N-acetylierten Dipeptids. Um den Ursprung dieser Affinität (mit Blick auf Schema 2) zu verstehen, müssen folgende Wechselwirkungen betrachtet werden:

- 1) die Bindung des Carboxylatanions des C-terminalen D-Alaninrestes in der Tasche der drei Amid-NH-Gruppen der Reste 2–4 des Antibiotikums (die Bildung dieser Tasche hängt entscheidend von der *R,R,S,R*-Konfiguration der Reste 1–4 ab);^[51]
- 2) die Bildung von zwei Amid-Amid-Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem acetylierten Dipeptid und dem Antibiotikum;
- 3) die hydrophobe Wechselwirkung zwischen den Alanin-Methylgruppen und den Kohlenwasserstoffabschnitten des Antibiotikums.

Das relative Gewicht der einzelnen Beiträge kann wegen der komplexen Natur der Kooperativität zwischen den schwachen Wechselwirkungen nur halbquantitativ bestimmt werden. Aus unseren Untersuchungen geht allerdings klar hervor, daß eine wirksame Bindung entscheidend von der Bindung der Carboxylatgruppe (Faktor 1) abhängt. Diese Wechselwirkung liefert auch den größten Beitrag zur Exothermie (20 – 30 kJ mol^{-1}) bei der Komplexbildung.^[52] Daß die Carboxylatgruppe durch die Tasche der drei NH-Gruppen des Antibiotikums stärker gebunden wird als durch Wasser, rührt wahrscheinlich daher, daß die drei sich abstoßenden NH-Enden der assoziierten CO-NH-Dipole während der Biosyn-

these des Antibioticums unter Energieaufwand zusammengezwungen werden können. Zusammen können sie die negative Carboxylatgruppe besser solvatisieren als Wassermoleküle, die (in Abwesenheit eines Templats, das ihre Position fixiert) ihre Sauerstoffatome nicht ohne Enthalpieaufwand in direkter Nachbarschaft halten können. Nach der Bindung des Carboxylats tragen die beiden Amid-Amid-Wasserstoffbrückenbindungen wenig dazu bei, die Bindungsaffinität auf direktem Weg weiter zu steigern; d.h., daß ihre intrinsischen Bindungsaffinitäten nahe Null sind. Dies zeigt sich z. B. daran, daß die Bindungsaffinität für *N*-Acetylglycin nur etwa dreimal größer ist als die für Acetat.^[53] Indirekt spielen sie allerdings eine wichtige Rolle. Erstens orientieren sie das acetylierte Dipeptid so, daß die hydrophoben Wechselwirkungen der beiden Alanin-Methylgruppen die Bindungsaffinität um einen Faktor von etwa 10^3 weiter erhöhen können. Zweitens wird durch die Energiebarrieren, die gegenüber dem Bruch dieser beiden Amid-Amid-Wasserstoffbrückenbindungen bestehen, die Bewegung des Peptidliganden in der Bindungstasche des Antibioticums eingeschränkt und so die Bindung des Carboxylatanions verstärkt.

Belege für den zweiten Effekt erhielt man durch ^1H -NMR-spektroskopische Untersuchungen. Das Signal des Amid-NH-Protons (w_2 , Schema 2) von Rest 2 des Antibioticums wird signifikant tieffeldverschoben, wenn das Carboxylat-Sauerstoffatom von Di- oder Tripeptid-Analoga der Zellwandvorstufe gebunden wird. Man nimmt an, daß das Ausmaß der Tieffeldverschiebung (gemessen im Zustand der vollständigen Bindung zwischen einem Antibioticum und einem gegebenen Zellwandanalogon) mit steigender Bindung der Carboxylatgruppe am Proton w_2 zunimmt. Experimentell stellen wir fest, daß die Grenzverschiebung des w_2 -Signals wie in Abbildung 5 dargestellt für eine Auswahl von Liganden zunimmt (diese wurden nach ihrer steigenden Affinität für das Antibioticum ausgewählt, die in Abbildung 5 auf der vertikalen Achse in Form der Freien Bindungsenthalpien der Liganden aufgetragen ist). Man erkennt deutlich, daß sich mit der Änderung der Liganden in der Reihe Acetat \rightarrow *N*-Acetyl-D-alanin (Ac-DAla) \rightarrow Ac-DADA \rightarrow Ac₂-KADA die chemische Verschiebung von w_2 im vollständig gebundenen Zustand

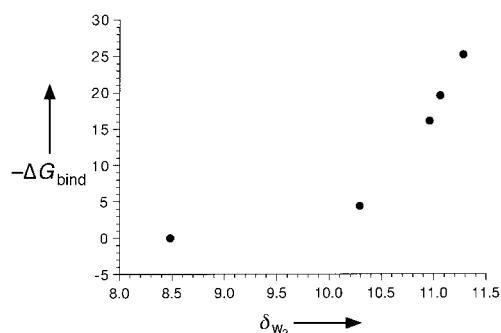
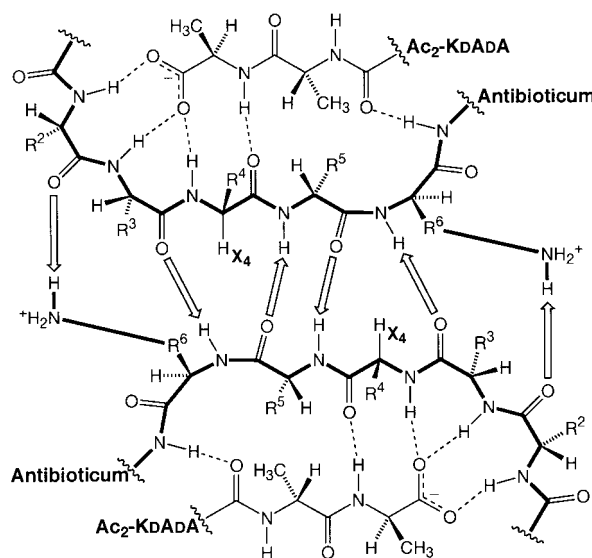


Abbildung 5. Diagramm der Freien Bindungsenthalpie ($-\Delta G_{\text{bind}}$ [kJ·mol⁻¹]) der Bindung von Peptidliganden an ein Antibioticum der Vancomycin-Gruppe gegen die chemische Verschiebung des NH-Protons w_2 . Mit zunehmender Länge des Liganden nimmt auch die Freie Enthalpie der Bindung zu, und das Signal von w_2 erscheint zu niedrigem Feld verschoben; dies ist ein Indiz dafür, daß die Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Proton w_2 und der Carboxylatgruppe stärker wird. ΔG_{bind} nimmt in der folgenden Reihe zu: kein Ligand, Acetat, Ac-DAla, Ac-DADA, Ac₂-KADA.

drastisch erhöht. Dazu kommt es, weil durch die hydrophoben Wechselwirkungen benachbarter Gruppen^[54] und durch die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen benachbarten Amid-Gruppen^[55] die Bindungsaffinität des Carboxylatanions in der Rezeptortasche des Antibioticums erhöht wird. Dieses Phänomen hat wahrscheinlich eine generelle Bedeutung bei schwachen Wechselwirkungen – durch die Gesamtheit der Wechselwirkungen zwischen benachbarten Gruppen kann eine bestehende Wechselwirkung verstärkt werden, indem die dynamische Bewegung eines Liganden in seiner Bindungsstelle eingeschränkt wird. Die Kooperativität entsteht also nicht nur durch den Entropievorteil, mehrere Wechselwirkungen am selben Molekül zu verankern (Chelat-Effekt), sondern auch durch den Bindungs- (Enthalpie-) Effekt, dies in einem spannungsfreien System zu tun. Die Enthalpiebarriere, eine Bindung zu brechen, kann nicht nur die Bewegung an einer benachbarten Stelle einschränken, sondern dadurch auch die Bindung an dieser Position verstärken.

10. Dimerisierung der Glycopeptide

1989 entdeckten wir, daß das Antibioticum Ristocetin A in wäßriger Lösung dimerisiert.^[56] Wir konnten auch die relative Orientierung der beiden Monomere in diesem Dimer und das Netz aus Wasserstoffbrückenbindungen zwischen ihnen aufklären. Im Dimer von an Ac₂-KADA gebundenem Chloreremomycin 4 (Schema 3) sind die Peptidrückgrate zweier Antibiotica-Moleküle über vier Amid-Amid-Wasserstoffbrückenbindungen aneinander gebunden, und das Ammoniumion des Aminozuckers (4-*epi*-Vancosamin), der an Rest 6



Schema 3. Struktur des Rückgrates des Chloreremomycin-Dimers, gebunden an das Zellwandvorstufen-Analogon Ac₂-KADA. Das Peptidrückgrat ist fett gezeichnet, die Wasserstoffbrückenbindungen an der Dimer-Grenzfläche sind durch offene Pfeile verdeutlicht. Wasserstoffbrückenbindungen an der Antibiotica-Ligand-Grenzfläche sind gestrichelt gezeichnet. Das α -Proton x_4 ist markiert. Die zentralen vier Wasserstoffbrückenbindungen an der Dimer-Grenzfläche sind allen Glycopeptid-Dimeren gemeinsam, während die beiden äußeren Wasserstoffbrückenbindungen nur von Antibiotica gebildet werden können, die an Rest 6 einen Aminozucker tragen.

des Antibioticums hängt, bildet eine Wasserstoffbrückenbindung zu einer Amid-Carbonylgruppe in der anderen Hälfte des Dimers, so daß insgesamt sechs Wasserstoffbrückenbindungen an der Dimer-Grenzfläche vorliegen.^[56] In Vancomycin, das diesen Aminosucker nicht enthält, bestehen nur vier intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen an der Dimer-Grenzfläche. Die Gesamtstruktur des Dimers, die wir mit Protonen-NMR-Spektroskopie bestimmten, wurde inzwischen unabhängig durch Röntgenkristallographie bestätigt.^[47, 48, 57, 58] Von allen bislang untersuchten Glycopeptiden konnten nur bei Teicoplanin und einigen seiner Derivate keine Hinweise für eine Dimerisierung in wäßriger Lösung erhalten werden.^[59]

11. Kooperativität zwischen Dimerisierung und Bindung von Analoga der Zellwandvorstufen

Ein interessantes Phänomen der Dimerisierung der Antibiotica ist, daß die Dimerisierungskonstanten bei allen bislang untersuchten Glycopeptiden (außer bei Ristocetin A) größer sind, wenn Analoga der Zellwandvorstufen gebunden sind. Das bedeutet, daß Dimerisierung und Ligandenbindung kooperativ ablaufen.^[60] In ähnlicher Weise binden Antibiotica-Dimere die Liganden stärker als die Monomere. Dies wird anhand eines thermodynamischen Cyclus deutlich, der die Bildung eines ligandengebundenen Dimers aus seinen Einzelkomponenten, also aus zwei Antibiotica-Monomeren und zwei Molekülen des Analogons der Zellwandvorstufe, zeigt.^[60] Ein Beispiel ist die Dimerisierung von Chloreremomycin **4**. Die Dimerisierungskonstante in Gegenwart von $\text{Ac}_2\text{-KdADA}$ ist etwa hundertmal größer als ohne den Liganden.^[60] Dies impliziert, daß jedes der beiden Moleküle des Analogons, die mit gleicher Affinität an das Antibiotica-Dimer binden, das Dimer etwa zehnmal stärker binden als das Monomer.

Eine Reihe von Wechselwirkungen ist offenbar für die Ausprägung der Kooperativität zwischen Ligandenbindung und Dimerisierung wichtig. Erstens sollte die Bindung des Liganden an das Monomer des Antibioticums (oder die Dimerisierung des freien Antibioticums) die Polarisierung der Amidgruppen des Antibioticums, die an Wasserstoffbrückenbindungen beteiligt sind, verstärken. Da dieselben Amidgruppen (CONH) an den Wasserstoffbrückenbindungen an der Dimer-Grenzfläche (oder Ligand-Bindungsfläche) beteiligt sind, sollten sie wegen der verstärkten Polarisierung und der infolgedessen stärkeren Dipole auch stärkere Wasserstoffbrückenbindungen bilden. Zweitens sollte das ursprünglich vorliegende Netz aus Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Rückgrat des Antibioticums (z. B. durch Ligandenbindung) die Schwingungsbewegungen der Peptiddipole einschränken. Diese Einschränkung der Bewegungsfreiheit sollte zu einer stärkeren Bindung an der zweiten Grenzfläche führen. Drittens kann man in Schema 3 erkennen, daß die Dimerisierung das Ammoniumion des 4-*epi*-Vancosaminrestes in die Nähe des Carboxylatanions der Zellwandvorstufe bringt, die an die andere Hälfte des Dimers gebunden ist. Die elektrostatische Anziehung zwischen diesen Gruppen, die durch eine Peptidbindung vermittelt wird, kann man als Pseudosalzbrücke auffassen. Diese Wechselwirkung kann nur

in Antibiotica vorkommen, die einen Aminosucker an Rest 6 tragen (z. B. Chloreremomycin **4** und Ristocetin A **2**, nicht aber Vancomycin **1**).

Mit unseren Untersuchungen zur Quantifizierung der Antibiotica-Dimerisierung^[61] konnten wir sichern, daß die Dimerisierung durch Saccharide gefördert wird, die sich oft an Position 4 des Antibioticums befinden, und durch die Aminosucker, die oft an der benzyllischen Hydroxygruppe von Rest 6 hängen. Setzt man voraus, daß die antimikrobielle Aktivität der diskutierten Glycopeptide die in der Evolution entwickelte Funktion dieser Substanzen ist, scheint es vernünftig anzunehmen, daß die Zucker dem Peptidrückgrat als Verzierung beigelegt sind, um diese Funktion zu verbessern. So gesehen führt die Beobachtung, daß die Zucker aufgrund ihrer Struktur und Position die Dimerisierung begünstigen, zu dem Schluß, daß die Dimerisierung ebenfalls für die antimikrobielle Aktivität wichtig ist. Dafür spricht auch, daß einige Glycopeptide ein Chloratom an Rest 2 tragen und daß diese Antibiotica stärker dimerisieren können als die entsprechenden chlorfreien Verbindungen. Dies paßt zur Ansicht eines Selektionsdrucks in Richtung auf dimerisierungsfähige Antibiotica, der nur dann zum Tragen kommt, wenn die Dimerisierung funktionell zum Überleben des Produzentenstammes beiträgt.

12. Die Asymmetrie der Glycopeptid-Dimere

Eine bemerkenswerte Eigenschaft aller bisher (mit Protonen-NMR-Spektroskopie und Röntgenkristallographie) untersuchter Strukturen von Glycopeptid-Dimeren ist die, daß sich Zucker an Rest 4 stets in Kopf-Kopf-Anordnung befinden, obwohl die Peptidrückgrate der Monomere relativ zueinander in Kopf-Schwanz-Ausrichtung vorliegen.^[47, 48, 57, 62–64] Dadurch werden die Dimere asymmetrisch. So treten beim Ristocetin-A-Dimer (Abbildung 6) für die 6-Methylgruppe

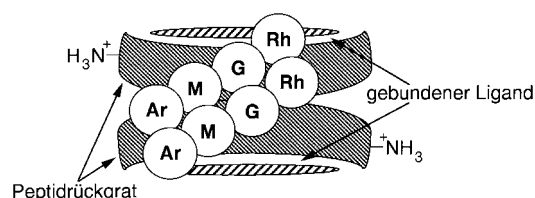


Abbildung 6. Schematische Darstellung des Ristocetin-A-Dimers mit einem Molekül eines Peptid-Zellwand-Analogons in jeder der beiden Bindungstaschen. Jede der beiden Gruppen aus vier colinearen Kreisen steht für ein Tetrasaccharid (Ar = Arabinose, M = Mannose, G = Glucose, Rh = Rhamnose), das an den Aminosäurerest 4 des Peptidrückgrats gebunden ist (siehe 2). Die Zuckerketten liegen in einer Kopf-Kopf-Anordnung vor, die Peptidrückgrate dagegen in einer Kopf-Schwanz-Anordnung. Durch diese Eigenschaft, die bisher allen an Ring 4 glycosylierten Antibiotica gemeinsam ist, werden die Dimere asymmetrisch.

der Rhamnose, die Teil des Tetrasaccharides an Rest 4 ist, zwei NMR-Signale auf ($\delta = 0.86$ und 1.27) vor.^[62] Der Rhamnosazucker in der einen Hälfte des Dimers weist eine andere Umgebung auf als der in der anderen Hälfte; ein Rhamnoseres ist weiter vom N-Terminus des Antibioticums, an dem er hängt, entfernt als der andere (Abbildung 6).^[62] Dementsprechend haben die Dimere auch zwei unterschied-

liche Bindungsstellen für die Zellwand-Mucopeptidvorstufen (Abbildung 6). Wir konnten allerdings bisher nur bei Ristocetin A nachweisen, daß die beiden Bindungsstellen für freie Zellwand-Peptidanaloga signifikant unterschiedliche Affinitäten aufweisen.^[65, 66] Bei den anderen untersuchten Antibiotica waren die Unterschiede zwischen den Bindungsaffinitäten der beiden Taschen in wäßriger Lösung sehr gering.^[67]

Es ist interessant, über die evolutive Basis für die Asymmetrie der Dimerstrukturen zu spekulieren und darüber, ob dies in Beziehung zu der Struktur und der Orientierung von Strängen der unreifen Peptidoglycan-Zellwand steht. Schäfer et al.^[47] haben bereits früher postuliert, daß die Kopf-Schwanz-Orientierung der Peptidrückgrate in einem Antibiotica-Dimer und als Konsequenz daraus die Bindung von zwei Zellwandvorstufen in einer Kopf-Schwanz-Orientierung relativ zueinander vermuten lassen, daß Vancomycin zwischen zwei verschiedene unreife Peptidoglycan-Stränge eingeschoben wird. Dies würde bedeuten, daß die benachbarten Peptidoglycan-Stränge, die von den zwei Hälften des Dimers gebunden werden, ebenfalls relativ zueinander Kopf-Schwanz-orientiert (antiparallel) sein müßten. Wir möchten allerdings eine alternative Hypothese vorschlagen. Frühere Ergebnisse zur Bindung von Glycopeptiden an Analoga von Zellwandvorstufen deuten darauf hin, daß der N-terminale Teil des Pentapeptids (-L-Ala-D-γ-Glu-) auf die Zucker an Rest 4 des Antibiotiums ausgerichtet ist.^[64] Dies würde bedeuten, daß das Antibiotikum so bindet, daß diese Zuckerreste relativ zum Peptidteil des Moleküls zur Bakterienoberfläche hin orientiert sind. Hierin kann die Ursache für die Asymmetrie des Dimers liegen. Da die Peptidoglycanstränge aus Polysaccharidketten bestehen, gibt es wahrscheinlich eine günstige Zucker-Zucker-Wechselwirkung zwischen diesen Strängen und den Zuckern an Rest 4 des Antibiotiums. Die parallele Orientierung der wechselwirkenden Saccharide des Antibiotica-Dimers würde daher eine ähnliche parallele Orientierung der Polysaccharidstränge für eine wiederholte Wechselwirkung zwischen den beiden Zuckern eines Antibiotica-Dimers und zwei Polysaccharidsträngen erfordern. Solche Wechselwirkungen zwischen dem Polysaccharid eines unreifen Peptidoglycans und den Sacchariden des Antibiotiums sind nicht untersucht worden, doch sie können ein positiver Einflußfaktor für die Lokalisierung des Antibiotiums an seinem Wirkort oder für die Bindung des Antibiotiums an sein Zielpeptid sein. Obwohl es also noch keine direkten Hinweise auf die parallele oder antiparallele Ausrichtung benachbarter unreifer Stränge des Peptidoglycans gibt, legen die Zucker-Zucker-Wechselwirkungen zwischen Antibiotica-Dimeren und den Zellwand-Polysacchariden sowie die parallele Ausrichtung der Zucker in den Dimeren nahe, daß die Stränge der Zellwand ebenfalls in paralleler Orientierung relativ zueinander synthetisiert werden.

13. Die Rolle der Dimerisierung und der Membranverankerung bei der Wirkung der Glycopeptide

Als zum erstenmal gezeigt wurde, daß die Glycopeptide dimerisieren, postulierten wir, daß dies ihre Aktivität verstärken würde, indem zwei Antibiotica-Moleküle gleichzeitig

zum Wirkort gebracht würden.^[56] Außerdem zeigten Good et al.^[68] 1990, daß das Antibiotikum Eremomycin aktiver ist als Vancomycin, obwohl es $Ac_2-KDADA$ schwächer bindet. Dieser Befund bestätigte, daß mehr für die antibiotische Aktivität notwendig ist als die Affinität für freie Zellwand-Analoga vermuten läßt (auch wenn durch die Dimerisierung kooperative Verstärkungen der Wirkung möglich sind). Uns fiel auf, daß Eremomycin viel stärker dimerisiert als Vancomycin und daß die größere Aktivität daher mit der höheren Dimerisierungskonstanten einhergehen könnte. Wir schlugen daher vor, daß die Dimerisierung die antibakterielle Wirkung dadurch begünstigt, daß eine „intramolekulare“ Bindung an die Bakterienoberfläche erleichtert wird. Dies rührt daher, daß die Zellwandvorstufen über C_{55} -Lipidketten, die in die Bakterienmembran inseriert sind, an der Oberfläche fixiert sind. Die Bindung eines Dimers an zwei solchermaßen verankerte Vorstufenmoleküle führt zur Bildung eines „intramolekularen“ Komplexes (Abbildung 7B, im Unterschied zu Abbildung 7A).^[60, 69] Diese Hypothese wurde im Hinblick

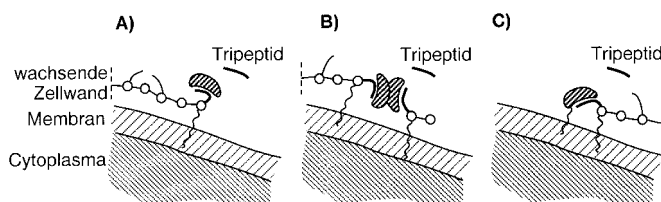


Abbildung 7. Bindungsweise von Antibiotica A) als Monomer, B) als Dimer und C) über einen Membrananker. Offene Kreise stellen Zuckereinheiten dar, und das Ende der angehängten fettgedruckten Linie steht für die Sequenz -Lys-D-Ala-D-Ala. Die fettgedruckte, nicht mit der Zuckereinheit verbundene Linie symbolisiert freies $Ac_2-KDADA$ in Lösung. A) Die Bindung eines einzelnen Antibiotica-Moleküls an die wachsende Zellwand ist eine einfache bimolekulare Assoziation (in der extern zugegebener Ligand das Zellwandpeptid verdrängen kann). B) Das Antibiotica-Dimer kann durch die im wesentlichen intramolekulare Assoziation an der Oberfläche eines Bakteriums an Wirkung gewinnen (es ist schwieriger, diese Bindung durch extern zugegebene Liganden zu lösen). C) Der günstige Effekt der intramolekularen Assoziation kann auch erreicht werden, wenn das Antibiotikum einen Membrananker aufweist (auch hier kann der Komplex nur schwerer gehemmt werden).

auf die Aktivität von Teicoplanin **3**, das nicht meßbar dimerisiert, erweitert. Teicoplanin weist eine C_{11} -Acylkette auf, die selbst in die Bakterienmembran inserieren kann und so das Antibiotikum am Wirkort fixiert und die Bildung eines „intramolekularen“ Komplexes an der Zelloberfläche erleichtert (Abbildung 7C).^[60, 69] Die Antibiotica der Vancomyningruppe können ihre antibakterielle Aktivität also entweder durch Dimerisierung (Abbildung 7B) oder durch Verankerung in der Membran (Abbildung 7C) verstärken.

Mitte der 90er Jahre begannen wir zu untersuchen, ob eine durch die Dimerisierung oder die Membranverankerung hervorgerufene Verstärkung der Bindung beobachtbar war.^[69] Dazu versuchten wir unter anderem, die Wirkung gegen Bakterien (hier gegen *Bacillus subtilis*) zu hemmen, indem wir auf Agarplatten externes $Ac_2-KDADA$ zusetzten. Die Basis für diese Experimente geht aus Abbildung 7 hervor. Wenn die Bindung in einem „intramolekularen“ Komplex (wie in Abbildung 7B und C) stärker ist als in einem intermolekularen Komplex (Abbildung 7A), sollte es schwe-

rer sein, diese „intramolekulare“ Bindung durch von außen zugegebenes $\text{Ac}_2\text{-KDADA}$ zu hemmen. Dies bestätigte sich im Versuch, denn es war etwa fünfmal mehr freies $\text{Ac}_2\text{-KDADA}$ nötig, um die Aktivität von Teicoplanin gegenüber der des Antibiotikums $\text{TA}_3\text{-1}$ (Teicoplanin ohne die C_{11} -Acylkette) zu unterdrücken, und sogar etwa tausendmal mehr freies $\text{Ac}_2\text{-KDADA}$ war nötig, um Eremomycin zu hemmen (Abbildung 8).^[69] Weitere Experimente ergaben, daß tatsäch-

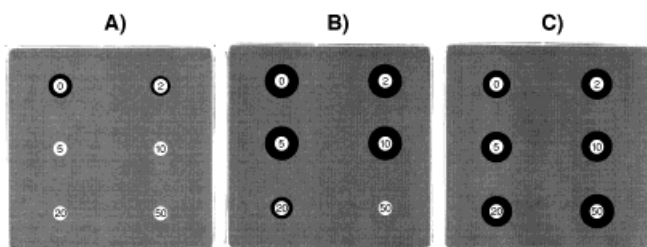


Abbildung 8. Agardiffusionsplatten, die den Einfluß von extern zugegebenem $\text{Ac}_2\text{-KDADA}$ auf die Hemmung des Wachstums von *Bacillus subtilis* durch drei repräsentative Antibiotica verdeutlichen. Die dunklen Kreise sind Flächen, auf denen die Bakterien durch die Antibiotica auf den Papierplättchen (weiße Kreise) abgetötet wurden. Der Durchmesser des dunklen Kreises ist ein Maß für die Wirksamkeit des Antibiotikums. Jedes Papierplättchen enthielt 1 mg Antibiotikum. A) $\text{TA}_3\text{-1}$ (dimerisiert nicht und besitzt keinen Membrananker), B) Vancomycin (dimerisiert schwach) und C) Eremomycin (dimerisiert stark). Auf jedem weißen Kreis ist eingetragen, wieviel $\text{Ac}_2\text{-KDADA}$ (in mg) zusätzlich auf das Plättchen gegeben wurde. Die geringe Zunahme der Radien der dunklen Kreise in C) weist als Funktion des zugegebenen $\text{Ac}_2\text{-KDADA}$ auf den bemerkenswerten Potenzierungseffekt hin, der in Lit. [68, 69] beschrieben ist.

lich eine Korrelation zwischen dem Betrag an externem $\text{Ac}_2\text{-KDADA}$, der für die Hemmung erforderlich war, und der Dimerisierungskonstante des Antibiotikums besteht.^[69] Die Zunahme der erforderlichen Menge an $\text{Ac}_2\text{-KDADA}$ für stärker dimerisierende Antibiotica (Abbildung 9) gibt die Verstärkung der kooperativen Bindung an, die durch die Bindung des Dimers im Vergleich zur Bindung des Monomers an die Bakterienoberfläche erzielt wird.^[70]

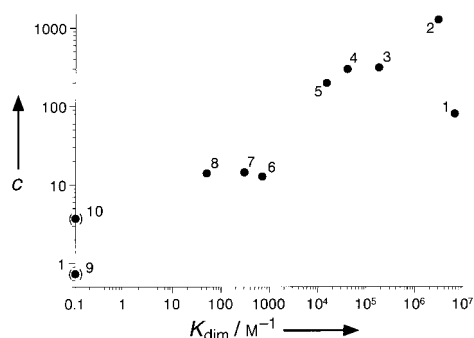


Abbildung 9. Diagramm der Konzentrationen von $\text{Ac}_2\text{-KDADA}$, die eine Hemmung der antibiotischen Wirkung gegen *Bacillus subtilis* um 50% verursachen (Konzentration c in μg pro Plättchen), gegen die Dimerisierungskonstanten K_{dim} der Antibiotica. Teicoplanin (10), das einen Membrananker aufweist, und $\text{TA}_3\text{-1}$ (9), das keinen enthält, dimerisieren nicht ($K_{\text{dim}} < 1\text{M}^{-1}$). Unter den stark dimerisierenden Antibiotica (1–5) befindet sich Eremomycin (2), unter den mäßig dimerisierenden (6–8) befinden sich Vancomycin und Ristocetin A. 1: Decaplanin (MM47761), 2: Eremomycin, 3: Chloreremomycin, 4: Dechloreremomycin, 5: Eremomycin- ψ , 6: Vancomycin, 7: Ristocetin A, 8: Ristocetin- ψ , 9: $\text{TA}_3\text{-1}$, 10: Teicoplanin.

14. Kooperativität der Antibiotica-Bindung an micellenassoziierte Peptide

Nachdem wir nun gezeigt hatten, daß es vorteilhaft für die antibakterielle Aktivität war, wenn die Antibiotica dimerisieren oder sich in der Membran verankern konnten, versuchten wir zu bestimmen, in welchem Umfang die Bindung zunahm, wenn sie „intramolekular“ an einer Membranoberfläche (Templatbindung) und nicht „intermolekular“ stattfand. In unseren ersten Versuchen, dies zu messen, benutzten wir ein grobes Modellsystem für die Bakterienoberfläche aus Natriumdodecylsulfat-Micellen als Analogon für die Bakterienmembran (Abbildung 10A) und N-decanoylierten Analoga von Zellwandvorstufen. Die Decanoylkette dieser Vorstufen-Analoga tauchte in das hydrophobe

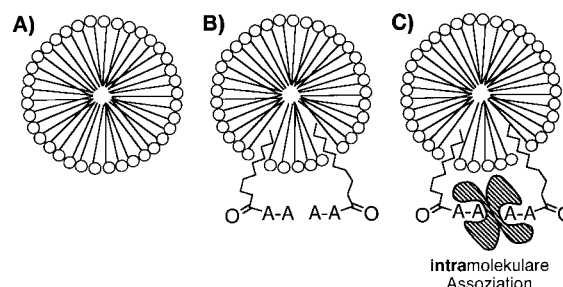


Abbildung 10. Schematische Darstellung A) einer Micelle, B) von Dec-DADA mit einem Membrananker und C) eines Antibiotica-Dimers, das über Dec-DADA an der Oberfläche einer Micelle gebunden ist.

Innere der Micellen ein, während der polare C-Terminus des Peptids in die Lösung ragte (Abbildung 10B). Dabei ist zu beachten, daß die Kohlenwasserstoffseitenketten, die das Innere der Micelle bilden, aneinander vorbeigleiten können (sie verhalten sich also wie in einem Flüssigkristall), so daß die N-decanoylierten Peptide ihre relativen Positionen auf der Micelle ändern können. Wenn also ein Antibiotica-Dimer mit einer seiner Bindungsstellen ein micellengebundenes Peptid bindet, kann ein zweites micellengebundenes Peptid eine Position einnehmen, die prinzipiell eine „intramolekulare“ Bindung an der zweiten Bindungsstelle des Dimers ermöglicht (Abbildung 10C). Die Bindungsaffinität zwischen dem Antibiotikum und dem Peptid in einem solchen Templat-Komplex sollte größer sein als für das entsprechende Gebilde ohne Micelle, vorausgesetzt, der Komplex kann relativ spannungsfrei gebildet werden.

Die oben dargelegten Vermutungen wurden experimentell bestätigt. Die Bindungskonstante der Bindung von Ac-DADA an Ristocetin A in Lösung beträgt $4,1 \times 10^4\text{M}^{-1}$ (in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat(SDS)-Micellen, die in diesem Fall unbeteiligt sind, aber zur Kontrolle zugefügt wurden), während die Bindungskonstante von membrangestütztem N-Decanoyl-D-alanyl-D-alanin (Dec-DADA; wie in Abbildung 10C) bei $1,6 \times 10^7\text{M}^{-1}$ liegt, was einer Zunahme etwa um den Faktor 400 entspricht.^[71] Außerdem erscheint die chemische Verschiebung von w_2 (von der bereits früher gezeigt worden war, daß sie bei um so tieferem Feld erscheint, je stärker der Ligand gebunden war) in letztgenannter Assoziation bei tieferem Feld ($\delta = 11,65$) als beim erstgenannten ($\delta = 11,43$).^[71] Ähnliche Ergebnisse wurden bei der

Bindung von Teicoplanin an die Peptide $\text{Ac}_2\text{-KDADA}$ und $N\text{-}\alpha\text{-Decanoyl-}N\text{-}\epsilon\text{-acetyllysyl-D-alanyl-D-alanin}$ (Dec-KDADA) in Gegenwart von Micellen erzielt. Wie bei der Bindung von Ristocetin A an Dec-DADA und Ac-DADA war auch die Bindungskonstante der Bindung von Teicoplanin an Dec-KDADA größer als die bei der Bindung an $\text{Ac}_2\text{-KDADA}$, und w_2 war bei Bindung an Dec-KDADA weiter zu niederem Feld verschoben als bei der Bindung an $\text{Ac}_2\text{-KDADA}$.^[71] Bei der Bildung von Templat-Assoziaten gibt es also nicht nur den Vorteil eines relativ geringen nachteiligen Entropieeffekts (da die Bindung intramolekular zustandekommt), sondern die Bewegungseinschränkung, die sich durch die Bindung an ein Templat (die Micellenoberfläche) ergibt, geht auch mit einer stärkeren Bindung des Petidcarboxylatendes in der Rezeptortasche einher.

Wir konnten also zwei Formen von Kooperativität bei der Bindung von Analoga der Zellwandvorstufen an Antibiotica-Dimere nachweisen. Erstens entsteht eine intrinsische Form von Kooperativität durch den Einfluß von zwei Bindungsereignissen (Ligandenbindung und Dimerisierung) aufeinander. Diese Kooperativität findet statt, wenn alle Komponenten frei in Lösung vorliegen (im Unterschied zum membran- gebundenen Zustand). Zweitens entsteht eine Form von Kooperativität aus der Einschränkung der Bewegung eines Teils der Komponenten durch ihre gleichzeitige Lokalisation an der Bakterienmembran.

15. Resistenz gegen Vancomycin: eine neue Art von „Superbakterium“

Seit Vancomycin in den 50er Jahren zur klinischen Verwendung eingeführt wurde, nahm es unter den antibakteriellen Wirkstoffen eine Sonderstellung ein, weil keine Resistenzen bei Bakterien auftraten. Dies führte dazu, daß Vancomycin in vorderster Front gegen Infektionen durch MRSA eingesetzt wurde, die sich immer weiter ausbreiteten. 1988 erschien jedoch der erste Bericht über vancomycinresistente Enterococcen (VRE).^[72] Obwohl Enterococcen gewöhnlich nicht pathogen sind, können sie bei immungeschwächten Patienten tödlich verlaufende Infektionen verursachen. Fälle von Immunschwäche treten auf bei Chemotherapie, bei AIDS oder bei Altersschwäche, bei schweren Erkrankungen sowie bei frisch Operierten. Diese Infektionen werden immer häufiger, und es kann sein, daß die Gene, die die Resistenz kodieren, auf tödlichere Bakterienarten wie MRSA übertragen werden (Abbildung 1).

Genetik und Enzymologie der Vancomycinresistenz wurden im wesentlichen von den Arbeitsgruppen von Courvalin in Paris und von Walsh in Cambridge, Massachusetts, aufgeklärt.^[73, 74] Es sieht so aus, als hätten resistente Enterococcen Gene von anderen Bakterien übernommen, so daß die Vorstufen für ihre Zellwandbausteine nicht länger mit -D-Ala-D-Ala enden, sondern statt dessen mit $\text{-D-Alanyl-D-Lactat}$ (-D-Ala-D-Lac).^[73, 74] Die Resistenz ist mit der Expression von fünf Genen assoziiert.^[74] In Abwesenheit von Vancomycin wird die Zellwand aus den normalen Bausteinen, die mit -D-Ala-D-Ala enden, aufgebaut. In Gegenwart von Vancomycin werden die fünf Resistenzgene (*vanS*, *vanR*, *vanH*, *vanA* und

vanX) angeschaltet.^[74] Das Produkt VanS des Gens *vanS* wird an einem Histidinrest phosphoryliert. Das phosphorylierte Protein geht dann mit dem Produkt des zweiten Gens, VanR, eine Wechselwirkung ein, worauf dieses seinerseits phosphoryliert wird. Das phosphorylierte VanR induziert eine Aktivierung der Transkription der anderen drei Gene (*vanH*, *vanA* und *vanX*). VanH ist eine α -Ketoreduktase, die Pyruvat zu D-Lactat reduzieren kann. Dieses D-Lactat wird dann als Substrat zusammen mit D-Alanin und mit ATP als Cofaktor vom Enzym VanA (dem Produkt des Gens *vanA*) zu D-Ala-D-Lac umgesetzt, das dann (anstelle von D-Ala-D-Ala) in die Zellwandvorstufen eingebaut wird. Das fünfte Gen (*vanX*) kodiert eine D-Ala-D-Ala-Peptidase (VanX), welche das D-Ala-D-Ala, das als Baustein für die normale Zellwand-Biosynthese gebildet wird, spaltet, so daß D-Ala als Vorstufe für D-Ala-D-Lac zur Verfügung steht. Die Anordnung dieser Gene und die Funktionen der Genprodukte sind in den Abbildungen 11 bzw. 12 dargestellt.

Als Konsequenz aus der Expression der fünf Gene, die mit der Resistenz assoziiert sind, und der Biosynthese von Zellwandvorstufen, die C-terminal -D-Ala-D-Lac tragen, wird

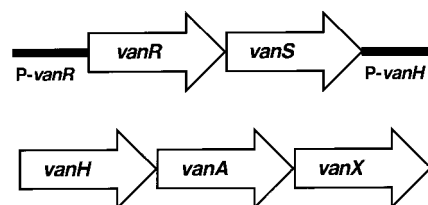


Abbildung 11. Anordnung des Genclusters, das die Resistenz gegen Vancomycin kodiert. Die fettgedruckten Linien kennzeichnen die Promotorregionen der *vanR*, *S*- und *vanH*, *A*, *X*-Regionen. Die offenen Pfeile symbolisieren offene Leseraster. Diese fünf Gene sind für eine Resistenz auf hohem Niveau notwendig, wie dies von Arthur et al.^[73] nachgewiesen wurde. Überarbeitet aus Lit. [74b].

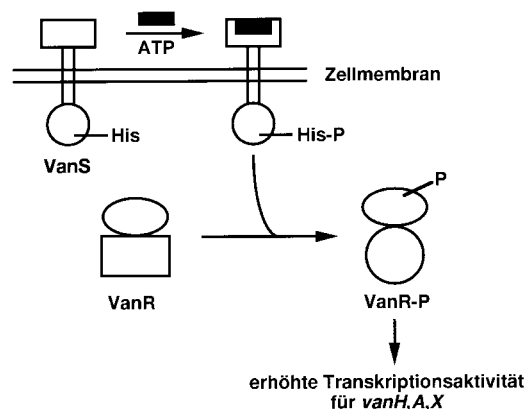
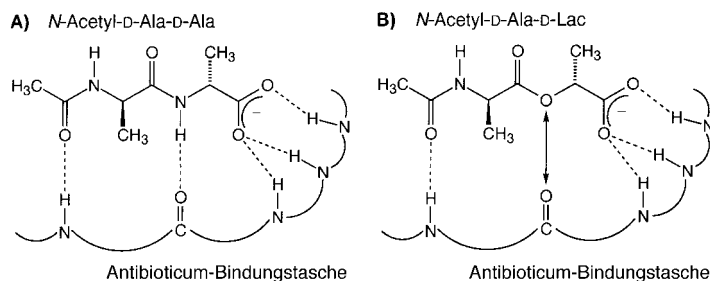


Abbildung 12. Funktion von fünf Genprodukten, die an der Bildung der Vancomycinresistenz beteiligt sind. VanS ist eine Transmembran-Sensor-kinase, die einen sensorischen Liganden binden kann. Dieser ist durch ein schwarzes Rechteck gekennzeichnet und ist verfügbar, wenn das Bakterium dem Antibiotikum Vancomycin ausgesetzt ist. Wird VanS durch die Bindung eines solchen Liganden aktiviert, wird es an einem Histidinrest phosphoryliert und löst seinerseits die Phosphorylierung von VanR aus. VanR dimerisiert daraufhin und bindet an die DNA. Die Bindung von phosphoryliertem VanR (VanR-P) an den *vanH*, *A*, *X*-Promotor (*P-vanH*, Abbildung 11) aktiviert die Transkription und die Expression der Gene *vanH*, *A*, *X*, die Enzyme kodieren, die D-Lactat aus Pyruvat herstellen, dieses mit D-Alanin zu D-Ala-D-Lac verknüpfen bzw. D-Ala-D-Ala hydrolysieren. Überarbeitet aus Lit. [74b].

die Wasserstoffbrückenbindung, die sich gewöhnlich zwischen der NH-Gruppe des terminalen Alaninrestes der Vorstufe und einer Carbonylgruppe des Antibiotiums bildet, durch eine Abstoßung zwischen dem Sauerstoffatom der C-terminalen D-Lactat-Gruppe und der Carbonylgruppe des Antibiotiums ersetzt (Schema 4). Die Affinität von Glycopeptidantibiotica für Vorstufen-Analoga der Zellwandbausteine,



Schema 4. In vancomycinresistenten Enterococci ist der terminale D-Alaninrest in der wachsenden Zellwand teilweise oder vollständig durch D-Lactat ersetzt. Dadurch wird die Bindungskonstante der Bindung an Vancomycin erheblich erniedrigt, weil eine NH-Gruppe, die Wasserstoffbrückenbindungen bilden kann, durch ein Sauerstoffatom ersetzt ist, das dazu nicht in der Lage ist.

die -D-Ala-D-Lac am Ende tragen, wird dadurch etwa um den Faktor 1000 im Vergleich zu der von Verbindungen mit einem -D-Ala-D-Ala-Terminus herabgesetzt.^[75] Wegen dieser viel niedrigeren Bindungskonstanten ist Vancomycin kaum aktiv gegen Bakterien, die solche Vorstufen synthetisieren.^[76] Für die Hemmung von VRE benötigt man 100–1000mal so viel Vancomycin wie für die Hemmung sensibler Organismen. In solchen Fällen ist Vancomycin daher kein brauchbares Antibiotikum.

16. Vorschlag für den Ablauf von Dimerisierung und Membranverankerung bei der Wirkung eines neuen wirksamen Antibiotiums gegen VRE

Das Wesen des Unterschiedes zwischen resistenten und sensiblen Bakterien sowie die Abnahme der Affinität von Vancomycin für die Vorstufen aus resistenten Bakterien, die sich daraus ergibt, läßt vermuten, daß Glycopeptidantibiotica nicht in der Lage sind, eine hinreichende Aktivität gegen solche Bakterien zu entwickeln. Dennoch wurde bei Eli Lilly in Indianapolis und bei Gruppo Lepetit-SpA in Gerezano (Italien) versucht, natürlich vorkommende Glycopeptide zu modifizieren, um neue Antibiotica mit erhöhter Aktivität gegen vancomycinresistente Bakterien zu entwickeln.^[77] Bei Eli Lilly ging man von Chloreremycin **4** aus und fügte eine hydrophobe *p*-Chlor-*p*-phenylbenzylgruppe hinzu; so erhielt man die jetzt mit LY333328 bezeichnete Verbindung **5**.^[78] Diese neue Verbindung weist eine bemerkenswerte Aktivität gegen VRE auf und ist in der Regel 50mal aktiver als Vancomycin.^[79] In vitro ist sie auch etwa 4–8mal aktiver gegen MRSA als Vancomycin, und ihre Wirksamkeit in vivo ist ähnlich hoch.^[79] Bei Gruppo Lepetit-SpA erhielt man ebenfalls ein Glycopeptid mit vielversprechender In-vitro- und In-vivo-Aktivität gegen vancomycinresistente Enterococci.^[80]

Die Antwort darauf, wie das modifizierte Antibiotikum LY333328 resistente Bakterien abtöten kann, liegt nicht auf der Hand. Dies gilt um so mehr, als LY333328 **5** und Vancomycin beide niedrige Affinitäten (mit Bindungskonstanten von 300–500 M⁻¹) für das Vorstufen-Analogon *N*-Acetyl-*N*-ε-acetyllysyl-D-alanyl-D-lactat (Ac₂-KdAdLac) resistenter Bakterien in wäßriger Lösung haben.^[75] Diese Werte unterscheiden sich deutlich von den Bindungskonstanten von 1.5 × 10⁵ M⁻¹ für die Bindung von Vancomycin an Ac₂-KdAdA.^[50] Die ähnlich hohe Bindungsaffinität von Ac₂-KdAdLac für Vancomycin und für LY333328 war jedoch nicht vollkommen überraschend, weil die halbsynthetische Derivatisierung zu LY333328 an einer Position vorgenommen wurde, die weit von der Bindungstasche des Antibiotiums für die Liganden entfernt war. Wir vermuteten daher, daß LY333328 verglichen mit Vancomycin einen zusätzlichen Beitrag zur Bindungsaffinität für Liganden mit einem D-Lactat-Ende durch die kooperativen Effekte erhielt, die oben beschrieben wurden. Wir ahnten, daß die schwache Bindungswechselwirkung zwischen LY333328 und Ac₂-KdAdLac an der Oberfläche eines Bakteriums durch das gleichzeitige Ablaufen von Dimerisierung (LY333328 ist von Chloreremycin abgeleitet, das stark dimerisiert) und Membranverankerung (über die hydrophobe *p*-Chlor-*p*-phenylbenzylkette, die in die Bakterienmembran eintaucht) verstärkt werden könnte.

17. ¹H- und ¹⁹F-NMR-Messungen der Bindungsverstärkung an Membranoberflächen

Vor kurzem versuchten wir, Bestätigungen für die oben beschriebene Hypothese zu sammeln, indem wir ¹H- und ¹⁹F-NMR-Messungen an membranverankerten Peptiden mit einem C-terminalen D-Lactat durchführten. Dabei benutzten wir anstelle von SDS-Micellen Phosphatidylcholin-Vesikel, um die Bakterienmembran nachzubilden. Vesikel sind viel größere Lipidaggregate als Micellen und bestehen aus Lipiddoppelschichten, bei denen sich auf der Innenseite und auf der Außenseite der sphärischen Struktur polare Kopfgruppen befinden. Zellwandvorstufen-Peptide, die *N*-Docosanoyl- (lineare C₂₂-) Ketten trugen, wurden synthetisiert, so daß die Docosanoylketten in die Vesikel inserieren konnten wie die früher benutzten decanoylierten Peptide und so die Bakterienoberfläche nachahmen konnten. Solche Vesikel haben den Vorteil, daß sie der Größe von Bakterienzellen näherkommen als Micellen und daß so die Möglichkeit besteht, daß größere kooperative Effekte zum Tragen kommen. Dieser Vorteil hat allerdings seinen Preis: Die Vesikel sind so groß, daß das Proton-NMR-Signal eines Antibiotiums, das an diese Bakterienmodelle bindet, nicht mehr beobachtet werden kann. Das liegt daran, daß das gebundene Antibiotikum die langsame Taumelbewegung übernimmt, die für große Molekülkonjugate charakteristisch ist; die Protonen unterliegen dann schneller Kernrelaxation, so daß die Linien sich bis zum Verschwinden verbreitern. Daher kann das w₂-Signal, dessen chemische Verschiebung als halbquantitatives Maß für die Bindungsaffinität genutzt werden kann (Abbildung 5), im gebundenen Zustand nicht beobachtet werden.

Diese Linienverbreiterung kann jedoch vorteilhaft in Konkurrenzexperimenten genutzt werden. Angenommen, ein Peptid mit einem C-terminalen D-Lac- und einer Docosanoylgruppe am N-Terminus ist im Vesikel verankert. Es kann daher den Vesikel-Templat-Komplex bilden, der in Abbildung 13 A gezeigt ist. Nach unseren Hypothesen sollte der

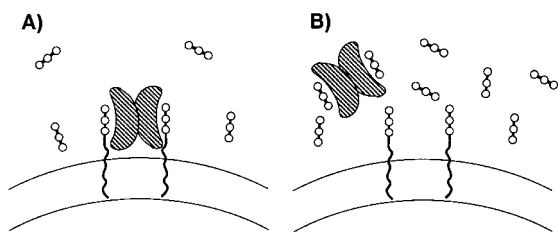


Abbildung 13. Schematische Darstellung des Konkurrenzexperiments, mit dem die Oberflächen-Bindungsaffinitäten membranverankerter Zellwandvorstufen-Analoga bestimmt wurden. A) Antibiotica-Dimer, das an ein vesikelverankertes Peptid mit einem D-Lac-Terminus gebunden ist; in Lösung befindet sich ein nichtverankertes Peptid mit einem D-Ala-Terminus in einer Konzentration, bei der die Templat-Bindung nicht gehemmt wird. B) Das gleiche Experiment bei einer erhöhten Konzentration an freiem D-Ala-terminiertem Peptid, bei der das Antibiotica-Dimer jetzt an dieses frei in Lösung vorliegende Peptid gebunden ist.

Antibiotikum/Peptid-Komplex in dieser Assoziation stabiler sein, als wenn sich beide Komponenten frei in Lösung befinden würden (beispielsweise beträgt die Bindungskonstante für die Assoziation zwischen freiem Chloreremomycin und $\text{Ac}_2\text{-KDADA}$ in Lösung etwa 240 M^{-1}).^[81] Wenn es bei dem vesikelgebundenen Komplex tatsächlich eine zusätzliche Bindungsaffinität gibt, sollte es möglich sein, um diese Bindung mit einem Peptid, das endständig einen D-Ala-Rest trägt, das aber nur in freier Lösung binden kann (z. B. $\text{Ac}_2\text{-KDADA}$, das keinen Membrananker hat), zu konkurrieren. In einem solchen Konkurrenzexperiment kann man die Konzentration von zugegebenem $\text{Ac}_2\text{-KDADA}$ so einstellen, daß sie ausreicht, um das Antibiotikum aus dem vesikelgebundenen Zustand (Abbildung 13 A) wegzufangen (Abbildung 13 B), wo es an *N*-Docosanoyl-Gly-L-Ala-D- γ -Glu-L-Lys-D-Ala-D-Lactat (Docos-GADEKDAdLac) gebunden ist. Der Ligand ist ein verlängertes Analogon der Zellwandvorstufe, in dem der Glycinrest als Abstandhalter an der Stelle benutzt wird, an der bei der natürlichen Verbindung die Zukereinheit gebunden ist. Die Ablösung des Antibiotikums aus dem vesikelgebundenen Zustand hat zur Folge, daß die ^1H -NMR-Signale nicht länger extrem verbreitert sind und die Signale des Antibiotikum/ $\text{Ac}_2\text{-KDADA}$ -Komplexes im 1D- ^1H -NMR-Spektrum beobachtet werden können. Integriert man die resultierenden Signale des Komplexes, läßt sich daraus die Bindungskonstante für die Bindung des Antibiotikums an den vesikelgebundenen Liganden in einem Templat-Komplex berechnen. Wir haben ein solches Konkurrenzexperiment mit dem stark dimerisierenden Antibiotikum Chloreremomycin und den oben genannten Zellwand-Analoga durchgeführt; die Details können Abbildung 14 entnommen werden. Ein 5.7facher Überschuß an $\text{Ac}_2\text{-KDADA}$ gegenüber vesikelgebundenem Docos-GADEKDAdLac war notwendig, um eine ungefähre Gleichverteilung der Bindung von Chloreremomycin durch die beiden Peptide zu erreichen. Qualitativ kann man daher abschätzen, daß das am Vesikel

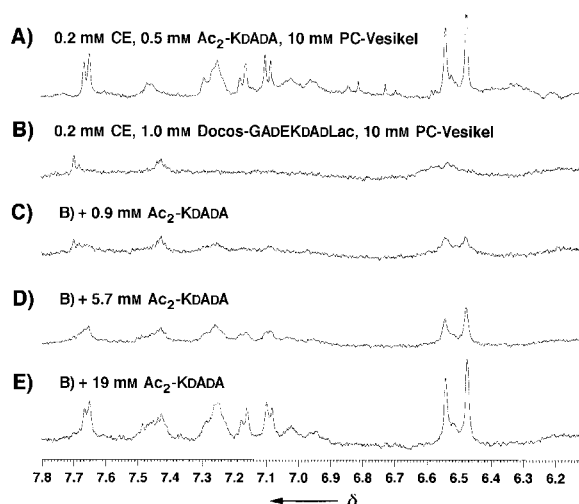


Abbildung 14. Konkurrenzexperiment (siehe Abbildung 13) bei pH 7 zur Bestimmung der Bindungskonstanten der Bindung von Chloreremomycin 4 an ein Modell der Oberfläche von VRE. A) Protonensignale von Chloreremomycin, gebunden an das nichtmembrane Analogon $\text{Ac}_2\text{-KDADA}$ in Gegenwart von Phosphatidylcholin-Vesikeln. B) Diese Signale sind stark verbreitert, wenn das Antibiotikum an das D-Lac-terminierte Hexapeptid des Zellwandvorstufen-Analogons Docos-GADEKDAdLac gebunden und darüber an den Phosphatidylcholin-Vesikeln verankert ist. C) Wie B), jedoch nach Zugabe von $\text{Ac}_2\text{-KDADA}$ in einer Konzentration, die etwa der des membrangebundenen Analogons Docos-GADEKDAdLac entspricht. Aus den unterschiedlichen Signalintensitäten in A) und C) erkennt man, daß der Hauptteil des Antibiotikums noch immer an das membrangebundene D-Lac-terminierte Peptid gebunden ist. D) Wie C), aber mit weiterem $\text{Ac}_2\text{-KDADA}$. In D) sind ähnlich große Mengen des Antibiotikums an das frei in Lösung vorliegende D-Ala-terminierte Peptid und an das membrangebundene D-Lac-terminierte Peptid gebunden. E) Ein großer Überschuß an $\text{Ac}_2\text{-KDADA}$ gegenüber membrangebundenem Docos-GADEKDAdLac ist notwendig, um den größten Teil des Antibiotikums von der Membran zu verdrängen.

orientierte Peptid mit dem D-Lac-Terminus das Antibiotikum etwa 6mal stärker bindet als $\text{Ac}_2\text{-KDADA}$. Da $\text{Ac}_2\text{-KDADA}$ für freies Chloreremomycin in Lösung eine Bindungskonstante von etwa 10^6 M^{-1} aufweist, entspricht dies einer Bindungskonstanten von ca. $6 \times 10^6\text{ M}^{-1}$, die dieses stark dimerisierende Antibiotikum für das Modell eines vancomycinresistenten Bakteriums hat (eine exaktere quantitative Auswertung der Daten ergibt eine Bindungskonstante von $7 \times 10^6\text{ M}^{-1}$).^[82] Die Bindungskonstante des entsprechenden nichtdocosanoylierten Liganden, *N*-Acetyl-Gly-L-Ala-D- γ -Glu-L-Lys-D-Ala-D-Lactat (Ac-GADEKDAdLac) wurde nach einer anderen NMR-Methode zu 2000 M^{-1} bestimmt.^[83] Die Bindungskonstante für Docos-GADEKDAdLac entspricht also einer bemerkenswerten kooperativen Verstärkung der Bindung des Antibiotikums an das membranverankerte Vorstufen-Analogon von VRE um ungefähr 3500 gegenüber der Bindung ohne den Docosanoyl-Membrananker.

Wir haben eine zweite Methode entwickelt, die auf Konkurrenzexperimenten beruht, um eine weitere Messung der Bindungsverstärkung durchführen zu können; dies geschieht durch Templat-Bindung an einer Vesikeloberfläche. Dazu wurden die Antibiotica-Moleküle aus den vesikelgebundenen Komplexen mit Docos-GADEKDAdLac mit dem Liganden *N*- α -Acetyl-*N*- ϵ -trifluoracetyl-Lys-D-Ala-D-Ala (TFAC-KDADA) verdrängt.^[84] Dieser Ligand ist mit einer [^{19}F]Trifluoracetylgruppe an einer Position markiert, die die

Bindung zwischen Ligand und Antibioticum vermutlich nicht nennenswert beeinflusst. Mit ^{19}F -NMR-Spektroskopie kann man so die Bindung an das Antibioticum untersuchen und quantifizieren. Dies hat gegenüber der Proton-NMR-Spektroskopie den Vorteil, daß nur zwei Signale in den ^{19}F -NMR-Spektren bei Konkurrenz auftreten; ein Signal stammt von freiem (nichtgebundenem) TFAc-KDAdA, das andere von TFAc-KDAdA, das mit Antibioticum komplexiert ist, das nicht auf der Vesikeloberfläche fixiert ist (Abbildung 15). Die

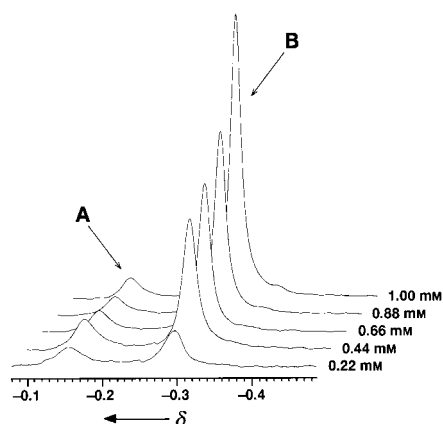


Abbildung 15. ^{19}F -NMR-Spektren von der Titration einer Lösung von Chloreremomycin (**4**; 0.2 mM), Docos-GADEKDAdLac (1.0 mM) und Phosphatidylcholin (10 mM) mit einer TFAc-KDAdA-Lösung bei 298 K. Die Konzentrationen der zugegebenen TFAc-KDAdA-Lösungen sind rechts neben jedem der entsprechenden 1D-Spektren aufgeführt. A) Peaks von freiem TFAc-KDAdA, B) Peaks der nichtmembrangebundenen TFAc-KDAdA/Chloreremomycin-Komplexe. TFAc-KDAdA (Bindungskonstante mit Chloreremomycin $7.7 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$) konkurriert effektiv mit Docos-GADEKDAdLac um die Bindungsstellen von Chloreremomycin. Aus der Analyse dieser Daten ergibt sich eine Bindungskonstante für die Bindung von Docos-GADEKDAdLac an Chloreremomycin von $2.5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$. Die Werte für die chemische Verschiebung sind relativ zu Trifluormethansulfonsäure als externem Standard ($\delta = -3.60$) angegeben.

Integration der Signale der freien und der gebundenen Moleküle und der Vergleich der Integrationswerte mit dem eines externen Standardsignals ermöglicht die Bestimmung der scheinbaren Bindungskonstanten von Chloreremomycin an Docos-GADEKDAdLac in einem Templat-Komplex an der Vesikeloberfläche. Mit dieser Methode wurde diese Konstante zu $2.5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ bestimmt, ein Wert, der ebenso wie der mit ^1H -NMR-Spektroskopie bestimmte Wert viel größer ist als die Bindungskonstante der Bindung von Chloreremomycin an freies Ac-GADEKDAdLac in Lösung (2000 M^{-1}). Dies bestätigt, daß eine enorme Verstärkung der Bindung D-Lac-terminierter Liganden an einer Oberfläche durch die Dimerisierung des Antibioticums erreicht werden kann.^[84]

Erinnern wir uns an den Vorschlag, daß die Kooperativität, die durch die gleichzeitige starke Dimerisierung und die Verankerung des Antibioticums in der Membran zustandekommt, die Basis für die bemerkenswerte Aktivität von LY333328 **5** gegen solche Bakterien ist, die Peptide mit endständigem D-Lac für die Zellwand-Biosynthese benutzen. Die bislang beschriebenen Experimente zeigen zwar den Nutzen der Dimerisierung für die Bindung an eine Ober-

fläche, doch läßt sich damit die Kooperativität, die durch gleichzeitiges Ablaufen beider Prozesse erzielt wird, nicht quantifizieren. Zwei Probleme wurden gelöst, um den gewünschten Wert zu erhalten. Zum einen wird, wenn micellenassoziierte Peptide für die Bindung von **5** eingesetzt werden, die Lösung, die beide Komponenten enthält, trüb, vermutlich durch Aggregation, und eine Bindungskonstante kann durch UV-Differenzspektrometrie nicht ermittelt werden. Zweitens können die Konkurrenzexperimente, die oben für Chloreremomycin mit Vesikeln beschrieben wurden, nicht einfach auf **5** übertragen werden, da das Antibioticum über die *p*-Chlor-*p*-phenylbenzylgruppe dauerhaft an die Vesikel gebunden wird; daher sind direkte NMR-Messungen der Populationen gebundener Spezies nicht möglich. Dennoch ist die Verstärkung der Bindung durch die Membranverankerung um einen Faktor von etwa 10^4 , wie er oben allein für die Dimerisierung erhalten wurde, groß genug, um zu vermuten, daß die bemerkenswerte Aktivität von **5** gegen VRE nicht allein durch eine veränderte Bindungsweise von **5** im Vergleich zu der von Vancomycin erklärt werden kann, sondern durch die gleichzeitige begünstigende Wirkung von Dimerisierung und Membranverankerung. Der Wert von 10^4 ist wahrscheinlich die untere Grenze für die Verstärkung der Wirkung von **5**, da die Verbindung über die Dimerisierung hinaus von der Membranverankerung profitieren wird. Die Kombination der beiden Effekte führt möglicherweise zu einer weiteren kooperativen Wirkungsverstärkung durch die gegenseitige Bewegungseinschränkung, die durch die beiden Membrananker verursacht wird.

An dieser Stelle muß allerdings zur Vorsicht gemahnt werden. Obwohl die Modellmembransysteme, die wir benutzt haben, unzweifelhaft die Ausprägung verstärkter Bindungsaffinitäten in diesen Systemen ermöglicht haben und die Dimerisierungsneigung der Antibiotica mit der Schwierigkeit korreliert wurde, die antibiotische Wirkung gegenüber *B. subtilis* zu unterdrücken, können wir zusätzliche Beiträge von noch unentdeckten Faktoren zur bemerkenswerten Aktivität von **5** nicht ausschließen. So verdient die Möglichkeit, daß die Dimerisierung der Antibiotica die antibakterielle Aktivität durch die Quervernetzung benachbarter Zellen beeinflusst, weiter untersucht zu werden. Außerdem darf man nicht vergessen, daß wir dort, wo die Antibiotica Kohlenwasserstoffgruppen tragen, die die Bindung an Modellmembranen mit Mucopeptidvorstufen verstärken, bislang nur annehmen können, daß gleiche Effekte an der Oberfläche der Bakterien eintreten. Wir können beispielsweise nicht ausschließen, daß die Kohlenwasserstoffgruppen der Antibiotica sich alternativ an hydrophobe Cluster membrangebundener Proteine anlagern und aus dieser Wechselwirkung die Energie einer kooperativen Bindung gewinnen. Außerdem verstehen wir noch nicht die oft auffälligen Aktivitätsunterschiede der verschiedenen Glycopeptidantibiotica gegenüber den unterschiedlichsten klinisch vorkommenden Gram-positiven Pathogenen. Die entscheidende Erkenntnis für das Wirkstoffdesign ist, daß die verlorene Bindungsfähigkeit durch eine Mutation am Bindungsort prinzipiell mit ähnlicher Effektivität wiederhergestellt werden kann, ohne daß die Bindungsstelle selbst modifiziert wird. Als direkte Folge dieser Schlußfolgerung ergibt sich, daß die Vorhersage von Bin-

dungskonstanten in komplexen Netzen unterschiedlicher Wechselwirkungen bestenfalls äußerst schwierig ist! Im vorliegenden Fall wurde eine wichtige antibakterielle Aktivität aus einer Situation wiederhergestellt, die zu Beginn hoffnungslos ausgesehen haben mag.

18. Folgerungen für die Funktionen und die Evolution von Sekundärmetaboliten

Die Existenz von zwei Komplex-Bindungsstellen bei Glycopeptidantibiotica (eine für die Zellwandvorstufen, die andere für die Dimerisierung) ist bemerkenswert. Diese Eigenschaft läßt stark vermuten, daß der evolutive Ursprung der Glycopeptidstrukturen (zumindest hinsichtlich der jüngst selektierten molekularen Eigenschaften) in der beschriebenen antibakteriellen Wirkung liegt. In mehreren Beiträgen^[85, 86] haben wir den Standpunkt vertreten, daß Sekundärmetabolite (die dadurch definiert sind, daß sie keine bekannte Funktion im internen Stoffwechsel des Produzenten haben und typischerweise von diesem ausgeschieden werden) sich entwickelt haben, um die Überlebensfähigkeit des Produzenten zu erhöhen. Diese Verbesserung an Überlebensfähigkeit kann sich prinzipiell entweder durch symbiontische oder durch antagonistische Wechselwirkungen mit anderen Organismen ausdrücken. In jedem Fall ist eine Rezeptorstelle bei dem anderen Organismus notwendig. Dies geht oft mit einer spezifischen molekularen Wechselwirkung einher, und wo die Details einer solchen Wechselwirkung aufgeklärt worden sind (wie im beschriebenen Fall), sind sie ähnlich kompliziert wie Enzym/Substrat-Wechselwirkungen.^[85]

Entgegen dieser Ansicht wird manchmal argumentiert, daß bemerkenswert komplementäre Wechselwirkungen von Sekundärmetaboliten mit anderen Molekülen in einem zweiten Organismus zwar gefunden werden können, daß es aber schwierig ist, sofort zu akzeptieren, daß diese Wechselwirkungen ein Ergebnis der natürlichen Selektion sind. Ein Fallbeispiel dazu liefert der molekulare Wirkungsmechanismus der immunsuppressiven Verbindungen Cyclosporin A, FK506 und Rapamycin.^[87] Man wird kaum behaupten wollen, daß diese drei Sekundärmetabolite – der erste von einem Pilz gebildet, die beiden anderen von Streptomyceten – entwickelt wurden, um die Aktivierung oder Proliferation menschlicher T-Zellen zu hemmen. Dennoch erfolgt 1) die Hemmung durch die Bindung der Sekundärmetabolite an intrazelluläre Rezeptorproteine,^[87] und im Fall von Cyclosporin A und FK506 wechselwirken die entstehenden Komplexe mit Calcineurin,^[88] und es läuft 2) exakt die gleiche Sequenz in Hefezellen ab, wodurch die Sekundärmetabolite fungistatische oder fungizide Wirkungen entwickeln.^[89]

In Punkt 2) sehen wir einen möglichen Selektionsmechanismus für die Produktion der Sekundärmetabolite, weil die Produzenten damit eine Waffe erhalten, um andere Mikroorganismen, mit denen sie im Verlauf der Evolution in Konkurrenz gerieten, zurückzudrängen. Die gleichen Wege bei der Wirkung gegen T-Zellen ergeben sich möglicherweise daraus, daß T-Zellen und Hefezellen den gleichen Ursprung haben und deshalb die primitiven Signaltransduktionswege gleich sein mögen.

Einer der triftigsten Gründe, die für die entscheidende Bedeutung von Sekundärmetaboliten für das Überleben ihrer Produzenten sprechen, besteht in der beeindruckend großen Menge an DNA, die oft notwendig ist, um die Produktion der Sekundärmetabolite zu kodieren. Die Pionierarbeiten von Hopwood^[90] bei der Untersuchung dieser DNA und der Details ihrer Funktionen werden nun von anderen in vielen Teilen der Welt vertieft. Die Beteiligung Dutzender von Enzymen bei der Produktion eines Antibiotikums ist nichts Ungewöhnliches,^[91] und dementsprechend wird diese Produktion von Dutzenden von Kilobasen DNA kodiert. Die Vancomycin-Gruppe der Glycopeptide ist in dieser bemerkenswerten Leistung der Evolution keine Ausnahme.^[27, 92]

19. Anmerkungen zur Kooperativität: der enthalpische Chelateffekt

Bei unserer Arbeit über den Wirkungsmechanismus der Glycopeptidantibiotica konnten wir eine Reihe von Eigenschaften der Kooperativität der molekularen Erkennung identifizieren und deuten, die eine allgemeine Bedeutung für die Untersuchung von Bindungsvorgängen in der Natur haben. Dafür haben sich die Glycopeptidantibiotica als einfaches und nützliches Modell zum Verständnis von Aspekten der Bindung erwiesen, deren Untersuchung in komplexeren Systemen schwieriger ist.

Wir haben kürzlich die Tatsache kommentiert, daß die eingeschränkte Bewegung eines Liganden in einer Bindungstasche die elektrostatischen Wechselwirkungen am Bindungs-ort verbessert.^[55, 93] Umgekehrt wird durch die Verbesserung der elektrostatischen Verhältnisse bei der Bindung zwischen Ligand und Rezeptor auch die Bewegung in der Bindungstasche vermindert. Dies ist ein Beispiel für eine Enthalpie-Entropie-Kompensation;^[94] man kann sich vorstellen, daß sich die beiden Effekte gegenseitig iterativ beeinflussen. Wenn **A** beispielsweise isoliert an einen Teil der Bindungsstelle mit einer Exothermie X bindet und **B** isoliert an einen anderen Teil der Bindungsstelle mit der Exothermie Y , dann ist eine Bindung von **A** an **B**, die die gleichzeitige spannungsfreie Bindung an die Bindungsstelle (als Verbindung **A–B**) ermöglicht, nicht nur wegen des klassischen Chelateffektes von Vorteil (ein Entropievorteil), sondern sie verläuft auch mit einer Exothermie, die größer ist als $X + Y$. Diesen Effekt nennen wir den enthalpischen Chelateffekt.^[55] Ein Beispiel für den enthalpischen Chelateffekt haben wir weiter oben anhand der zunehmenden Stärke der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Carboxylatanion des Analogons einer bakteriellen Zellwandvorstufe und dem Amid-NH-Proton (w_2) eines Glycopeptid-Antibiotikums bei Zufügung zusätzlicher funktioneller Gruppen zum Liganden beschrieben (Abbildung 5). Diese Gruppen und die entstehenden zusätzlichen Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Ligand und dem Antibiotikum ergaben bei Bindung des Liganden eine z.B. bezogen auf die Bindung von Acetat stärkere Tieffeldverschiebung des Protonen-NMR-Signals von w_2 . Obwohl die zusätzlichen funktionellen Gruppen entfernt von w_2 liegen und daher keinen direkten Einfluß auf die chemische Verschiebung ausüben, dienen sie dazu, den

Liganden in seiner Bindungsstelle zu verankern, und verringern so die Bewegung der Carboxylatgruppe des Liganden relativ zum Antibioticum, was eine stärkere (oder exothermere) Wasserstoffbrückenbindung zu w_2 und ein tieffeldverschobeneres Signal nach sich zieht.^[55]

20. Gleichgewichtskonstanten und die Parameter zur Beschreibung des gebundenen Zustands

Die oben beschriebenen Experimente zur Messung der chemischen Verschiebung von w_2 verdeutlichen ein Prinzip, das wir wegen seiner Bedeutung für die Untersuchung anderer molekularer Erkennungsvorgänge als allgemein und wichtig ansehen. Es besteht darin, daß ein Parameter, der den gebundenen Zustand in einem System repräsentiert (z. B. die chemische Verschiebung des Signals von w_2), sich parallel zur Gleichgewichtskonstanten der Assoziation ändern kann (Abbildung 5). Wenn wir darüber hinaus die Grenzfläche bei einer konkreten Assoziation untersuchen könnten, würden wir bei einer relativ hohen Gleichgewichtskonstanten recht starke Bindungen an der Grenzfläche und dementsprechend kurze Bindungslängen finden; die Grenzfläche ließe sich als „dichtgepackt“ beschreiben. Dagegen wäre eine schwache Assoziation durch große Bindungslängen in der Grenzfläche gekennzeichnet, und die Grenzfläche ließe sich als „locker“ beschreiben. Unter diesem Aspekt versuchten wir die „Pakung“ der Dimer-Grenzflächen in Abhängigkeit von ihrer Dimerisierungskonstanten zu messen. Allen Glycopeptiden ist – unabhängig von den breit streuenden Dimerisierungskonstanten – eine Anordnung von mindestens vier Wasserstoffbrückenbindungen an der Dimer-Grenzfläche gemeinsam (Schema 2). Das Signal des Protons x_4 (Schemata 2 und 3) in der Dimer-Grenzfläche wird bei der Dimerisierung stark tieffeldverschoben; der Betrag dieser *begrenzenden* Tieffeldverschiebung ($\Delta\delta_{x_4}$) wurde verwendet, um die Packung der Dimer-Grenzfläche als Funktion der Dimerisierungskonstanten zu beschreiben. Die Änderung der chemischen Verschiebung des x_4 -Signals bei der Dimerisierung ($\Delta\delta_{x_4}$) ist bei stark dimerisierenden Antibiotica wesentlich größer als bei schwach dimerisierenden (Abbildung 16).^[95]

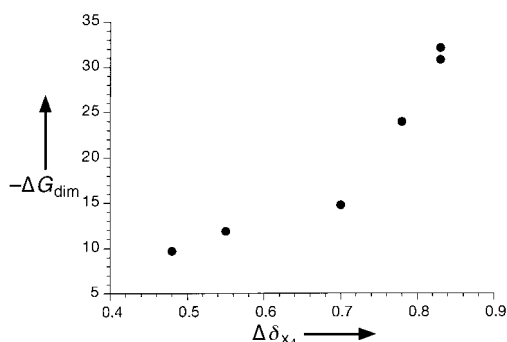


Abbildung 16. Auftragung der Freien Dimerisationsenthalpie ($-\Delta G_{\text{dim}}$ [kJ mol⁻¹]) gegen die Änderung der chemischen Verschiebung des Protons x_4 ($\Delta\delta_{x_4}$) bei der Dimerisierung einiger Glycopeptidantibiotica. Reihenfolge der Antibiotica mit steigendem ΔG_{dim} -Wert: Ristocetin- γ , Monodechlorvancomycin, Vancomycin, Chloreremomycin, Eremomycin und *p*-Phenylbenzylchloreremomycin.

Zusammenfassend läßt sich aus den Änderungen der chemischen Verschiebungen der Signale von w_2 und x_4 bei der Ligandenbindung und der Dimerisierung ableiten, daß mit steigenden Gleichgewichtskonstanten für die entsprechenden Assoziationen die bindenden Spezies in engeren Kontakt treten. Eine allgemeine Schlußfolgerung, die sich aus diesen Daten ergibt, ist in Abbildung 17 dargestellt. Dieser

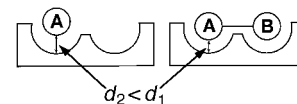


Abbildung 17. Schematische Darstellung der Assoziation einer Spezies **A** mit ihrem Rezeptor (links) und der Assoziation der gleichen Spezies **A**, wenn sie über eine spannungsfreie Brücke mit einer zweiten Spezies **B** verknüpft ist, die an eine eigene Bindungsstelle im gleichen Rezeptor bindet (rechts). Im zweiten Fall ist die Assoziationskonstante des Liganden mit dem Rezeptor infolge der durch **B** vermittelten kooperativen Verstärkung der Bindung von **A** erhöht. Der gebildete Komplex ist relativ fest, und der Ligand kann nur wenige gebundene Zustände einnehmen. Daher ist der Abstand d_2 typischerweise kleiner als der Abstand d_1 .

Befund hat Auswirkungen auf die Untersuchung der Übergänge zwischen gebundenen (oder gefalteten) und freien (ungefalteten) Zuständen, die vermutlich im Verlauf eines zweistufigen Prozesses auftreten. Bei solchen Untersuchungen wird typischerweise ein Parameter gemessen und mit den erwarteten Werten für den gebundenen (oder gefalteten) und den freien (oder ungefalteten) Zustand verglichen. Dies ermöglicht dann die Berechnung der relativen Anteile der Zustände. Die Parameterwerte für die freien (oder ungefalteten) Zustände lassen sich im allgemeinen relativ leicht definieren. Bei der Bindung von Liganden an ein Glycopeptid-Antibioticum ist beispielsweise der freie Zustand der, in dem kein Ligand gebunden ist (freies Antibioticum), und ein Parameter, der diesen Zustand beschreibt (w_2), ist leicht zu messen. Unsere Arbeiten ergaben allerdings, daß es keinen einzelnen Parameter gibt, der den gebundenen (oder gefalteten) Zustand beschreibt.^[96] Nimmt die Gleichgewichtskonstante für die Assoziation zu, nimmt auch der Parameter für den gebundenen (oder gefalteten) Zustand zu, z. B. die begrenzende chemische Verschiebung des w_2 -Signals.

Durch diese Komplikation können systematische Fehler entstehen. Ein Beispiel ist die Berechnung einer Teilpopulation eines kurzen Peptids (von dem bekannt ist, daß es als Teil eines vollständigen Proteins eine α -Helix bildet), das in wäßriger Lösung eine α -helicale Konformation einnimmt. Der Ausdruck zur Berechnung dieser Fraktion x hat im allgemeinen die Form (1), wobei p_{unf} für den vollständig

$$x = \frac{p_{\text{obs}} - p_{\text{unf}}}{p_{\text{fol}} - p_{\text{unf}}} \quad (1)$$

entfalteten („random coil“) und p_{fol} für den vollständig gefalteten (helicalen) Zustand des Peptids steht, und p_{obs} ist der gemessene Wert unter den interessierenden Versuchsbedingungen (z. B. in wäßriger Lösung). Um eine Abschätzung für p_{fol} zu erhalten, benutzt man als Lösungsmittel meist Trifluorethanol (TFE), das die Bildung von α -Helices begünstigt. Beim Verdünnen von TFE-Lösungen mit Wasser erwartet man jedoch in Analogie zu unseren Arbeiten über Glycopeptide, daß nicht nur der Anteil des ungefalteten

Zustandes steigt, sondern daß gleichzeitig auch die Verbindungen im gefalteten Zustand weniger dicht gepackt sind als vor der Verdünnung. Dementsprechend wird der Parameter p_{fol} mit zunehmender Verdünnung abnehmen. Der solchen Analysen inhärente Fehler wird daher zu einer Unterschätzung der Population des (zunehmend dynamischeren) gefalteten Zustandes führen.

21. Analyse der energetischen Verhältnisse der kooperativen Bindung

Mit Blick auf die oben beschriebenen Experimenten, die die Änderungen in der Packungsdichte an der Dimer-Grenzfläche (definiert anhand der Größe von $\Delta\delta_{x_4}$) bei Änderung der Dimerisierungskonstanten verdeutlichen, haben wir die Untersuchungen ausgeweitet, um an den Grenzflächen die energetischen Ursachen der kooperativen Bindung bei ligandengebundenen Glycopeptid-Dimeren aufzuklären.

Wenn eine der Grenzflächen (Dimer- oder Antibiotica-Ligand-Grenzfläche) zu Beginn locker zusammengefügt war (niedrige Assoziationskonstante), dann sollte – so unsere Hypothese – die Bildung eines kooperativen tetrameren Komplexes (zwei Liganden an ein Antibiotica-Dimer gebunden) zu einer signifikanten Stärkung der Bindung an an dieser Grenzfläche führen. Wenn umgekehrt jedoch eine der Grenzflächen von Anfang an dicht gepackt war (große Assoziationskonstante), dann sollte durch die Bildung des tetrameren Komplexes kaum eine zusätzliche Verdichtung der Packung durch kooperative Wechselwirkungen möglich sein. Wenn diese Hypothese zutrifft und die Dimer-Grenzfläche beispielsweise ohne Ligand locker ist (niedrige Dimerisierungskonstante K_{dim}), wird ein wesentlicher Beitrag zur Zunahme von K_{dim} in Gegenwart eines Liganden von den Veränderungen herrühren, die mit der Stärkung der Bindung an der der Dimer-Grenzfläche einhergehen (und die anhand einer Zunahme der begrenzenden chemischen Verschiebung des x_4 -Signals verfolgt werden kann). Wenn hingegen die Bindung an der Dimer-Grenzfläche auch ohne Ligand eng ist (großer Wert für K_{dim}), sollte der größte Teil der Freien Enthalpie, die zu einer Zunahme von K_{dim} führt, in Gegenwart des Liganden von den Veränderungen herrühren, die mit der Stärkung der Bindung an der Ligand-Antibiotica-Grenzfläche einhergehen, und es sollten sich nur wenige Veränderungen bei der begrenzenden chemischen Verschiebung des x_4 -Signals ergeben. Die Art, wie die kooperative Freie Enthalpie der Dimerisierung auf Veränderungen an der Dimer-Grenzfläche und solche an der Ligand-Antibiotica-Grenzfläche aufgeteilt werden kann, ist anhand von jeweils mehreren hypothetischen Punkten in Abbildung 18 veranschaulicht.^[95] Man erwartet, daß eine schwach dimerisierende Verbindung die kooperative Anbindung hauptsächlich durch eine Stärkung der Bindung an der Dimer-Grenzfläche erreichen wird (Pfeile zwischen offenen und ausgefüllten Kreisen am gleichen Antibioticum unter flachem Winkel zur Horizontalen; z. B. W in Abbildung 18 A) und eine stark dimerisierende hauptsächlich durch eine Stärkung der Bindung an der Grenzfläche zum Liganden (Pfeile zwischen offenen und geschlossenen

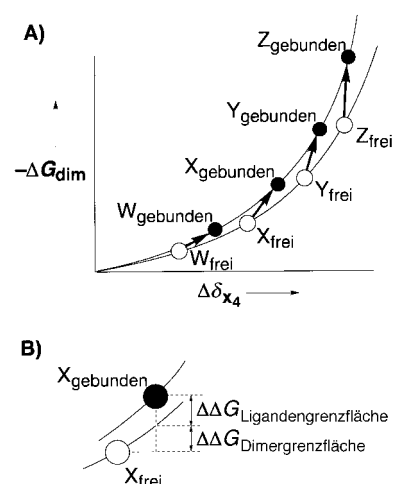


Abbildung 18. A) Hypothetische Auftragungen von $-\Delta G_{\text{dim}}$ gegen $\Delta\delta_{x_4}$ für Antibiotica W, X, Y, Z, wenn sie in freiem Zustand dimerisieren (○) und wenn sie als Antibiotica-Ligand-Komplexe dimerisieren (●). Die Pfeile verbinden die hypothetischen Punkte für ein Antibioticum; die Dimerisierungskonstanten der Antibiotica nehmen in der Reihe $W \rightarrow X \rightarrow Y \rightarrow Z$ zu. B) Da die Freie Dimerisierungsenthalpie bei Änderungen an der Dimer-Grenzfläche durch die Kurve definiert ist, die die Punkte (○) für die Dimerisierung des Antibiotiums verbindet, gibt der Betrag, um den die ●-Punkte senkrecht oberhalb der Kurve liegen, die Freie Dimerisierungsenthalpie wieder, die mit Änderungen an der Grenzfläche zwischen dem Liganden und dem Antibioticum einhergeht.

Kreisen am gleichen Antibioticum unter sehr steilem Winkel zur Horizontalen; z. B. Z in Abbildung 18 A).

Die experimentellen Daten (Abbildung 19) entsprechen den Erwartungen nach Abbildung 18 überraschend gut.^[95] Das schwach dimerisierende Antibioticum Ristocetin- ψ dimerisiert in Gegenwart von $\text{Ac}_2\text{-KDADA}$ stärker als in seiner

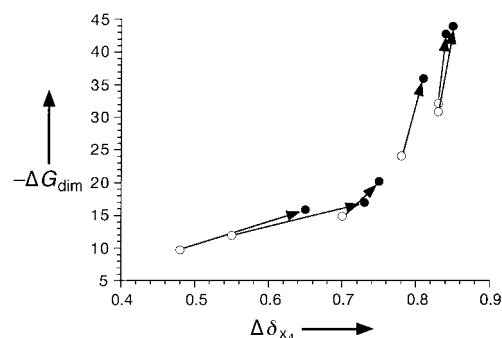


Abbildung 19. Gemeinsame Darstellung der Freien Dimerisierungsenthalpie ($-\Delta G_{\text{dim}}$ [kJ mol⁻¹]) gegen $\Delta\delta_{x_4}$ für freie (○) und ligandengebundene Glycopeptidantibiotica (●). Für jedes Antibioticum stellen die Pfeile die Änderungen in $-\Delta G_{\text{dim}}$ und $\Delta\delta_{x_4}$ infolge der Ligandenbindung dar. Nach steigender Größe von ΔG_{dim} (für die freien Antibiotica) beziehen sich die Punkte auf die Dimerisierung der folgenden Antibiotica: Ristocetin- ψ , Monodechlorvancomycin, Vancomycin, Chloreremomycin, Eremomycin und p-Phenylbenzylchloreremomycin.

Abwesenheit, denn die Freie Bindungsenthalpie für die Dimer-Grenzfläche ist günstiger. Die stärker dimerisierenden Antibiotica Chloreremomycin, p-Phenylbenzylchloreremomycin (LY307599) und Eremomycin dimerisieren in Gegenwart von $\text{Ac}_2\text{-KDADA}$ stärker als in seiner Abwesenheit, weil die Freie Bindungsenthalpie für die Grenzfläche zwischen Antibioticum und Ligand im ligandengebundenen Dimer

günstiger ist als im ligandengebundenen Monomer. In diesem Fall ändert sich die Freie Bindungsenthalpie für die Dimer-Grenzfläche nur wenig. Das Verhalten von Vancomycin liegt zwischen diesen beiden Extremen mit einer Freien Enthalpie, die wegen der Kooperativität zum Teil durch die Ligandenbindung und zum Teil durch die Dimerisierung gewonnen wird.

Diese Befunde haben Folgen für die Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen und für die Wirkstoffentwicklung. Auf beiden Gebieten ist es üblich (wenn auch nicht einheitlich in der Durchführung), den Ursprung der Bindungsaffinität an der Grenzfläche zwischen den bindenden Molekülen zu suchen.^[97, 98] Unsere Daten (Abbildung 19) lassen erkennen, daß bei schwach dimerisierenden Antibiotica die Zunahme der Gleichgewichtskonstanten für die Dimerisierung in Gegenwart des Liganden (im Vergleich zum Zustand ohne Liganden) hauptsächlich aus Veränderungen herrührt, die mit der engeren Wechselwirkung zwischen dem Liganden und dem Antibioticum zusammenhängen. Analog dazu ergibt sich bei Proteinen (oder genauer bei Rezeptoren), die vor der Bindung eines anderen Proteins (oder im konkreten Fall eines Rezeptors vor der Bindung des physiologischen Liganden oder eines Wirkstoffs) eine lockere Struktur aufweisen, ein Teil der Bindungsaffinität durch die Verfestigung der inneren Strukturen des Proteins im resultierenden gebundenen Zustand. Aus diesen Überlegungen erkennt man, daß die thermodynamischen Parameter für Protein-Protein-Assoziationen, deren Analyse unter dem Gesichtspunkt von Grenzflächen-Wechselwirkungen zu verblüffenden Erkenntnissen führen kann,^[98] wesentlich komplexere Ursprünge haben als erwartet.

22. Zusammenfassung und Ausblick

Trotz der Fortschritte auf dem Gebiet der Glycopeptid-Aktivität, die wir in diesem Artikel dargestellt haben, besteht kein Grund zur Selbstzufriedenheit, wie neuere Veröffentlichungen^[3, 99, 100] über das Auftreten von Infektionen durch vancomycinresistente *S. aureus*-Stämme in Kliniken zeigen. Obwohl die Resistenz bei MRSA bislang nur ein geringes Ausmaß erreicht hat (und offenbar aus einer erhöhten Geschwindigkeit der Zellwandsynthese resultiert und weniger die Folge der Synthese einer modifizierten -D-Ala-D-Lac-Vorstufe ist^[99]), besteht immer die Gefahr, daß sich eine verstärkte Resistenz gegen Vancomycin in *S. aureus* entwickelt. Es ist klar, daß jeder Ansatz, der neue Möglichkeiten eröffnet, um die Aktivität von Glycopeptiden zu erhöhen, von höchster Bedeutung ist.^[101]

Unsere Arbeiten wurden vom EPSRC, vom BBSRC und vom Wellcome Trust gefördert. Die Autoren danken auch ihren Kollegen, deren Namen im Literaturverzeichnis genannt sind, für ihre wichtigen Beiträge. Sie danken den Firmen Eli Lilly, SmithKline Beecham, Merrell-Dow Lepetit und Abbott Laboratories für Proben der Glycopeptidantibiotica. Nur durch diese großzügigen Spenden und viele fruchtbare Diskussionen mit den Wissenschaftlern dieser Unternehmen wurde unsere Arbeit ermöglicht. Besonderer Dank gilt Dr. Thalia Nicas, Dr. Robin Cooper und Dr. Norris Allen (alle Eli Lilly) und Dr.

Enrico Selva (Gruppo Lepetit, Mailand) für hilfreiche Diskussionen. Obwohl wir uns hauptsächlich auf die Struktur-Arbeiten unserer Arbeitsgruppe in Cambridge konzentriert haben, ist es ausschließlich das Verdienst der Wissenschaftler von Eli Lilly und Lepetit, daß Vancomycin und Teicoplanin zum erfolgreichen klinischen Einsatz gelangt sind.

Eingegangen am 10. August 1998 [A296]

Übersetzt von Dr. Burkard Neuß, Jülich

International Edition: *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 1172–1193

- [1] H. C. Neu, *Science* **1992**, 257, 1064–1073.
- [2] S. B. Levy, *Sci. Am.* **1998**, 278, 32–39.
- [3] S. Tabaqchali, *Lancet* **1997**, 350, 1644–1645.
- [4] D. H. Williams, *Nat. Prod. Rep.* **1996**, 13, 469–477.
- [5] M. H. McCormick, W. M. Stark, G. E. Pittenger, R. C. Pittenger, J. M. McGuire, *Antibiot. Annu.* **1955–56**, 606–611.
- [6] A. A. C. Dutton, P. C. Elmes, *Br. Med. J.* **1959**, 1, 1144–1149.
- [7] G. B. Appel, D. B. Given, L. R. Levine, G. L. Cooper, *Am. J. Kidney Dis.* **1986**, 8, 75–80.
- [8] a) D. C. Jordan, P. E. Reynolds in *Antibiotics, Vol. III* (Hrsg.: J. W. Corcoran, F. E. Hahn), Springer, Berlin, **1974**; b) J. E. Geraci, P. E. Hermans, *Mayo Clin. Proc.* **1983**, 58, 88–91; c) J. F. Levine, *Med. Clin. North Am.* **1987**, 71, 1135–1145; d) R. S. Griffith, *Rev. Infect. Dis.* **1981**, 3, S200–S204; e) R. S. Griffith, *J. Antimicrob. Chemother.* **1984**, 14, 1–5.
- [9] a) M. R. Bardone, M. Paternoster, C. Coronelli, *J. Antibiotics* **1978**, 31, 170–177; b) F. Parenti, G. Beretta, M. Berti, V. Arioli, *J. Antibiot.* **1978**, 31, 276–283; c) M. Trautmann, H. Wiedeck, M. Ruhnke, M. Oethinger, R. Marre, *Infection* **1994**, 22, 430–436.
- [10] F. J. Marshall, *J. Med. Chem.* **1965**, 8, 18–22.
- [11] D. H. Williams, *Acc. Chem. Res.* **1984**, 17, 364–369.
- [12] D. H. Williams, J. R. Kalman, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, 99, 2768–2774.
- [13] G. M. Sheldrick, P. G. Jones, O. Kennard, D. H. Williams, G. A. Smith, *Nature* **1978**, 271, 223–225.
- [14] M. P. Williamson, D. H. Williams, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, 103, 6580–6585.
- [15] C. M. Harris, T. M. Harris, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, 104, 4293–4295.
- [16] F. Sztaricskai, A. Neszmélyi, R. Bognár, *Tetrahedron Lett.* **1980**, 21, 2983–2986.
- [17] J. R. Kalman, D. H. Williams, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, 102, 897–905.
- [18] J. C. J. Barna, D. H. Williams, D. J. M. Stone, T.-W. C. Leung, D. M. Doddrell, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, 106, 4895–4902.
- [19] a) D. A. Evans, M. R. Wood, B. W. Trotter, T. I. Richardson, J. C. Barrow, J. L. Katz, *Angew. Chem.* **1998**, 110, 2864–2868; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 2700–2704; b) D. A. Evans, C. J. Dinsmore, P. S. Watson, M. R. Wood, T. I. Richardson, B. W. Trotter, J. L. Katz, *Angew. Chem.* **1998**, 110, 2868–2872; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 2704–2708.
- [20] a) K. C. Nicolaou, S. Natarajan, H. Li, N. F. Jain, R. Hughes, M. E. Solomon, J. M. Ramanjulu, C. N. C. Boddy, M. Takayanagi, *Angew. Chem.* **1998**, 110, 2872–2878; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 2708–2714; b) K. C. Nicolaou, N. F. Jain, S. Natarajan, R. Hughes, M. E. Solomon, H. Li, J. M. Ramanjulu, M. Takayanagi, A. E. Koumbis, T. Bando, *Angew. Chem.* **1998**, 110, 2879–2881; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 2714–2716; c) K. C. Nicolaou, M. Takayanagi, N. F. Jain, S. Natarajan, A. E. Koumbis, T. Bando, J. M. Ramanjulu, *Angew. Chem.* **1998**, 110, 2881–2883; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 2717–2719.
- [21] a) A. Bongini, J. Feeney, M. P. Williamson, D. H. Williams, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1981**, 201–206; b) C. M. Pearce, D. H. Williams, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1995**, 153–157.
- [22] M. P. Williamson, D. H. Williams, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1981**, 1483–1491.
- [23] S. J. Hammond, M. P. Williamson, D. H. Williams, L. D. Boeck, G. G. Marconi, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1982**, 344–346.
- [24] S. J. Hammond, D. H. Williams, R. V. Nielsen, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1983**, 116–117.
- [25] M. J. Zmijewski, B. Briggs, *FEMS Microbiol. Lett.* **1989**, 59, 129–133.

- [26] P. J. Solenberg, P. Matsushima, D. R. Stock, S. C. Wilkie, R. C. Thompson, R. H. Baltz, *Chem. Biol.* **1997**, *4*, 195–202.
- [27] A. M. A. van Wageningen, P. N. Kirkpatrick, D. H. Williams, B. R. Harris, J. K. Kershaw, N. J. Lennard, M. Jones, S. J. M. Jones, P. J. Solenberg, *Chem. Biol.* **1998**, *5*, 155–162.
- [28] a) K. Turgay, M. Krause, M. A. Marahiel, *Mol. Microbiol.* **1992**, *6*, 529–546; b) J. Kratzschmar, M. Krause, M. A. Marahiel, *J. Bacteriol.* **1989**, *171*, 5422–5429; c) P. Cosmina, F. Rodriguez, F. Deferra, G. Grandi, M. Perego, G. Venema, D. van Sinderen, *Mol. Microbiol.* **1993**, *8*, 821–831.
- [29] H. Kleinkauf, H. van Döhren, *Eur. J. Biochem.* **1996**, *236*, 335–351.
- [30] T. Stachelhaus, M. A. Marahiel, *FEMS Microbiol. Lett.* **1995**, *125*, 3–14.
- [31] T. Stein, J. Vater, V. Kruff, A. Otto, B. Wittmann-Liebold, P. Franke, M. Panico, R. McDowell, H. R. Morris, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 15428–15435.
- [32] F. Lipmann, *Science* **1973**, *173*, 875–884.
- [33] a) W. Schlumbohm, T. Stein, C. Ullrich, J. Vater, M. Krause, M. A. Marahiel, V. Kruff, B. Wittmann-Liebold, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 23135–23141; b) T. Stein, J. Vater, *Amino Acids* **1996**, *10*, 201–227.
- [34] V. de Crécy-Lagard, V. Blanc, P. Gil, L. Naudin, S. Lorenzon, A. Famechon, N. Bamas-Jacques, J. Crouzet, D. Thibaut, *J. Bacteriol.* **1997**, *179*, 705–713.
- [35] S. Fuma, Y. Fujishima, N. Corbell, C. Dsouza, M. M. Nakano, P. Zuber, K. Yamane, *Nucleic Acids Res.* **1993**, *21*, 93–97.
- [36] G. R. Summers, S. Donadio, M. J. Staver, E. Wendt-Pienkowski, R. Hutchinson, L. Katz, *Microbiology* **1997**, *143*, 3251–3262.
- [37] J. S. Thorson, S. F. Lo, H. W. Liu, C. R. Hutchinson, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 6993–6994.
- [38] S. L. Otten, M. A. Gallo, K. Madduri, X. Liu, R. Hutchinson, *J. Bacteriol.* **1997**, *179*, 4446–4450.
- [39] C. Scotti, C. R. Hutchinson, *J. Bacteriol.* **1996**, *178*, 7316–7321.
- [40] K. Madduri, C. R. Hutchinson, *J. Bacteriol.* **1995**, *177*, 1208–1215.
- [41] K. Salah-Bey, M. Doumith, J.-M. Michel, S. Haydock, J. Cortés, P. F. Leadlay, M.-C. Raynal, *Mol. Gen. Genetics* **1998**, *257*, 542–553.
- [42] H. R. Perkins, *Biochem. J.* **1969**, *111*, 195–205.
- [43] E. F. Gale, E. Cunliffe, P. E. Reynolds, M. H. Richmond, M. J. Waring, *Molecular Basis of Antibiotic Action*, Wiley, London **1972**.
- [44] J. R. Kalman, D. H. Williams, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 906–912.
- [45] D. H. Williams, M. P. Williamson, D. W. Butcher, S. J. Hammond, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 1332–1339.
- [46] J. C. J. Barna, D. H. Williams, M. P. Williamson, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1985**, 254–256.
- [47] M. Schäfer, T. R. Schneider, G. M. Sheldrick, *Structure* **1996**, *4*, 1509–1515.
- [48] P. J. Loll, A. E. Bevivino, B. D. Kerty, P. H. Axelsen, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 1516–1522.
- [49] P. J. Loll, R. Miller, C. M. Weeks, P. H. Axelsen, *Chem. Biol.* **1998**, *5*, 293–298.
- [50] M. Nieto, H. R. Perkins, *Biochem. J.* **1971**, *123*, 780–803.
- [51] D. H. Williams, J. P. Waltho, *Biochem. Pharmacol.* **1988**, *37*, 133–141.
- [52] D. H. Williams, M. S. Searle, M. S. Westwell, U. Gerhard, S. E. Holroyd, *Philos. Trans. R. Soc. London A* **1993**, *345*, 11–21.
- [53] C. M. Pearce, U. Gerhard, D. H. Williams, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1995**, 159–162.
- [54] G. J. Sharman, M. S. Searle, B. Benhamu, P. Groves, D. H. Williams, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 1644–1646; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 1483–1485.
- [55] M. S. Searle, G. J. Sharman, P. Groves, B. Benhamu, D. A. Beauregard, M. S. Westwell, R. J. Dancer, A. J. Maguire, A. C. Try, D. H. Williams, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1996**, 2781–2786.
- [56] J. P. Waltho, D. H. Williams, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 2475–2480.
- [57] G. M. Sheldrick, E. Paulus, L. Vértessy, F. Hahn, *Acta Crystallogr. Sect. B* **1995**, *51*, 89–98.
- [58] M. Schäfer, E. Pohl, K. Schmidt-Bäse, G. M. Sheldrick, R. Hermann, A. Malabarba, M. Nebuloni, G. Pelizzi, *Helv. Chim. Acta* **1996**, *79*, 1916–1924.
- [59] M. S. Westwell, U. Gerhard, D. H. Williams, *J. Antibiot.* **1995**, *48*, 1292–1298.
- [60] J. P. Mackay, U. Gerhard, D. A. Beauregard, M. S. Westwell, M. S. Searle, D. H. Williams, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 4581–4590.
- [61] a) J. P. Mackay, U. Gerhard, D. A. Beauregard, R. A. Maplestone, D. H. Williams, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 4573–4580; b) U. Gerhard, J. P. Mackay, R. A. Maplestone, D. H. Williams, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 232–237.
- [62] P. Groves, M. S. Searle, J. P. Waltho, D. H. Williams, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 7958–7964.
- [63] P. Groves, M. S. Searle, J. P. Mackay, D. H. Williams, *Structure* **1994**, *2*, 747–754.
- [64] W. G. Prowse, A. D. Kline, M. A. Skelton, R. J. Loncharich, *Biochemistry* **1995**, *34*, 9632–9644.
- [65] G. Batta, M. F. Cristofaro, G. J. Sharman, D. H. Williams, *Chem. Commun.* **1996**, 101–103.
- [66] Y. R. Cho, A. J. Maguire, A. C. Try, M. S. Westwell, P. Groves, D. H. Williams, *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 207–215.
- [67] B. Bardsley, D. H. Williams, *Chem. Commun.* **1997**, 1049–1050.
- [68] V. M. Good, M. N. Gwynn, D. J. C. Knowles, *J. Antibiot.* **1990**, *43*, 550–555.
- [69] D. A. Beauregard, D. H. Williams, M. N. Gwynn, D. J. C. Knowles, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1995**, *39*, 781–785.
- [70] D. A. Beauregard, A. J. Maguire, D. H. Williams, P. E. Reynolds, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1997**, *41*, 2418–2423.
- [71] M. S. Westwell, B. Bardsley, R. J. Dancer, A. C. Try, D. H. Williams, *Chem. Commun.* **1996**, 589–590.
- [72] A. H. C. Uttley, C. H. Collins, J. Naidoo, R. C. George, *Lancet* **1988**, *1*, 57–58.
- [73] a) M. Arthur, C. Molinas, T. D. H. Bugg, G. D. Wright, C. T. Walsh, P. Courvalin, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1992**, *36*, 867–869; b) M. Arthur, C. Molinas, P. Courvalin, *J. Bacteriol.* **1992**, *174*, 2582–2591; c) M. Arthur, C. Molinas, F. Depardieu, P. Courvalin, *J. Bacteriol.* **1993**, *175*, 117–127; d) P. Courvalin, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1990**, *34*, 2291–2296; e) M. Arthur, P. Reynolds, P. Courvalin, *Trends Microbiol.* **1996**, *4*, 401–407; f) R. Leclercq, P. Courvalin, *Clin. Inf. Dis.* **1997**, *24*, 545–556.
- [74] a) C. T. Walsh, *Science* **1993**, *261*, 308–309; b) C. T. Walsh, S. L. Fisher, I.-S. Park, M. Prahalad, Z. Wu, *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 21–28.
- [75] N. E. Allen, D. L. LeTourneau, J. N. Hobbs, Jr., *J. Antibiot.* **1997**, *50*, 677–684.
- [76] T. I. Nicas, C. T. Cole, D. A. Preston, A. A. Schabel, R. Nagarajan, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1989**, *33*, 1477–1481.
- [77] A. Malabarba, T. I. Nicas, R. C. Thompson, *Med. Res. Rev.* **1997**, *17*, 69–137.
- [78] R. D. G. Cooper, N. J. Snyder, M. J. Zweifel, M. A. Staszak, S. C. Wilkie, T. I. Nicas, D. L. Mullen, T. F. Butler, M. J. Rodriguez, B. E. Huff, R. C. Thompson, *J. Antibiot.* **1996**, *49*, 575–581.
- [79] T. I. Nicas, D. L. Mullen, J. E. Flokowitsch, D. A. Preston, N. J. Snyder, M. J. Zweifel, S. C. Wilkie, M. J. Rodriguez, R. C. Thompson, R. D. G. Cooper, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1996**, *40*, 2194–2199.
- [80] A. Malabarba, R. Ciabatti, R. Scotti, B. P. Goldstein, P. Ferrari, M. Kurz, B. P. Andreini, M. Denaro, *J. Antibiot.* **1995**, *48*, 869–883.
- [81] R. J. Dancer, A. C. Try, G. J. Sharman, D. H. Williams, *Chem. Commun.* **1996**, 1445–1446.
- [82] G. J. Sharman, A. C. Try, R. J. Dancer, Y. R. Cho, T. Staroske, B. Bardsley, A. J. Maguire, M. A. Cooper, D. P. O'Brien, D. H. Williams, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 12041–12047.
- [83] D. P. O'Brien, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [84] R. M. H. Entress, R. J. Dancer, D. P. O'Brien, A. C. Try, M. A. Cooper, D. H. Williams, *Chem. Biol.* **1998**, *5*, 329–337.
- [85] D. H. Williams, M. J. Stone, P. R. Hauck, S. K. Rahman, *J. Nat. Prod.* **1989**, *52*, 1189–1208.
- [86] a) M. J. Stone, D. H. Williams, *Mol. Microbiol.* **1992**, *6*, 29–34; b) R. A. Maplestone, D. H. Williams, M. J. Stone, *Gene* **1992**, *115*, 151–157.
- [87] a) L. Andrus, K. J. Lafferty, *Scan. J. Immunol.* **1982**, *15*, 449–458; b) B. E. Bierer, S. L. Schreiber, S. J. Burakoff, *Eur. J. Immunol.* **1991**, *21*, 439–445; c) J. E. Kay, L. Kromwel, S. E. A. Doe, M. Denyer, *Immunology* **1991**, *72*, 544–549; d) N. H. Sigal, C. S. Lin, J. J. Siekierka, *Transplant. Proc.* **1991**, *23*, 1–5; e) N. H. Sigal, F. J. Dumont, *Ann. Rev. Immunol.* **1992**, *10*, 519–560; f) A. Ruhlmann, A. Nordheim, *Immunobiology* **1997**, *198*, 192–206.
- [88] J. Liu, J. D. Farmer, W. S. Lane, J. Friedman, I. Weissman, S. L. Schreiber, *Cell* **1991**, *66*, 807–815.
- [89] J. Kunz, M. N. Hall, *Trends Biochem. Sci.* **1993**, *18*, 334–338.
- [90] D. A. Hopwood, *Proc. R. Soc. London B* **1988**, *235*, 121.

- [91] a) S. Donadio, J. B. McAlpine, P. J. Sheldon, M. Jackson, L. Katz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, 90, 7119–7123; b) J. Cortés, K. E. H. Wiesmann, G. A. Roberts, M. J. B. Brown, J. Staunton, P. F. Leadlay, *Science* **1995**, 268, 1487–1489.
- [92] P. J. Solenberg, P. Matsushima, D. R. Stack, S. C. Wilkie, R. C. Thompson, R. H. Baltz, *Proceedings of the Sixth Conference on the Genetics and Molecular Biology of Industrial Organisms*, Bloomington, Indiana, **1996**.
- [93] a) M. S. Westwell, M. S. Searle, D. H. Williams, *J. Mol. Recognit.* **1996**, 9, 88–94; b) D. H. Williams, M. S. Westwell, *Chem. Biol.* **1996**, 3, 695–701.
- [94] M. S. Searle, M. S. Westwell, D. H. Williams, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1995**, 141–151.
- [95] D. H. Williams, A. J. Maguire, W. Tsuzuki, M. S. Westwell, *Science* **1998**, 280, 711–714.
- [96] D. H. Williams, B. Bardsley, W. Tsuzuki, A. J. Maguire, *Chem. Biol.* **1997**, 4, 507–512.
- [97] H.-J. Bohm, *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1994**, 8, 243–256.
- [98] W. E. Stites, *Chem. Rev.* **1997**, 97, 1233–1250.
- [99] K. Hiramatsu, H. Hanaki, T. Ino, K. Yabuta, T. Oguri, F. C. Tenover, *J. Antimicrob. Chemother.* **1997**, 40, 135–136.
- [100] D. Josefson, *Br. Med. J.* **1997**, 315, 700.
- [101] a) A. Malabarba, T. I. Nicas, R. Ciabatti, *Eur. J. Med. Chem.* **1997**, 32, 459–478; b) R. Ciabatti, A. Malabarba, *Farmaco* **1997**, 52, 313–321.

Zitieren von Zeitschriften

Im Literaturverzeichnis von Beiträgen in der *Angewandten Chemie* soll der Name einer Zeitschrift nicht durch „*ibid.*“ ersetzt werden, wenn sie mehrmals hintereinander zitiert wird, da in elektronischen Datenbanken eine Suche nach „*ibid.*“ nicht sinnvoll ist und für die Zukunft geplante Hyperlinks zu zitierten Beiträgen der *Angewandten Chemie* bei der elektronischen Version der Zeitschrift nicht möglich sind, wenn die Abkürzung „*ibid.*“ verwendet wird. Deshalb sollen *immer* die nach dem Chemical Abstracts Service Source Index abgekürzten Namen einer Zeitschrift aufgeführt werden. Entsprechend sollten stets alle Autoren angegeben werden, wenn mehrere Beiträge derselben Autoren hintereinander zitiert werden. Beispiele:

- [1] a) J. Guo, K. J. Duffy, K. L. Stevens, P. I. Dalko, R. M. Roth, M. M. Hayward, Y. Kishi, *Angew. Chem.* **1998**, 110, 198–202; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 187–190; b) M. M. Hayward, R. M. Roth, K. J. Duffy, P. I. Dalko, K. L. Stevens, J. Guo, Y. Kishi, *Angew. Chem.* **1998**, 110, 202–206; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 190–196.
- [2] a) R. Mokaya, W. Jones, *Chem. Commun.* **1996**, 981–982; b) R. Mokaya, W. Jones, *Chem. Commun.* **1996**, 983–984.